



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DE RIESGOS  
MICROBIANOS IMPLICADOS EN LA  
PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO  
DE GUACAMOLE**

**T E S I S**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
DE ALIMENTOS**

Presenta:

**Q.F.B. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**

CENTRO UNIVERSITARIO

Querétaro, Qro.; Julio de 1999

COMITÉ DE ADMINISTRACIÓN DE BIBLIOTECA



No Adq. 60434

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. 664.001

A795c

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

LIBRO DE LA BIBLIOTECA  
ALBERTO DE LA BIBLIOTECA  
COMITÉ DE ADMINISTRACIÓN DE BIBLIOTECA  
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIANOS IMPLICADOS EN LA  
PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE GUACAMOLE”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presenta:

**Q.F.B. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**

Dirigida por:

**DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN**

SINODALES

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN  
Presidente

M.C. JOSEFINA SALDAÑA LOZANO  
Secretario

M.C. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ  
Vocal

M. en S.P. FAUSTO TEJEDA TRUJILLO  
Suplente

M.C. JAVIER CASTRO ROSAS  
Suplente

Q.M.J. MERCED ESPARZA GARCÍA  
Director de la Facultad de Química

DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS  
Directora de Investigación y Posgrado

## **Agradezco sinceramente:**

- Al Dr. Escartín por su apoyo y confianza.
- A Montse por su trabajo, compañía y amistad.
- A la maestra Josy, la maestra Blanca, el maestro Fausto, y Javier por sus comentarios y observaciones al trabajo.
- A mi Mamá por darme siempre un ejemplo de lucha. A mis hermanos por todo los momentos compartidos y por ser mis mejores amigos.
- A mi abuelita por su gran fortaleza; a mis Tías y primos por su apoyo incondicional. También a los futuros miembros de la familia por darnos esperanza.
- A la familia de Ulises por dejarme ser uno de ellos.
- A mi familia de Querétaro, la Sra. Queta Guevara, y el Sr. Memo Hernández.
- A mis compañeros de generación, especialmente a Bere, Montse, Polo, Julio y Pepe.
- A Lucy, a Pera, y a sus familias por el gran cariño que me han brindado.
- Un agradecimiento especial a Ulises, mi esposo, por enriquecer mi vida y permitirme formar parte de la suya.

**GRACIAS A TODOS**

## Resumen

**Palabras clave:** guacamole, inocuidad microbiana, análisis de riesgos.

El guacamole es un alimento tradicional y popular en nuestro país que se elabora con verduras crudas. Su preparación conlleva un contacto muy estrecho con las manos, y no recibe ningún terminal que asegure su inocuidad. Estos hechos pueden propiciar contaminación y sobrevivencia de microorganismos que impliquen un riesgo a la salud humana. El objetivo del trabajo consistió en evaluar los riesgos microbianos que representa el guacamole para los consumidores. Se estudió la incidencia de microorganismos de interés sanitario en el producto comercial, la dinámica de 4 bacterias patógenas en pulpa de aguacate a 22 y 4-7°C, el efecto del pH sobre el comportamiento de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en caldo soya tripticasa, y la patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole. En 75 muestras de guacamole obtenidas de restaurantes, mercados, fondas y de comercios de la vía pública, se efectuaron mediciones de pH y actividad de agua, recuentos de bacteria mesófilas aerobias (BMA), organismos coliformes (OCT), hongos, levaduras, *E. coli* y *S. aureus*, y la investigación de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*. Los valores de actividad de agua se encontraron entre límites estrechos, 0.967 y 0.998; en contraste, el pH de las muestras osciló, desde 4.04 hasta 7.25. Se observó una amplia variabilidad en el contenido de los microorganismos indicadores, con tendencia a presentar niveles elevados independientemente del sitio de muestreo: hasta de 8.17 y de 7.08 log<sub>10</sub> UFC/g de BMA y OCT, respectivamente. La positividad a *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* spp fue del 16, 6.7 y 1.3%, respectivamente. La elevada incidencia de *E. coli* (60%), constituye un riesgo potencial de la presencia de microorganismos enteropatógenos. *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp, y *E. coli* O157:H7 mostraron amplia capacidad para desarrollarse a 22°C; en tanto que en refrigeración solamente *L. monocytogenes* se multiplicó, alcanzando niveles similares a los observados a 22°C. Los tres patógenos restantes sobrevivieron en refrigeración al menos dos semanas. El límite de pH para el desarrollo de *L. monocytogenes* en CST ajustado con ácido cítrico a 35°C fue de 5.4, y para *Salmonella* de 5.0 (valor mínimo estudiado); cifras inferiores a la observada en 53 muestras de guacamole comercial. Las 16 cepas hemolíticas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole resultaron patógenas para el ratón.

Resulta evidente que el consumo del guacamole implica un riesgo potencial severo de infección por microorganismos patógenos entéricos; y puede ser un vehículo importante de *L. monocytogenes*; aún niveles de pH hasta de 5.0 en el guacamole y su almacenamiento en refrigeración no cancelan tales riesgos.

## SUMMARY

**Keywords:** guacamole, food safety, risk analysis

Guacamole is a fresh salad prepared mainly with avocado pulp, which adds vegetables like tomato, onion, and chili. This salad is occasionally spiced with lemon juice. Guacamole is widely consumed in Mexico, and is ready-to-eat sold at restaurants, markets and in the streets. Because of its fresh ingredients and its hand-make preparation a high occurrence of enteric pathogens could be expected. The aim of this work was to evaluate the microbial risks implicated with guacamole consume.

A survey of pathogens (*Salmonella*, *L. monocytogenes*) and indicators (aerobic plate count [APC], coliform organisms [CO], molds and yeast, *E. coli* and *S. aureus*) was carried out in 75 commercial samples. Water activity ( $A_w$ ) and pH measurements were recorded in all of the samples. Commercial samples were recollected from restaurants, markets, and from the street within a year. The behavior of *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *S. aureus*, and *E. coli* O157:H7 in avocado pulp, the main ingredient of guacamole, was studied at 22 and 4-7 °C. pH effect over the growth of *Salmonella* spp and *L. monocytogenes* in trypticase soy broth (TSB) at 35°C was also studied. pH values tested were in the range from 5.0 to 7.0. Pathogenicity of strains of *L. monocytogenes* isolated from commercial samples of guacamole was tested on mice.

$A_w$  values were in the range of 0.967 to 0.998. pH values were in the range of 4.04 to 7.25. A high incidence of indicators was observed in all of the samples regardless of the origin of the sample (restaurant, market or street). Maximum values of  $8.17 \log_{10}$  CFU/g APC, and  $7.08 \log_{10}$  CFU/g CO were observed. Incidence of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *Salmonella* spp was of 16, 6.7 and 1.3%, respectively. The observed incidence of *E. coli* (60%) suggested an enteric-pathogen presence risk.

In avocado pulp, all of the pathogens tested developed at 22 °C. *L. monocytogenes* was the only one grown at 4-7 °C, reaching levels close to that reached at 22 °C. *Salmonella*, *E. coli*, and *S. aureus* showed no development at 4-7 °C but survived for at least two weeks. pH values lesser than 5.4 inhibit development of *L. monocytogenes* in TSB at 35 °C. pH values of 5.0 does not inhibit the development of *Salmonella* spp in TSB at 35 °C. 53 samples of guacamole showed a pH value higher than 5.0. All the haemolytic strains of *L. monocytogenes* isolated from commercial samples of guacamole were pathogens to the mice.

Guacamole represents a potential vehicle of enteric pathogens and *L. monocytogenes*. The ability of develop of the tested pathogens in avocado pulp increase the risk of their presence in guacamole, being a vehicle for an infection. The ability of *L. monocytogenes* to survive and development at refrigeration temperatures and at low pH values makes it one of the most hazardous microorganisms in guacamole.

## Índice General

## Página

<u>Resumen</u>	<u>i</u>
<u>Summary</u>	<u>ii</u>
<u>Índice General</u>	<u>iii</u>
<u>Índice de Figuras</u>	<u>vi</u>
<u>Índice de Tablas</u>	<u>ix</u>
<u>1. Introducción</u>	<u>1</u>
<u>2. Antecedentes</u>	<u>4</u>
2.1 Impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo	5
2.2 Análisis de riesgos microbianos	8
2.3 Guacamole	18
2.4 Microorganismos patógenos de interés	24
2.4.1 <i>Salmonella</i> spp	27
2.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	33
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.4.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	47
<u>3. Objetivos</u>	<u>55</u>
3.1 Objetivo General	56
3.2 Objetivos específicos	56
<u>4. Metodología</u>	<u>57</u>
4.1 Materiales	58
4.2 Métodos	59
4.2.1 Evaluación de las técnicas propuestas por la USDA y la FDA para la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> aplicadas a pulpa de aguacate	59

4.2.1.1 Efecto de la pulpa de aguacate sobre la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> por las técnicas propuestas por la USDA y la FDA	59
4.2.1.2 Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de la USDA y la FDA para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> a partir de pulpa de aguacate	60
4.2.2 Evaluación de la técnica propuesta por el HPB para el aislamiento de <i>Salmonella</i> aplicada a pulpa de aguacate	63
4.2.3 Investigación de la microbiología del guacamole tradicional	63
4.2.3.1 Medición de pH	65
4.2.3.2 Medición de actividad de agua	65
4.2.3.3 Recuento de microorganismos indicadores	65
4.2.3.4 Investigación de microorganismos patógenos	67
4.2.4 Determinación de la patogenicidad de cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de guacamole	68
4.2.5 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , y <i>S. aureus</i> en pulpa de aguacate	69
4.2.6 Evaluación del efecto del pH sobre el comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en caldo soya tripticasa	70
4.3 Análisis estadístico	71
<b><u>5. Resultados y discusión</u></b>	<b><u>72</u></b>
5.1 Evaluación de la técnica propuesta por el HBP para el aislamiento de <i>Salmonella</i> aplicada a pulpa de aguacate	73
5.2 Evaluación de las técnicas propuestas por la USDA y la FDA para la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> aplicadas a pulpa de aguacate	77
5.2.1 Efecto de la pulpa de aguacate sobre la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> por las técnicas propuestas por la USDA y la FDA	78



5.2.2 Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de la USDA y la FDA para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> a partir de pulpa de aguacate	78
5.3 Investigación de la microbiología del guacamole tradicional	81
5.3.1 pH y actividad de agua	82
5.3.2 Microorganismos indicadores	90
5.3.3 Microorganismos patógenos	98
5.3.3.1 <i>L. monocytogenes</i>	98
5.3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	105
5.3.3.3 <i>Salmonella</i>	105
5.4 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, y <i>S. aureus</i> en pulpa de aguacate	108
5.4.1 <i>L. monocytogenes</i>	108
5.4.2 <i>Salmonella</i>	115
5.4.3 <i>E. coli</i> O157:H7	118
5.4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	127
5.5 Evaluación del efecto del pH sobre el comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> en caldo soya tripticasa	134
5.5.1 <i>L. monocytogenes</i>	134
5.5.2 <i>Salmonella</i>	139
5.6 Patogenicidad de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de guacamole	145
<b><u>6. Conclusiones</u></b>	<b><u>149</u></b>
<b><u>7. Referencias bibliográficas</u></b>	<b><u>152</u></b>

## Índice de Figuras

	Página
1. Producción de un alimento inócuo.	10
2. Identificación de microorganismos potencialmente peligrosos en un alimento específico	12
3. Preguntas que se pretenden resolver con este trabajo	26
4. Mecanismo de invasión de <i>L. monocytogenes</i> a una célula huésped	37
5. Ecología de <i>L. monocytogenes</i> en el sistema agrícola	38
6. Fuentes y mecanismos de contaminación de <i>E. coli</i> O157:H7 a los alimentos y al hombre	53
7. Técnica utilizada por la USDA para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> de los alimentos	61
8. Técnica propuesta por la FDA para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> de los alimentos	62
9. Técnica propuesta por el HBP para el aislamiento de <i>Salmonella</i> a partir de alimentos	64
10. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos del pH de guacamole según sitio de muestreo	83
11. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos de la actividad de agua de guacamole según sitio de muestreo	85
12. Relación entre el contenido de OCT y el pH del guacamole	86
13. Correlación del pH y la actividad de agua con el contenido de OCT de 18 muestras de guacamole	87
14. Contenido de OCT vs pH vs actividad de agua de 18 muestras de guacamole	89
15. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos de BMA y OCT de guacamole según sitio de muestreo	91
16. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos de hongos y levaduras de guacamole según sitio de muestreo	92
17. Contenido de BMA en guacamole recién preparado y almacenado	94

18. Contenido de OCT y hongos en guacamole recién preparado y almacenado	95
19. Incidencia de <i>E. coli</i> en guacamole según sitio de muestreo	97
20. Positividad de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> , y <i>S. aureus</i> en guacamole	99
21. Positividad de <i>L. monocytogenes</i> en guacamole según sitio de muestreo	100
22. Relación entre el pH y la positividad a <i>L. monocytogenes</i> en guacamole	103
23. Contenido de BMA y hongos en muestras de guacamole positivas y negativas a <i>L. monocytogenes</i>	104
24. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de aguacate almacenada a 22° y 4-7°C	109
25. Comportamiento de BMA y OCT nativos de pulpa de aguacate almacenada a 22°C	114
26. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en pulpa de aguacate almacenada a 22 y 3 4-8.0°C	116
27. Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en pulpa de aguacate a 22°C	119
28. Comportamiento del nivel de inóculo bajo de <i>E. coli</i> O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada a 22°C	121
29. Comportamiento del nivel de inóculo alto de <i>E. coli</i> O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada a 22°C	123
30. Dinámica de <i>E. coli</i> O157:H7 en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración	125
31. Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración	126
32. Comportamiento de <i>S. aureus</i> en pulpa de aguacate con dos niveles de inóculo e conservada a 22°C	128
33. Comportamiento de <i>S. aureus</i> y OCT en pulpa de aguacate almacenada a 22°C	130
34. Dinámica de <i>S. aureus</i> en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración con dos niveles de inóculo	133
35. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> a 35°C en CST ajustado con ácido cítrico seis niveles de pH	135

36. Análisis de varianza de las pendientes de <i>L. monocytogenes</i> a 35°C en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0	136
37. Comportamiento de 26 cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 35°C en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2, y 5.0	138
38. Comportamiento de <i>Salmonella</i> spp a 35°C en caldo soya tripticasa a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0	140
39. Media, desviación estándar y error estándar del valor de las pendientes de la fase logarítmica del comportamiento de <i>Salmonella</i> spp a 35°C en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0.	141
40. Distribución de los valores de pH de guacamole comercial	142
41. Comportamiento promedio de dos cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de guacamole y <i>S. typhimurium</i> en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2, y 5.0 a 35°C	143
42. Media acumulada del número de ratones muertos durante 5 días por cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de guacamole	146

## Indice de Tablas

	Página
1. Agentes patógenos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos	6
2. Porcentaje de casos de enfermedad transmitidas por alimentos en tres países según causa	7
3. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos según etiología en México	11
4. Tipos de alimentos implicados con mayor frecuencia en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos por país	13
5. Número anual de brotes por país según agente etiológico	15
6. Factores que contribuyen a la configuración de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Europa y Estados Unidos	16
7. Factores que contribuyen a la configuración de brotes de ETAs por orden de importancia y porcentaje de frecuencia en Estados Unidos	17
8. Fuentes y Mecanismos de contaminación de microorganismos patógenos para frutas y verduras crudas	20
9. Brotes de ETAs causados por productos crudos en Estados Unidos	23
10. Composición química del aguacate y otros alimentos	25
11. Identificación bioquímica de <i>Salmonella</i>	32
12. Características diferenciales de <i>Listeria</i> y otros géneros	40
13. Características diferenciales del género <i>Listeria</i> y <i>L. gayi</i> , <i>L. murrayi</i> y <i>L. denitrificans</i>	41
14. Evaluación de la sensibilidad y del pre-enriquecimiento del método del HBP para el aislamiento de <i>Salmonella</i> aplicado en pulpa de aguacate	75
15. Desarrollo de la flora asociada en medios sólidos del método de aislamiento de <i>Salmonella</i> del HBP aplicado a pulpa de aguacate	76
16. Evaluación de las técnicas cuantitativas de la USDA y la FDA para la recuperación de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de aguacate	79
17. Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de la USDA y la FDA para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> a partir de pulpa de aguacate	80

18. Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> reportada en diversos alimentos	101
19. Incidencia de <i>S. aureus</i> en diversos alimentos. Varios autores	106
20. Tiempo de generación de <i>L. monocytogenes</i> en pulpa de aguacate a 22°C comparado con otros alimentos a temperaturas similares	112
21. Velocidad de crecimiento y tiempo de generación en dos estudios del comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en pulpa de aguacate a 22°C con	120
22. Tiempo de generación de <i>S. aureus</i> en pulpa de aguacate a 22°C y en otros substratos a temperaturas similares	132
23. Densidad máxima alcanzada y pendiente de la fase logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> spp en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y	144
24. Patogenicidad al ratón de 6 cepas de <i>L. monocytogenes</i> almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración previo a la preparación del inóculo.	148



México enfrenta problemas y necesidades de orden económico, político, social y en forma especial en materia de salud pública. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria en nuestro país (Rocabado y Bermejo, 1993).

El sistema de vigilancia epidemiológica de estos padecimientos tiene muchas carencias y la información que genera es muy limitada (Rocabado y Bermejo, 1993). No se conoce el papel que tienen como vehículo de enfermedad los diferentes alimentos, ni cuáles son los agentes patógenos implicados más frecuentemente en el país. Este vacío de información hace difícil evaluar los riesgos que representa el consumo de los alimentos. Podrían utilizarse reportes epidemiológicos de otros países; sin embargo los hábitos alimenticios, las materias primas de las que se parte, las condiciones de elaboración, transporte y comercialización, son diferentes en cada país. Además, algunos alimentos tradicionales sólo se consumen en nuestro país.

Existen diversos indicativos del riesgo que implica el consumo de un alimento; uno de ellos es la frecuencia con que se asocia como vehículo de enfermedad. La incidencia de microorganismos patógenos e indicadores de prácticas sanitarias inadecuadas, también es una medida del riesgo; riesgo que se incrementa cuando el alimento sostiene el crecimiento de microorganismos patógenos.

Entre los alimentos tradicionales mexicanos destaca el guacamole, por su amplio consumo. Existen múltiples formulaciones para elaborar este alimento; sin embargo, todas ellas usan como materia prima pulpa de aguacate. La pulpa de aguacate se adiciona de verduras crudas tales como cebolla, jitomate, chile, cilantro, ocasionalmente jugo de limón y otros ingredientes. Algunos de estos materiales pueden ser vehículo de microorganismos patógenos. En Estados Unidos, las frutas y verduras crudas (o productos elaborados a partir de ellos sin pasteurizar) han sido vehículos de patógenos de origen intestinal en brotes de ETAs (Beuchat y Ryu, 1997). Entre ellos destacan *Salmonella*, *Vibrio cholerae* O1, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, virus de la hepatitis A y algunos parásitos (Bean y col, 1997). El uso de estiércol como fertilizante y de aguas negras no tratadas en el riego, se reconocen como algunos de los



aguas negras no tratadas en el riego, se reconocen como algunos de los mecanismos de la contaminación de los vegetales frescos (Beuchat y Ryu, 1997). En diversos lugares del campo mexicano continúan aplicándose estas prácticas; por tanto, es probable que los vegetales contengan microorganismos patógenos intestinales. Además de este hecho, la preparación del guacamole implica un estrecho y obligado contacto con las manos, que puede propiciar contaminación de microorganismos patógenos de origen humano. Este alimento no recibe ningún tratamiento terminal previo al consumo que asegure su inocuidad, lo que favorece la sobrevivencia de los microorganismos presentes. Por último, suele dejarse varias horas a temperatura ambiente antes de su consumo.

El guacamole, como muchos otros alimentos, se prepara en establecimientos que laboran bajo condiciones sanitarias muy diversas. En algunos de ellos se cuenta con las instalaciones adecuadas y personal exclusivo para la elaboración de los alimentos. Por el contrario, en otros sitios y en la vía pública las condiciones son precarias y generalmente se carece de agua potable corriente. Las malas prácticas sanitarias de las que pueda ser objeto el alimento en algunos de estos lugares, incrementan los riesgos asociados a su consumo.

A pesar de que el guacamole se ha consumido en nuestro país desde hace mucho tiempo y se percibe que puede representar un riesgo importante, se carece de información sobre su microbiología. Tampoco existen reportes del comportamiento de microorganismos patógenos, tanto en el alimento preparado como en la pulpa de aguacate.

Se reconoce ampliamente que este tipo de información es necesario para establecer medidas racionales y efectivas de control y prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos (Notermans y col., 1996).



## 2.1 Impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo.

Los alimentos le proporcionan al hombre, además de una satisfacción psicológica, los nutrientes que necesita para realizar todas sus funciones; sin embargo, pueden contener agentes nocivos que dañen su salud. Estos agentes nocivos o patógenos pueden ser bacterias, hongos, toxinas de algas microscópicas, parásitos, virus, y sustancias químicas (Tabla 1). Las bacterias son la causa más frecuente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en todos los países que cuentan con registros estadísticos (Tabla 2). En 1980 Bryan estimó entre 1.4 y 3.4 millones por año, los casos de ETAs en Estados Unidos (Bryan y Hauschild, 1980); Todd en 1984 calculó 5 millones, y en 1989 estimó 12.6 millones para este mismo país (Todd, 1984; 1989). Parece ser que el problema que representan estas enfermedades es cada vez mayor.

También se han estimado los costos que implican estas enfermedades. En 1984 para Estados Unidos se calculó entre 1 y 10 mil millones de dólares por año; considerando gastos médicos, pérdidas en productividad y salarios, pérdidas de la industria por demandas, destrucción y devoluciones (Archer y Kvenberg, 1985). Para 1987 se calculaba entre 7.7 y 8.4 mil millones de dólares anuales (Kvenberg y Archer, 1987).

Las ETAs son la principal causa de morbilidad en Estados Unidos, un país que tiene un alto nivel de sanidad en la producción de alimentos (Bean y col., 1997). En nuestro país no existe información confiable sobre la incidencia de estas enfermedades; pero es de esperar que se presenten con alta frecuencia, ya que las condiciones en las que se elaboran y comercializan los alimentos en México son frecuentemente inadecuadas.

En México en 1996, 3 329 114 casos de diarrea se reportaron en todo el país; considerando que sólo cerca del 1% de los casos reales se reportan y que el 50-60% son transmitidos por alimentos, se estima que más de 160 millones de casos de ETAs se presentan anualmente (Escartín, 1997)

**Tabla 1. Agentes patógenos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos**

---

Bacterias
Intoxicaciones: <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i>
Infecciones: <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Toxiinfecciones: <i>C. perfringens</i> , <i>V. cholerae</i>

---

Hongos
Microscópicos: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium</i>
Macroscópicos: <i>Amanita phalloides</i>

---

Algas microscópicas
A través de pescado: ciguatoxina
A través de bivalvos: saxitoxina

---

Parásitos
Protozoarios: <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i>
Helminetos: <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Taenia solium</i>

---

Virus
Rotavirus, Norwalk

---

Sustancias químicas
Componentes naturales: alcaloides de hongos
Aditivos alimentarios: sulfitos, nitritos
Contaminantes ambientales: pesticidas, mercurio

---

Modificado de Escartín, 1996.

**Tabla 2.** Porcentaje de casos de enfermedad transmitidas por alimentos en tres países según causa.

<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Causa</b>	<b>%</b>
Holanda	1982	Microbiana	38.2
		Vegetales	0.3
		Química	0.0
		Otras	0.2
		Total conocida	40.2
		Desconocida	59.8
Canadá	1984	Microbiana	57.1
		Parásitos	0.0
		Animales	0.2
		Vegetales	0.1
		Química	0.8
		Total conocida	58.1
		Desconocida	41.9
Estados Unidos	1992	Bacteriana	37.7
		Viral	2.3
		Química	0.6
		Parásitos	0.0
		Vegetales	0.0
		Total confirmada	45.7
		Desconocida	54.3

(Escartín, 1998)

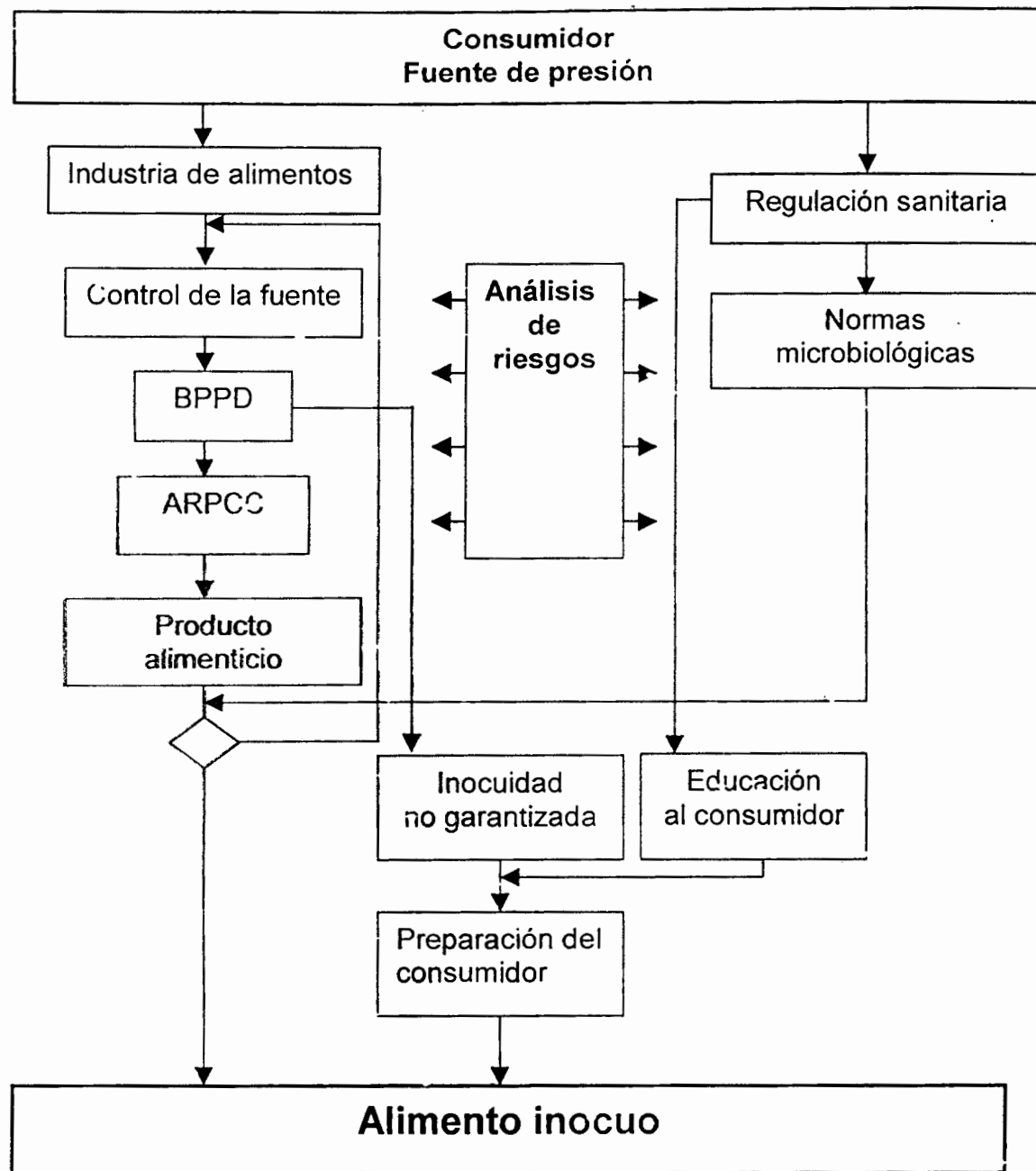
## 2.2 Análisis de riesgos microbianos.

Es evidente que las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. La vigilancia tradicional a base del control del producto final no asegura la producción de alimentos inocuos; por ello, en las últimas décadas se han utilizado otras alternativas. Se introdujeron como medidas preventivas las buenas prácticas de producción y distribución (BPPD), que proporcionan reglas generales sobre las condiciones ambientales y procedimientos de trabajo, basándose en experiencia práctica (Notermans y col., 1995).

El sistema de análisis de riesgos y puntos de control críticos (ARPC), fue diseñado para asegurar la inocuidad de los alimentos producidos para los programas espaciales en Estados Unidos (Bauman, 1990). Desde 1971, cuando se presentó en la Conferencia Nacional sobre la protección de los alimentos en Estados Unidos, su enfoque ha tenido una gran aceptación por las agencias de regulación estadounidenses, y progresivamente por las industrias de alimentos. En nuestros días la aplicación del ARPC es considerado el sistema más confiable para producir alimentos inocuos (Notermans y col., 1995). Este sistema identifica problemas antes de que sucedan y establece medidas de control en etapas del procesamiento que son críticas para asegurar la inocuidad de un alimento (Notermans y col., 1995).

El ARPC tiene un enfoque sistemático, e incluye la identificación, evaluación y control de los riesgos que pueden originarse en un alimento en particular. Se basa en información racional y comprobada, además de un análisis objetivo de la misma. En la Figura 1 se muestra el mecanismo aceptado generalmente para la producción de un alimento inocuo.

El análisis de riesgos es un proceso analítico, que evalúa la naturaleza y magnitud del riesgo. Algunos elementos del análisis de riesgos ya se emplean en ARPC de manera cualitativa, pero existe cada vez más, la tendencia de darle un enfoque cuantitativo a este sistema.



**Figura 1** Producción de un alimento inocuo. El análisis de riesgos proporciona elementos útiles tanto para la industria como para las agencias de regulación. Los productores de los alimentos son los responsables primarios de su calidad sanitaria, sin embargo las agencias de regulación y el consumidor también juegan un papel muy importante en el proceso (Modificado de Notermans y col., 1996).

El primer paso del análisis de riesgos consiste en evidenciar un efecto nocivo potencial para la salud humana asociado a un alimento en particular, es decir identificar el riesgo (Notermans y col., 1996). Esta identificación requiere del conocimiento de la composición microbiana de materiales crudos, de información epidemiológica de brotes que involucren alimentos del mismo tipo o relacionados y de datos microbiológicos del comportamiento de los microorganismos patógenos en los alimentos (Notermans y Mead, 1996; Notermans y col. 1996). En nuestro país el estudio de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos es casi nulo; por tanto no se conocen los alimentos, los agentes patógenos, ni los factores involucrados más frecuentemente en esos brotes (Tabla 3).

Recientemente se ha creado un procedimiento sencillo para la identificación de microorganismos potencialmente peligrosos (Fig.2). Del análisis de este **diagrama** resulta evidente la **dificultad** para evaluar los riesgos que representa cada alimento debido a la **carencia** de información que existe en el país. Son **escasos** los estudios sobre los alimentos que aquí se consumen, incluido **su nivel** de contaminación y el comportamiento de los diferentes patógenos en ellos.

Podrían utilizarse los reportes epidemiológicos de otros países; sin embargo existen diferencias entre países con respecto a los principales alimentos que se han involucrado en brotes de enfermedades. En la Tabla 4 se ilustra claramente este hecho. Por ejemplo, en Yugoslavia las carnes se asocian con el 64% de los brotes de etiología conocida; mientras que en España, con un porcentaje similar, es el huevo y sus productos los que ocupan este lugar. El consumo de hongos venenosos en Hungría causa el 47% de brotes, en contraste con otros países, como Estados Unidos, donde estos alimentos causan tan sólo el 0.4 al 0.8% de los brotes anuales reportado con etiología conocida (Bean y col., 1997). Estas diferencias no son fáciles de explicar, pero pueden deberse a los hábitos alimenticios de cada país y a la forma de elaborar los alimentos. Aunque los microorganismos implicados en brotes de ETA's son prácticamente los mismos en todos los países, representan problemas de diferentes magnitudes



**Tabla 3.** Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos según etiología en México (1986-1990).

Etiología	Número	%	Afectados	Alimento involucrado
Bacterias	165	42	9,903	Agua, leche, pollo, pozole, jamón, queso, carne de res, pastel, pescados y mariscos, crema barbacoa.
Virus	66	6.8	2,097	Agua.
Plaguicidas	40	10.2	673	Tamales, chocolate, cilantro, tortillas, chicharrón, atole, tacos.
Micotoxinas	12	3.0	80	Guisado de hongos del campo.
Parásitos	9	2.3	165	Chorizo, longaniza, carne de cerdo.
Talio	5	1.3	17	Jumiles, moronga.
Alcohol metílico	4	1.0	78	Conservas caseras, agua de jamaica.
Metales	3	0.8	85	Pastel, tortas.
Toxinas de origen marino	2	0.5	99	Almejas, mejillones, ostiones.
Otros	4	1.0	23	Agua de jamaica, azúcar.
Sin diagnóstico	83	21.1	3,151	Varios
Total	393	100.0	15,561	

Rocabado y Bermejo, 1993.

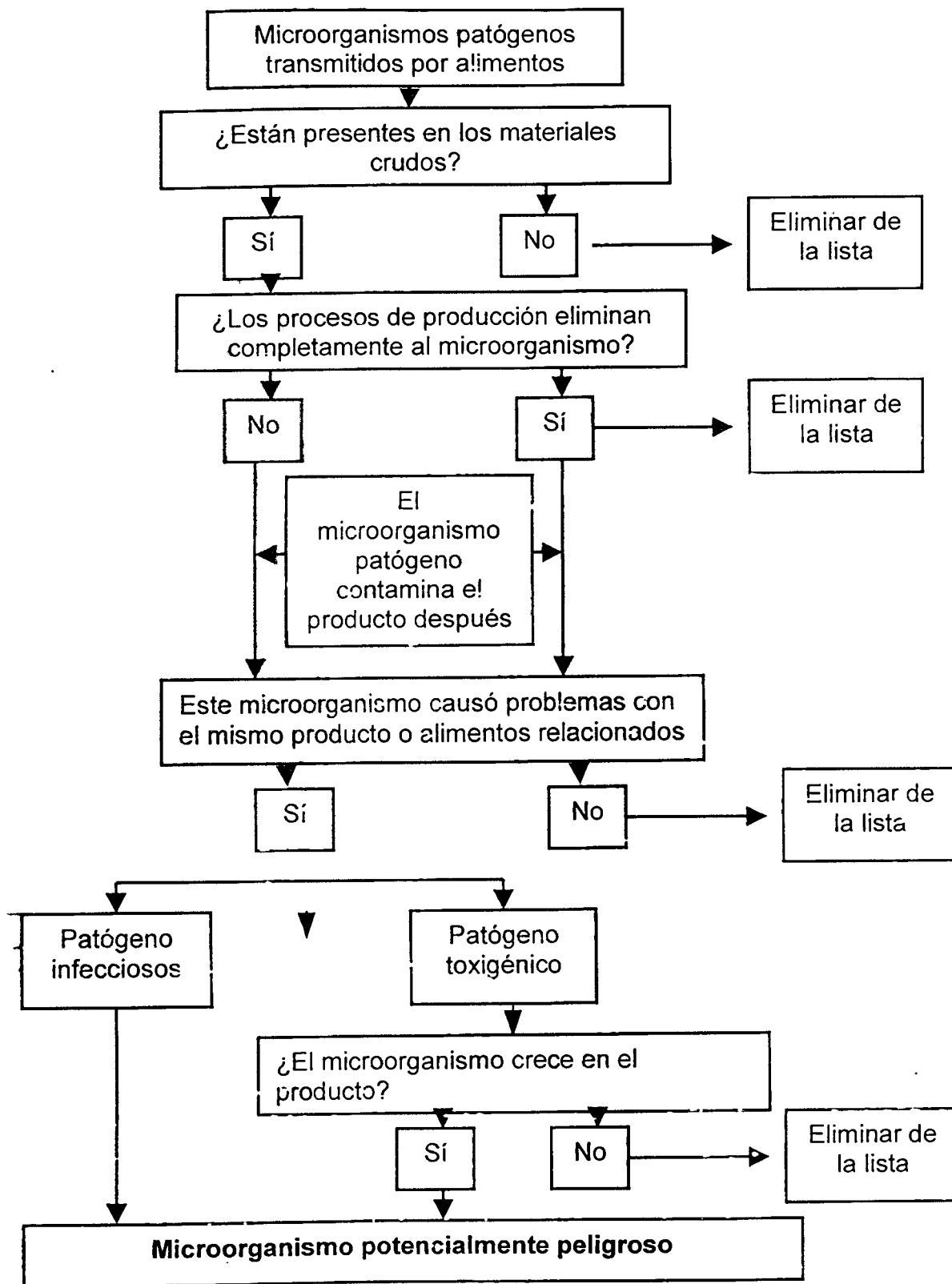


Figura 2. Identificación de microorganismos potencialmente peligrosos en un alimento específico. (Notermans y Mead, 1996).

**Tabla 4.** Tipos de alimentos implicados con mayor frecuencia en brotes de enfermedad por país.

Alimento	País	Frecuencia (%)
Carne	Estados Unidos	16*
	Israel	23
	Dinamarca	27
	Suecia	30
	Inglaterra/Gales	36
	Alemania	45
	Bélgica	46
	Albania	56
Yugoslavia	64	
Pollo	Escocia	43
Productos de pastelería	Polonia	35
	Portugal	37
	Bulgaria	46
	Suiza	47
Huevo y sus productos	Francia	45
	España	62
Hongos venenosos	Hungría	47
Comida china	Holanda	30

\* Porcentaje de brotes de etiología conocida asociados al alimento.  
(Tood, 1996)

en cada uno de ellos. Por ejemplo, en España, Inglaterra, Francia y Estados Unidos *Salmonella* es el principal patógeno en cuanto a frecuencia, mientras que en Cuba lo es *S. aureus* (Tabla 5).

Podría pensarse que las prácticas o procedimientos que originan los brotes de ETA's, son diferentes en cada país. Sin embargo, si se comparan los factores que contribuyeron a la aparición de brotes en Estados Unidos y en Europa se observa una gran similitud (Tabla 6).

Con el tiempo, surgen nuevos microorganismos patógenos y nuevos alimentos involucrados en brotes. Por el contrario los factores contribuyentes no suelen cambiar de manera notable en diferentes períodos. En Estados Unidos el enfriamiento inadecuado es la práctica más comúnmente detectada en estudios epidemiológicos, desde 1961 (Tabla 7). El enfriamiento inadecuado parece ser el principal factor que contribuye a los brotes a escala mundial, independientemente del lugar y del tiempo esta práctica produce o incrementa riesgos en los alimentos.

En los países desarrollados que cuentan con un programa de vigilancia de ETAs, y por tanto con amplia información epidemiológica, la identificación de riesgos para cada alimento presenta menos dificultades. Pero para países como el nuestro, donde sólo algunas enfermedades son de reporte obligatorio, la vigilancia de la calidad sanitaria de los alimentos es de cobertura restringida, no se cuenta con personal suficientemente capacitado para llevar a cabo esta vigilancia, ni se aplican medidas efectivas para el control de las ETAs. Es necesario, entre otras medidas, empezar por identificar y evaluar los riesgos que representa cada uno de nuestros alimentos. Para disponer así, de información útil y objetiva que nos permita a largo plazo producir y consumir alimentos seguros.

**Tabla 5.** Número anual de brotes por país, según agente etiológico.

País	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Israel	0.0 <sup>a</sup>	3.0	4.4	4.0	11.4
Finlandia	3.8	8.8	7.8	5.6	26.0
Dinamarca	2.0	5.8	5.2	0.0	13.0
Escocia	3.0	6.6	152.0	2.4	164.0
Suecia	0.6	4.6	7.0	2.8	15.0
Hungría	5.2	5.0	131.2	16.0	157.4
Portugal	0.0	0.3	6.8	7.3	14.4
Cuba	4.8	13.4	6.8	60.8	85.8
Holanda	4.8	2.4	8.0	0.0	15.2
Yugoslavia	0.4	2.8	46.0	13.0	62.2
Canadá	14.0	18.0	49.4	18.8	100.2
España	0.6	5.0	467.6	0.0	473.2
Inglaterra	28.3	53.3	450.0	9.5	541.1
Francia	0.0	17.6	177.0	12.8	207.4
Alemania	0.4	1.4	3.0	3.2	8.0
Japón	10.0	14.0	24.0	23.0	71.0
EUA	3.2	4.8	68.4	9.4	85.8

<sup>a</sup> Número de brotes por año (Media de 2-5 años)  
Modificado de Todd, 1996.

**Tabla 6.** Factores que contribuyen a la configuración de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Europa (1985-1989) y Estados Unidos (1961-1982).

Europa	Estados Unidos	Factor contribuyente
1*	1	Inadecuada refrigeración
2	5	Inadecuado calentamiento
3	3	Contaminación por persona infectada
4	4	Uso de ingredientes contaminados
5	7	Inadecuado recalentamiento
6	10	Uso de equipo contaminado
7	8	Alimento de fuente insegura
8	2	Preparación muy anticipada
9	6	Inadecuado mantenimiento en caliente
10		Pobre higiene general
11		Fallas en el procesamiento
12		Descongelación inadecuada
13	11	Uso de sobrantes

\* Orden descendente de importancia.

(Tood ,1996; Bryan,1988)

**Tabla 7.** Factores que contribuyen a la configuración de brotes de ETAs por orden de importancia (1-10) y porcentaje de frecuencia en Estados Unidos (varios periodos).

Factor contribuyente	Período cubierto ( Número de brotes )			
	1961-76 (1152)	1977-82 (766)	1973-87 (1182)	1988-92 (537)
Enfriamiento inapropiado	1 <sup>a</sup> (46) <sup>b</sup>	1 (41)	1 (87)	1 (61)
Preparación anticipada (12 h)	2 (21)	2 (25)		
Manipulador infectado	3 (20)	5 (15)	2 (59)	3 (34)
Ingrediente crudo contaminado	7 (11)	3 (23)		
Tratamiento térmico inadecuado	4 (18)	6 (14)	3 (56)	2 (48)
Mantenimiento en caliente inapropiado	5 (16)	7 (9)		
Recalentamiento inadecuado	6 (12)	7 (9)		
Alimentos de fuente insegura	10 (5)	4 (18)	5 (20)	5 (13)
Contaminación cruzada	9 (7)	9 (4)		
Limpieza de equipo inadecuada	8 (7)	10 (4)	4 (47)	4 (22)
Uso de sobrantes	11 (4)	12 (3)		
Contenedores o tuberías tóxicos	12 (3)	11 (3)		
Aditivos intencionales	13 (3)	13 (3)		

a: rango descendente de importancia; b: porcentaje de frecuencia  
(Bryan, 1988; Bean y Griffin, 1990; Bean y col., 1997)

### 2.3 Guacamole.

El aguacate es consumido en México y Latinoamérica desde la época precolombina. Gran parte de su consumo es como guacamole, un alimento tradicional muy popular entre la población.

El guacamole es una ensalada fresca que se elabora principalmente con pulpa de aguacate; suele adicionarse de cebolla, jitomate, chile, cilantro y generalmente se sazona con jugo de limón y sal. En algunas ocasiones se agrega leche o queso.

Para identificar los riesgos a la salud asociados a un alimento, se recomienda (IAMFES, 1987):

- Observar las operaciones que se llevan a cabo para elaborar el alimento, de principio a fin.
- Analizar el potencial de cada ingrediente para ser una fuente de contaminación o un medio para inhibir el crecimiento microbiano.
- Evaluar cada etapa de la preparación o procesamiento del alimento, para detectar prácticas que propicien contaminación, sobrevivencia, desarrollo o inactivación de los microorganismos.
- Investigar microorganismos patógenos y/o indicadores en el alimento.
- Realizar experimentos para determinar la sobrevivencia y/o desarrollo de microorganismos patógenos y deterioradores en el alimento.
- Evaluar la severidad de cada riesgo identificado.

El diagrama de flujo que se presenta en la Figura 2 se diseñó para identificar microorganismos potencialmente patógenos asociados a un alimento. Si realizamos esta evaluación con los microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos por alimentos, se pueden conocer los riesgos microbianos que representa un alimento en particular. Esta evaluación considera la contaminación, sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos. Por ello se podría utilizar el diagrama de la Figura 2 para identificar los riesgos microbianos que representa el guacamole y el tipo de microorganismos que pueden estar presentes.

La primera pregunta sería: ¿Qué microorganismos pueden estar presentes en los materiales con los que se elabora este alimento?.



Los ingredientes del guacamole son principalmente verduras crudas, que puede contaminarse desde el cultivo o después de la cosecha por diversos mecanismos (Tabla 8). *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, parásitos y virus entéricos pueden contaminar las frutas y verduras a través de estiércol, aguas negras no tratadas que se utilicen como agua de riego, o agua de lavado contaminada (Beauchat y Ryu, 1997). En México persiste el uso de estiércol y aguas negras como sustitutos de fertilizantes químicos y agua no contaminada; esta conducta se deriva de la escasez de agua y del desconocimiento de las consecuencias de estas prácticas.

Patógenos como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* se encuentran normalmente en algunos suelos (Beauchat y Ryu, 1997). Por ello es muy probable que estos microorganismos lleguen a contaminar las verduras crudas, especialmente aquellas que tienen un contacto directo con tierra durante su cultivo, como la cebolla y el cilantro. Sin embargo, es incompleta la información acerca de los patógenos y su frecuencia en los ingredientes usados en la elaboración del guacamole.

**Tabla 6.** Fuentes y mecanismos de contaminación de microorganismos patógenos para frutas y verduras crudos.

Precosecha	Poscosecha
Heces	Heces
Manipulación humana	Manipulación humana
Aire (Tierra)	Aire
Animales silvestres o domésticos	Animales silvestres o domésticos
Insectos	insectos
Agua de riego	Agua usada para lavar y enjuagar
Tierra	Almacenamiento inadecuado
Abono natural o pobremente tratado	Empacado inadecuado
	Contaminación cruzada
	Equipo para cosechar y transportar
	Manejo inapropiado después de la venta

Modificada de Beuchat y Ryu, 1997.

La segunda pregunta es ¿ Los procesos de producción o elaboración eliminan completamente al microorganismo?

La preparación del guacamole no incluye ningún tratamiento terminal que asegure la inactivación de los microorganismos que lleguen a contaminar el alimento. Así que los microorganismos que se encuentren en los ingredientes estarán presentes en el guacamole recién preparado.

La adición de jugo de limón podría disminuir el pH del alimento, y afectar el desarrollo de los microorganismos (si éste es posible), o incluso la sobrevivencia, si se alcanzaran niveles muy bajos de pH. No existe información específicamente en el guacamole sobre este aspecto.

Durante la preparación del guacamole se tiene un contacto directo y estrecho de las manos del preparador con el alimento, lo que puede propiciar contaminación. Los microorganismos que podrían introducirse en este momento son de origen humano, como patógenos intestinales, gérmenes que se encuentren en la piel y mucosas, o infectando heridas. Como podemos ver en la Tabla 3, la contaminación por una persona infectada es un factor importante para la configuración de brotes.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que se encuentra en la nasofaringe de 10-50% de los adultos sanos (Volk y col., 1988), por lo que se convierte en buen candidato para contaminar el guacamole durante su preparación.

En el siguiente punto se debe investigar si el microorganismo causó problemas con el mismo alimento o alimentos relacionados en otras ocasiones. En Estados Unidos y Europa, donde realizan regularmente el estudio de brotes, se consume guacamole que se importa de México; pero este guacamole es industrializado y tiene características diferentes al tradicional. Se elabora con pulpa de aguacate fresca y verduras deshidratadas, contiene conservadores químicos y generalmente se comercializa congelado.

Las frutas y vegetales crudos son los productos que podrían compararse con el guacamole tradicional. En Estados Unidos, en las últimas décadas se ha incrementado el número de brotes de ETA's asociados al consumo de estos

productos; debido entre otras causas, a que se dan prácticas inadecuadas durante el cultivo, cosecha y distribución de los frutos (Beuchat y Ryu, 1997).

En la Tabla 9 se muestran algunos brotes, donde los vehículos fueron frutas y verduras crudas o productos de estos sin pasteurizar. Algunos de tales brotes tuvieron repercusiones importantes, al abarcar varios estados o alcanzar un gran número de casos. Como se puede observar en la Tabla 9 todos los patógenos causantes de estos brotes son de origen intestinal.

*L. monocytogenes* también ha causado brotes que involucran verduras, como repollo, apio, tomates y lechuga (Ho y col., 1986; Sclech y col., 1983).

La última pregunta es: ¿ El microorganismo crece en el producto?. Según el diagrama, esta pregunta se aplica únicamente a los microorganismos toxigénicos que requieren crecer para producir los verdaderos agentes patógenos, las toxinas. Sin embargo para los microorganismos como *Clostridium perfringens* que muestra una dosis mínima infectante alta, es necesario que desarrolle hasta cierto nivel en el alimento para que constituya un riesgo significativo. Para aquellos germen con mayor virulencia y una dosis infectante baja, la contaminación puede ser suficiente para causar enfermedad. Es evidente que si el desarrollo se presenta se incrementa el riesgo a la salud. No existen reportes sobre el comportamiento de microorganismos patógenos o deterioradores en pulpa de aguacate o guacamole.

Como el principal componente del guacamole es la pulpa de aguacate, sería esta la que aportara mayor cantidad de nutrientes a los microorganismos que contaminen al alimento.

El aguacate presenta características muy diferentes a la mayoría de los frutos; contiene una gran cantidad de grasa, entre 15 y 20% en promedio. Específicamente la variedad Hass alcanza generalmente el 20% (Rodríguez, 1982). El crecimiento microbiano en este sustrato, podría ser difícil ya que el aguacate tiene bajo contenido en carbohidratos, tan solo entre 5 y 6%.

**Tabla 9. Brotes de ETAS causados por productos crudos en Estados Unidos (1990-1997)**

Año	Patógeno	Alimento	N° de casos	N° de estados	Fuente
1990	<i>S. chester</i>	Melón	245	30	C.A <sup>a</sup>
1990	<i>S. javiana</i>	Tomates	174	4	U.S <sup>b</sup>
1990	Virus hepatitis A	Fresas	18	2	U.S
1991	<i>S. ponna</i>	Melón	>400	23	U.S/C.A
1993	<i>E. coli</i> O157:H7	Sidra de manzana	23	1	U.S
1993	<i>S. montevideo</i>	Tomates	84	3	U.S
1994	<i>Shigella flexneri</i>	Cebollitas	72	2	C.A
1995	<i>S. stanley</i>	Germinado de alfalfa	242	17	D <sup>c</sup>
1995	<i>S. hartford</i>	Jugo de naranja	63	21	U.S
1995	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	70	1	U.S
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	49	2	U.S
1996	Cyclospora	Frambuesa	978	20	C.A
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	Sidra de manzana	71	3	U.S
1997	Virus hepatitis A	Fresas congeladas			U.S

<sup>a</sup> Centroamérica; <sup>b</sup> Estados Unidos; <sup>c</sup> Desconocida.  
(Tauxe, 1997; Altekruze y col., 1997)

La mayoría de los carbohidratos son compuesto complejos, difíciles de degradar; los azúcares sencillos, como glucosa, fructuosa, y sacarosa comprenden sólo el 0.5% del fruto (Salunkhe y Kadam, 1995).

El aguacate posee mayor cantidad de proteínas que otros frutos, pero menos que alimentos como la leche y la carne (Tabla 10), en los cuales una gran variedad de microorganismos son capaces de crecer. Aunque la humedad es alta (cerca del 70%) el tipo y la cantidad de nutrientes podrían limitar el desarrollo de los microorganismos.

Existen varios estudios donde se ha observado un efecto antimicrobiano del jugo o la pulpa de zanahoria contra *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 (Abdul-Raouf y col., 1993; Beauchat y Doyle, 1995). La pulpa de aguacate no se exime de la posibilidad de contener compuestos antimicrobianos constitutivos.

El gran vacío de información que existe limita seriamente la identificación y evaluación de riesgos microbianos en los alimentos. Con la información disponible en este momento es difícil establecer en que términos el guacamole representa un riesgo a la salud. Este trabajo pretende generar la información para tal propósito; en la Figura 3 se ilustran las preguntas a las que se pretende dar respuesta.

#### **2.4 Microorganismos patógenos de interés**

Según la fuente de contaminación, podemos clasificar a los microorganismos patógenos potencialmente presentes en el guacamole en tres grupos:

- a) Microorganismos provenientes de la tierra: *C. botulinum*, *C. perfringens*, *B. cereus*, y *L. monocytogenes*.
- b) Microorganismos de origen fecal humana o animal: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *Vibrio cholerae*, entre otros.

Tabla 10. Composición química del aguacate y otros alimentos

Alimento	Agua	Proteínas	Grasa	Carbohidratos	Minerales
Carne de res	61.3	18.3	19.8	0.0	0.9
Leche	87.9	3.3	3.3	4.7	0.7
<b>Aguacate</b>	<b>74.0</b>	<b>1.6</b>	<b>13.5</b>	<b>7.6</b>	<b>1.3</b>
Naranja (jugo)	88.5	0.7	0.2	10.4	0.2
Melón	91.6	0.7	0.3	6.6	0.8
Papaya	88.8	0.6	0.1	9.8	0.7
Brócoli	89.1	3.6	0.3	5.9(1.5)	1.1
Lechuga	96.0	1.0	0.3	2.7	

(Modificado de Zubiran, 1992. Instituto Nacional de la Nutrición)

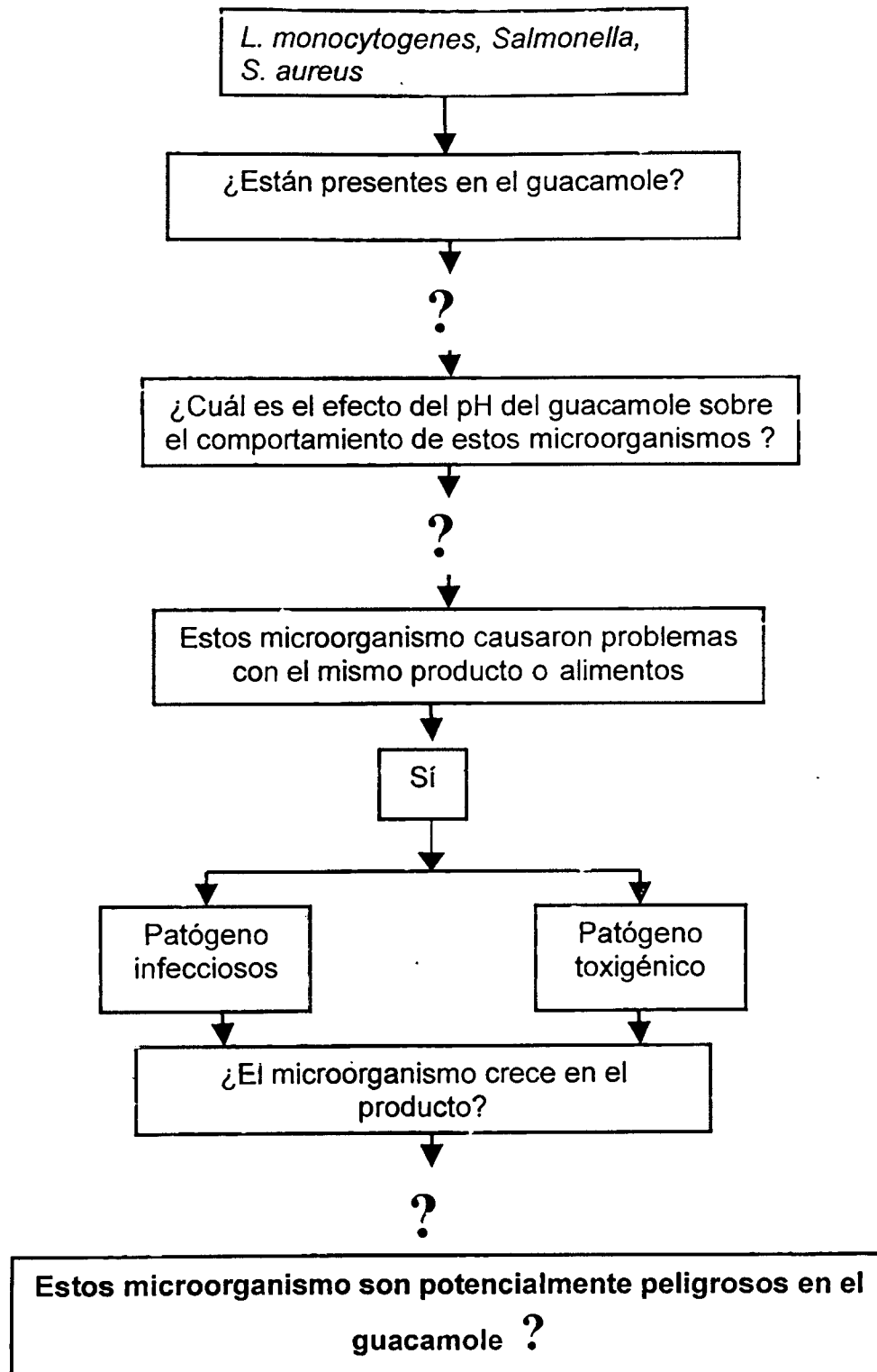


Figura 3. Preguntas a las que se pretende dar respuesta con el presente trabajo.



- c) Microorganismos de origen humano: Muchos de ellos se engloban en el inciso anterior; además de éstos se puede mencionar a *L. monocytogenes*, *S. typhi* y *S. aureus*.

En el contexto delineado, y con el propósito de lograr la mayor representatividad y en función de su importancia epidemiológica; se seleccionaron cuatro microorganismos: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7.

#### **2.4.1 *Salmonella* sp.**

##### **A.- Características generales.**

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo, usualmente móvil y facultativamente anaerobio. Es un microorganismo patógeno para el hombre y su hábitat natural es el tracto intestinal de humanos y muchos animales (Manual de Bergey, 1984). *Salmonella* crece a temperaturas entre 5 y 49.5°C; con óptima entre 35 y 37°C (Doyle y Cliver, 1990a). El proceso de congelación afecta en gran medida la viabilidad de *Salmonella*; un ciclo de congelación - descongelación disminuye cerca de 1-2 log<sub>10</sub> una población del patógeno (Doyle y Cliver, 1990a). El almacenamiento en congelación disminuye lentamente el número de este microorganismo, pero no se puede garantizar su completa eliminación de un alimento por este proceso. El microorganismo desarrolla a valores de pH entre 3.8 y 9.5; aunque el valor mínimo de crecimiento está afectado por el ácido que se utilice (ICMSF, 1996a).

La actividad de agua (Aa) influye de manera importante sobre el crecimiento de *Salmonella*; el límite inferior es de 0.94. Puede sobrevivir por un año o más en alimentos con Aa menor, como chocolate, mantequilla de cacahuete o gelatina; en las heces puede permanecer viable por años fuera del hospedero (ICMSF, 1996a).

*Salmonella* es un germen muy dinámico y tiene la capacidad de crecer en diversos alimentos. En carne de res rebanada y almacenada a 30°C, inicia su crecimiento después de 1.8 h de ser inoculada y tiene un tiempo de generación de tan solo 0.56 horas (Mackey y Karridge, 1988). En vegetales; como lechuga, rábano, col, betabel, zanahorias, espinacas y tomates sobrevive más de 28 días a 2-4°C; y cerca de la mitad de ese período a temperatura ambiente (Felsenfeld y

Young, 1945). Estas características favorecen su permanencia en el ambiente y en los alimentos, así como su presencia en altos números en ciertos alimentos.

## **B.- Patogenicidad**

Todas las especies conocidas de *Salmonella* se consideran patógenas para el hombre, pero el grado de virulencia varía entre ellas (Doyle y Cliver, 1990a).

Existen tres síndromes causados por diferentes tipos de *Salmonella* (Doyle y Cliver, 1990a):

1.- Fiebre tifoidea: Es el síndrome más severo y es causado por *S. typhi*. Una vez que el microorganismo ha sido ingerido y alcanza el intestino delgado, penetra la mucosa intestinal y entra al sistema linfático; ahí es atrapado por fagocitos, y dentro de ellos se multiplica. Después la bacteria pasa al torrente sanguíneo, se disemina por todo el organismo e infecta órganos vitales produciendo una infección sistémica.

El hombre es el único reservorio de *S. typhi*; puede llegar al agua o los alimentos por contaminación directa de un manipulador o indirectamente a través de ingredientes crudos contaminados.

2.- Fiebre entérica: *S. paratyphi* A, B y C son los principales agentes de la fiebre entérica. Esta enfermedad es muy similar a la fiebre tifoidea, pero menos severa. Los microorganismos implicados también tienen origen humano, y los alimentos que se han asociados a la fiebre entérica y a la fiebre tifoidea son similares.

3.- Gastroenteritis: Es el tipo de salmonelosis más común en todo el mundo y es causada por el resto de serotipos de *Salmonella*. Actualmente se conocen 2300 serotipos, aunque sólo 150 se han asociado con enfermedad humana; todos se consideran patógenos al hombre (Doyle y Cliver, 1990a). En este tipo de salmonelosis también puede presentarse septicemia, aunque con mucha menor frecuencia. En este caso el microorganismo se multiplica en el intestino (Doyle y Cliver, 1990a). Los síntomas incluyen diarrea, náusea, dolor abdominal, fiebre y escalofrío (ICMSF, 1996a).

La dosis infectante de *Salmonella* de acuerdo al manual de Bergey es de  $10^8$  a  $10^9$  células; sin embargo en varios brotes se han encontrado dosis

infectantes mucho menores, hasta de 50 células, como ocurrió en un brote cuyo vehículo fue chocolate (Greenwood y Hopper, 1983). Existen varios factores que influyen sobre la dosis infectante, entre ellos: el tipo de alimento, la cepa de *Salmonella*, la susceptibilidad individual y el contenido del estómago (Doyle y Cliver, 1990a).

### C.- Epidemiología

El consumo de alimentos y agua contaminados es la principal causa de infección por *Salmonella*. Los alimentos de origen animal, como pollo, huevo, leche, carne de res y de puerco son vehículos muy frecuentes de este microorganismo (Bean y col., 1997). Otros alimentos que han sido implicados en brotes de salmonelosis son: chocolate, salsa de soya, pimienta blanca, sandía, cidra y colorante carmín; probablemente contaminados por alguna fuente animal (ICMSF, 1996a).

La susceptibilidad a las infecciones por *Salmonella* es mayor en lactantes, cerca del 40% de los casos de salmonelosis reportados se presentan en niños menores de 5 años (Doyle y Cliver, 1990a).

En Estados Unidos durante el período 1988-1992, *Salmonella* causó el 69% de los brotes por causa bacteriana, y 54.8% del total de brotes de causa conocida (Bean y col., 1997). En los últimos años se ha presentado un aumento en el número de brotes de salmonelosis en Inglaterra y Gales, en Estados Unidos, Canadá y Europa, especialmente por *Salmonella enteritidis* (Sockett, 1991; Bean y col., 1997). Se han hecho estimaciones de los costos asociados a la salmonelosis. Roberts calculó 1.4 mil millones de dólares para 1987 en Estados Unidos, considerando solamente gastos médicos, pérdida en productividad y muertes, siendo las muertes el componente más costoso (Roberts, 1988). Esta cantidad representa el 29.2 % de los costos calculados para las ETAs de origen bacteriano. En 1977, en Alemania Occidental se estimó en 108 150 mil de DM los costos de las infecciones causadas por *Salmonella*; En Canadá para el mismo año se calcularon 83 651 mil dólares canadienses (Sockett, 1991).

Aunque los alimentos de origen animal son los principales vehículos de este microorganismo, en Estados Unidos (1990-1997) se presentaron varios

brotos que involucraron productos crudos; entre ellos melón, jitomates, germinado de alfalfa y jugo de naranja (Tauxe, 1997). El aumento en el consumo de productos crudos, aunado al uso de estiércol y de aguas negras sin tratar para fertilizar y regar los campos de cultivo, ha incrementado el número de brotes asociados a productos crudos en los últimos años (Beuchat y Ryu, 1997).

#### **D.- Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos se utilizan métodos diferentes a los usados para especímenes clínicos. Esto se debe a que en los alimentos el microorganismo se encuentra en bajos números y frecuentemente con daño fisiológico. El microorganismo en los alimentos puede estar expuesto a condiciones adversas durante el procesamiento y el almacenamiento, así como verse afectado por la actividad de otros gérmenes (Flowers y col., 1992).

Como primer paso del aislamiento y para recuperar las células debilitadas o dañadas se realiza un preenriquecimiento. Se utiliza un medio rico en nutrientes, no selectivo, como caldo soya tripticasa, caldo nutritivo, caldo lactosado, y para productos lácteos se recomienda leche en polvo descremada reconstituida (Doyle y Cliver, 1990a). El preenriquecimiento permite el desarrollo de todos los gérmenes presentes en el alimento, incluyendo *Salmonella*.

La segunda etapa es un enriquecimiento selectivo en un medio que permite el desarrollo del patógeno, pero reprime el de otros microorganismos. Los medios comúnmente usados son caldo selenito cistina y caldo tetraciónato. Existe una gran variedad de modificaciones del caldo tetraciónato, y la más recomendada es el caldo tetraciónato adicionado de verde brillante. El caldo tetraciónato de Mueller modificado por Kauffman es muy utilizado ampliamente en Europa (Flowers y col., 1992). Algunos alimentos crudos o altamente contaminados pueden ser enriquecidos directamente, sin un preenriquecimiento previo; para evitar que el desarrollo de la flora asociada limite el del patógeno.

La temperatura de incubación afecta la eficacia de los medios de enriquecimiento; se ha observado un incremento en la recuperación del microorganismo cuando los caldos se incuban a 43°C. Se ha obtenido recuperación máxima de *Salmonella* a partir de pollo y productos de puerco,

usando caldo selenito cistina incubado a 35°C y caldo tetrionato incubado a 43°C (Bailey y col. 1988).

Posterior al enriquecimiento se realiza el aislamiento en medios sólidos; se utilizan medios selectivos que contienen colorantes, sales biliares y otros agentes selectivos que inhiben el crecimiento de la flora asociada. Además de ser selectivos, estos medios son diferenciales: evidencian características bioquímicas de *Salmonella*, como la utilización o la no utilización de carbohidratos y la formación de ácido sulfhídrico. Entre los medios más utilizados se encuentra el agar verde brillante con o sin sulfadiazina, sulfito bismuto, *Salmonella-Shigella*, MacConkey, DCLS, XLD, y Hektoen. La selectividad varía entre estos medios, y se recomienda el uso de dos o más de ellos para cada muestra. La incubación se realiza generalmente a 35°C.

Después de aislar colonias sospechosas de *Salmonella* de los medios sólidos, se utilizan generalmente dos pruebas diferenciales:

- TSI: (Agar triple azúcar hierro) Evidencia la producción de H<sub>2</sub>S y la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa.
- LIA: (Agar lisina hierro) Permite observar la producción de H<sub>2</sub>S y la descarboxilación de la lisina.

Se utilizan otras pruebas bioquímicas adicionales como la producción de ureasa, indol, y el crecimiento en KCN para la identificación presuntiva de *Salmonella*; las reacciones características de *Salmonella* a estas y otras pruebas se presentan en la Tabla 11. La confirmación de la identidad del microorganismo se realiza mediante pruebas serológicas usando antisueros específicos.

Tabla 11. Identificación bioquímica de *Salmonella*.

	<i>Salmonella I</i>	<i>Salmonella II</i>	<i>Salmonella III</i>	<i>Salmonella IV</i>	<i>Salmonella choleresuis</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Salmonella pollorum</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	+	+	-*	-	-	-	-
Sulfuro de hidrógeno/ TSI	+	+	+	+	V	+	-	+	+
Ureasa de Christensen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Crecimiento en KCN	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido a partir de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas a partir de glucosa	+	+	+	+	+	-	+	+*	-
Lactosa	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	+	+	-	-

+ 90-100% de las cepas positivas

+\* 76-89% de las cepas positivas

-\* 11-25% de las cepas positivas

- 0-10% de las cepas positivas

Modificado de Manual Bergy, 1984.

## 2.4.2 *Listeria monocytogenes*

### A.- Características generales

*Listeria monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, no esporulado y móvil a temperaturas entre 20-25°C (Manual de Bergy, 1984). Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza; se ha encontrado frecuentemente en plantas, suelo y agua (Weis y Seeliger, 1975). *L. monocytogenes* se ha aislado de 42 especies de mamíferos, 22 especies de pájaros, peces, crustáceos e insectos; que incluyen una diversidad de animales domésticos (NACMCF, 1991). A principios de los 80's este microorganismo fue reconocido como un patógeno capaz de ser transmitido al hombre por los alimentos (Schuchat y col., 1991). Previamente la listeriosis se consideraba una enfermedad transmitida exclusivamente por contacto directo con animales enfermos o sus excretas. *L. monocytogenes* ha causado diversos brotes de ETA's con una letalidad sobresaliente, hasta del 33.8%; por ello ha recibido gran atención de las autoridades sanitarias en varios países, investigadores, e industriales.

*L. monocytogenes* tiene características que le permiten sobrevivir o crecer en una gran variedad de condiciones y alimentos:

- Es un microorganismo psicrótrofo, es decir desarrolla a temperaturas de refrigeración; es capaz de crecer a 1.1°C (Juntilla y col., 1988).
- Tiene la capacidad de sobrevivir varias semanas a -18°C en diversos alimentos (ICMSF, 1996).
- Crece en actividades de agua hasta de 0.90, 0.92 y 0.93 cuando se usa glicerol, NaCl o sacarosa respectivamente, para ajustarla (Farber y col., 1992; Miller, 1992).

- Sobrevive periodos largos en condiciones de baja humedad, permanece 40 días a 25°C en alimentos marinos con 2.00-2.35% de humedad (Sikes, 1989).
- Es buen competidor con flora propia de la tierra cuando las condiciones son favorables, por lo que bajos niveles de *L. monocytogenes* son suficientes para que se establezca en este hábitat, al menos 30 días (Dowe y col., 1997).

Se han observado tiempos de generación similares bajo condiciones de aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis. Altos niveles de CO<sub>2</sub> inhiben su crecimiento sólo a bajas temperaturas (ICMSF, 1996).

Estas características hacen de *L. monocytogenes* un microorganismo muy versátil y explica la diversidad de vehículos que se ven involucrados en los brotes de listeriosis

### **B.- Patogenicidad**

La listeriosis es la enfermedad producida por *L. monocytogenes*. Se caracteriza por la formación de masas de tejido inflamado, constituidas por numerosas pequeñas lesiones. También se presenta supuración del tejido infectado y necrosis focal. Esta enfermedad tiene muchas manifestaciones clínicas, dependiendo del tejido que ha sido infectado (Marth, 1988).

La mayoría de las personas que han sido infectadas por *L. monocytogenes* presentaban disminuida su inmunidad mediada por células T (Lorber, 1990). Los neonatos, personas mayores de 60 años, pacientes con cáncer u otras enfermedades crónicas, mujeres embarazadas e inmunodeprimidos, especialmente aquellos que reciben corticosteroides, son los principales afectados por este microorganismo. Otros factores que se han asociado a la listeriosis son: disfunción del bazo, administración de antiácidos o cimetidina y enfermedad del hígado (NACMCF, 1991). En el brote de listeriosis causado por queso panela en 1985, sólo uno de los 49 casos no presentó factores de riesgo conocidos (Linnan y col., 1988).

La listeriosis en mujeres embarazadas se manifiesta por fiebre, dolor de cabeza, y escalofríos; es decir, síntomas semejantes a un resfriado, por lo que



suele pasar inadvertida por la paciente. Al estar infectada la madre, por vía transplacentaria se infecta el feto y puede producirse aborto. La listeriosis en recién nacidos generalmente involucra varios órganos, como hígado, bazo, esófago, pulmón, amígdalas, glándulas adrenales, corazón, timo, y músculos esqueléticos (Marth, 1988). *L. monocytogenes* puede causar meningitis, meningoencefalitis y septicemia; generalmente se presentan en recién nacidos o en personas mayores de 50 años y son enfermedades comúnmente fulminantes.

Existe también listeriosis cutánea, la cual ocurre principalmente en personas como veterinarios y granjeros que tienen contacto directo con tejidos de animales infectados (Marth, 1988).

*L. monocytogenes* tiene la capacidad de invadir y crecer en una gran variedad de células de mamíferos, entre ellas macrófagos, células epiteliales y fibroblastos (Bubert y col, 1992); lo que ayuda a explicar la diversidad de síndromes que causa.

El mecanismo por el cual este microorganismo causa enfermedad todavía no se conoce bien. Se sugiere que el tracto intestinal es la principal vía de entrada del patógeno (Gaillard y col, 1987).

*L. monocytogenes* requiere sobrevivir a la acidez del estómago, penetrar la pared intestinal y multiplicarse en el hospedero para producir la enfermedad. Existen evidencias de que este microorganismo se multiplica en las células epiteliales del intestino (Racz y col., 1972). Sin embargo, MacDonald y Carter (1991) sugieren que el microorganismo cruza la barrera intestinal por las células M y después de ser fagocitado por macrófagos, se multiplica en ellos. Finalmente se presenta la lisis de los macrófagos y el microorganismo atraviesa el epitelio capilar y llega a los diferentes órganos que infecta (Ryser y Marth, 1991).

Se sabe que este microorganismo produce una toxina hemolítica (listeriosina), una fosfolipasa C fosfatidol específica y una lecitinasa, que le permiten formar un poro en la membrana de la vacuola fagocítica de la célula huésped. Una vez en el citoplasma, la bacteria se multiplica y se mueve a lo largo de los filamentos de actina hasta llegar a la membrana de la célula; ahí induce a una célula vecina para que la fagocite (Figura 4). De esta forma *L. monocytogenes* se va diseminando por células vecinas (Hof y col., 1994).

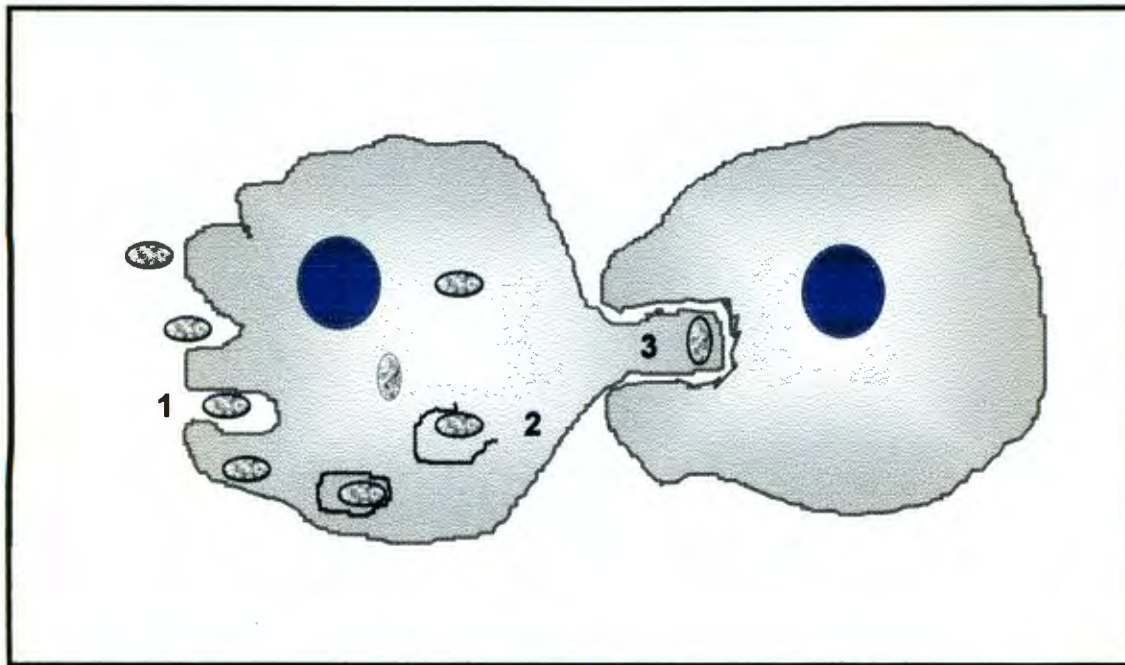
### C.- Epidemiología

*L. monocytogenes* causa menos del 1% de los brotes de ETAs con etiología conocida en Estados Unidos. Su importancia radica en la letalidad de la enfermedad que causa, la listeriosis. En Estados Unidos en el período entre 1973 y 1987, fue responsable del 28.3% de las muertes por causa bacteriana entre las ETAs (Bean y Griffin, 1990).

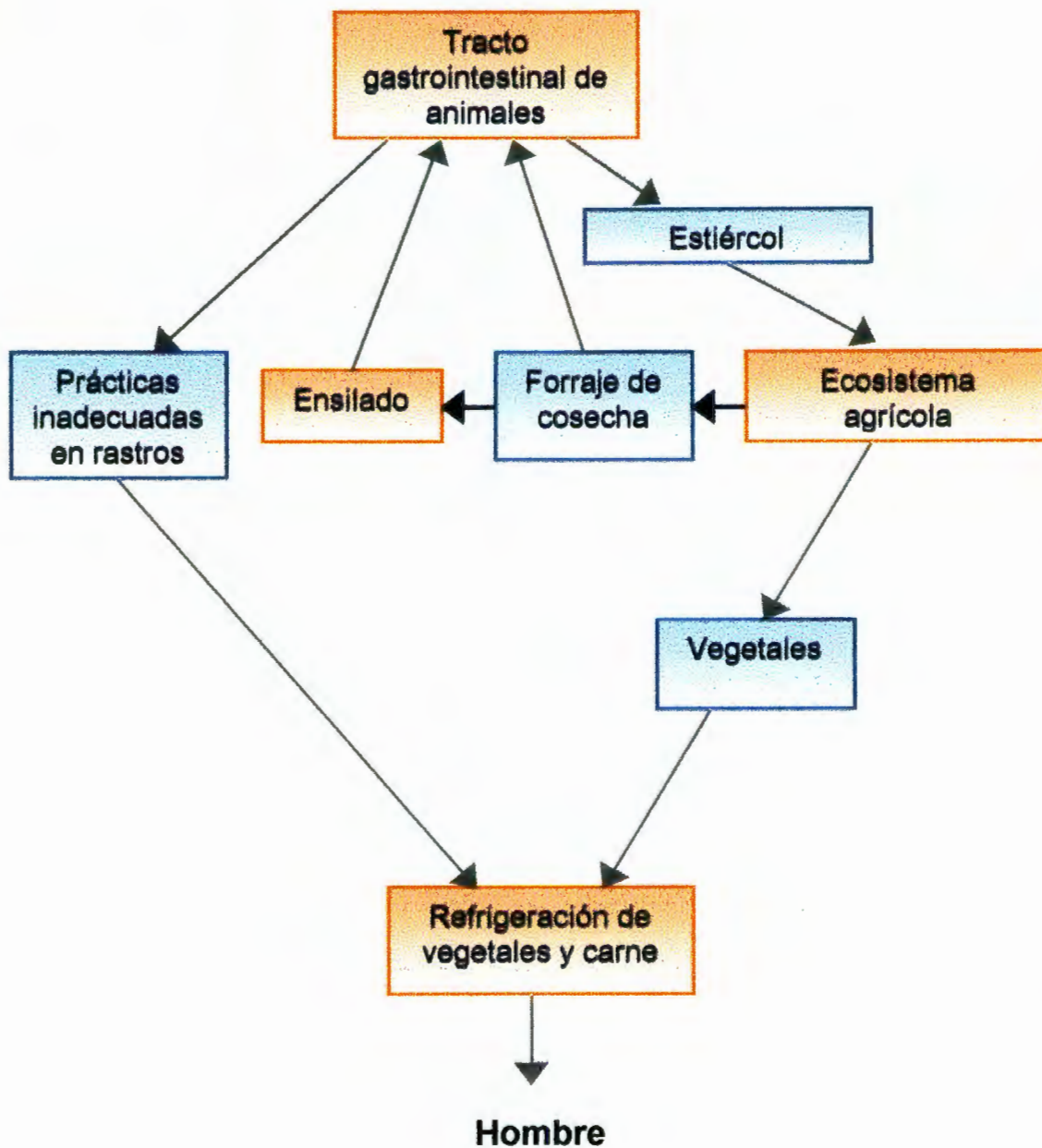
Varios productos lácteos han sido involucrados en brotes causados por *L. monocytogenes*: leche pasteurizada, queso panela y helado de crema, entre otros. Algunos productos cárnicos se han relacionado con casos de listeriosis en Suiza, Holanda, Canada, Italia y Estados Unidos (Ryser y Marth, 1991). También ciertas verduras han sido vehículos en brotes de listeriosis, como repollo, apio, tomates, y lechuga (Ho y col., 1986; Schlech y col., 1983).

En el brote más grande que se conoce de listeriosis causado por queso panela se estimó que el alimento contenía entre  $10^3$  y  $10^4$  células del patógeno por gramo. Sin embargo en helado de crema que se asoció a un brote se encontraron  $<10$  ufc/g (NACMCF, 1991). La dosis mínima infectante es difícil de calcular, ya que la población susceptible a este microorganismo presenta condiciones muy particulares.

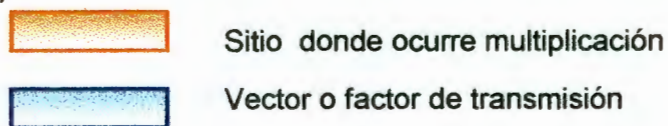
Se sugiere que el hábitat primario de *L. monocytogenes* es el suelo y la vegetación en descomposición (Ryser y Marth, 1991). Este microorganismo se ha aislado de materia fecal de animales enfermos y sanos, tales como cabras, corderos, cerdos, pollos y pavos, entre otros. Van Renterghem y col. (1991) proponen que la materia fecal de los animales contamina la tierra; de ésta pasa a los alimentos de los animales y a los vegetales para consumo humano, constituyéndose un ciclo como se ilustra en la Figura 5.



**Figura 4.** Mecanismo de invasión de *L. monocytogenes* a una célula huésped. 1. *L. monocytogenes* es fagocitada por la célula. 2. Dentro de la vacuola fagocítica el ambiente es ácido y se estimula la producción y liberación de listeriosina; también se produce una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol y una lecitinasa que lisan la membrana del fagosoma permitiendo la liberación de la bacteria al citoplasma. 3. En el citoplasma puede crecer e inducir que la célula vecina la fagocite y seguir multiplicándose (Hof y col., 1994).



**Figura 5.** Ecología de *L. monocytogenes* en el sistema agrícola (Van Renterghem y col., 1991).



#### D.- Aislamiento e identificación.

Aunque *L. monocytogenes* crece bien en medios de cultivo comunes, se requieren medios especiales para su aislamiento a partir de alimentos; principalmente por que la flora asociada por lo general se encuentra en mayor proporción que el patógeno.

Existen más de 60 caldos de enriquecimiento y un número semejante de medios sólidos para el aislamiento del microorganismo (Ryser y Marth, 1991). Los procedimientos adoptados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), son los más utilizados en la actualidad.

Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se aprovechan algunas características propias del germen, como su capacidad para crecer en medios con alto contenido de NaCl (hasta 10%) y utilizar esculina. Se han utilizado diferentes agentes para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, principalmente Gram-negativos y hongos; los más comunes son el ácido nalidíxico, acriflavina, cloheximida, colistina, cloruro de litio, moxalactamo, tiocianato de potasio, y feniletanol (Ryser y Marth, 1991).

Para la diferenciación de *Listeria* de otros géneros, se utilizan de rutina las pruebas de movilidad, requerimientos de oxígeno, crecimiento a 35°, producción de catalasa, producción de H<sub>2</sub>S, formación de ácido a partir de glucosa y la reacción al Gram (Tabla 12).

Para la diferenciación de especies se realizan las pruebas que se muestran en la Tabla 13. Existen tres especies del género *Listeria* que producen β-hemólisis, pero de ellas, sólo *L. monocytogenes* produce ácido a partir de ramnosa y es positiva a la prueba de CAMP con *S. aureus*.

No todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas; la producción de β-hemólisis se ha asociado con la patogenicidad, sin embargo se han encontrado algunas cepas β-hemolíticas, no patógenas. Por ello es importante realizar ensayos

Tabla 12. Características diferenciales de *Listeria* y otros generos.<sup>1</sup>

Género	Movilidad	Requerimientos de oxígeno	Crecimiento a 35°C	Catalasa	H <sub>2</sub> S	Ácido a partir de glucosa
<i>Brochothrix</i>	-	Faculattivo	-	+ <sup>5</sup>	-	+
<i>Erysipelothrix</i>	-	Faculattivo	+	-	-	+
<i>Listeria</i>	+ <sup>2</sup>	Faculattivo	+	+	-	+
<i>Lactobacillus</i>	- <sup>3</sup>	Faculattivo	+	- <sup>6</sup>	-	+
<i>Kurthia</i>	+ <sup>4</sup>	Aerobio	+	+	- <sup>7</sup>	-

(Modificado de Manual de Bergy, 1984)

<sup>1</sup> Símbolos estándar: +, 90% o más de las cepas son positivas; -, 90% o más de las cepas son negativas.

<sup>2</sup> Todas las cepas son móviles a 20-25°C, ligeramente o inmóviles a 37°C.

<sup>3</sup> La mayoría de las cepas son inmóviles, pero existen algunas cepas móviles.

<sup>4</sup> La mayoría de las cepas son móviles, pero existen cepas inmóviles.

<sup>5</sup> La producción de catalasa depende del medio y de la temperatura de incubación.

<sup>6</sup> Algunas cepas producen catalasa.

<sup>7</sup> Algunas cepas producen H<sub>2</sub>S en pequeñas cantidades.

Tabla 13. Características diferenciales del género *Listeria* y *L. grayi*, *L. murrayi* y *L. denitrificans*.

Especies	$\beta$ - hemólisis	Producción de ácido a partir de			CAMP		Patogenicidad (ratón)
		Manitol	Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	V	-	-	-	-
<i>L. denitrificans</i>	-	-	-	+	-	-	+?

+ 90% de las cepas o más son positivas

- 90% de las cepas o más son negativas

V 11-89% de las cepas son positivas

(Modificado de Manual Bergy; Ryser y Marth, 1991)

biológicos, como la prueba de patogenicidad al ratón; esta prueba es la más utilizada actualmente y consiste en inocular por vía intraperitoneal  $\sim 10^9$  células viables de *L. monocytogenes*/ ratón, a cinco ratones de 16 a 18 g. Dentro de 7 días los ratones inoculados con cepas patógenas mueren (Ryser y Marth, 1991). Otros ensayos biológicos utilizan conejos, cobayos, o embriones de pollo (Ryser y Marth, 1991).

La serotipificación de *L. monocytogenes* también es importante; ya que 3 de los 13 serotipos que se conocen han sido responsables del 95% de los casos de listeriosis humana: 4b, 1/2b, y 1/2a (Gellin y Broome, 1989).

### **2.4.3 *Staphylococcus aureus***

#### **A.- Características generales**

*S. aureus* es un coco Gram positivo que forma grupos tridimensionales de células al reproducirse, produce catalasa y es anaerobio facultativo (ICMSF, 1996). Desde el punto de vista sanitario *S. aureus* es la única especie importante de las 30 que conforman el género (Manual Bergy). Este microorganismo produce un conjunto de enterotoxinas que causan efectos nocivos en el hombre y algunos animales. Una de las principales fuentes de contaminación de *S. aureus* a los alimentos es el hombre. Se encuentra frecuentemente infectando heridas, o colonizando la mucosa nasal y faríngea de individuos sanos. Este microorganismo presenta algunas características que le permiten sobrevivir y crecer en diversos alimentos:

- Crece desde 6.5 hasta 50°C, aunque la producción de las toxinas tiene como temperatura mínima 10°C (ICMSF, 1996c).
- Usualmente crece en concentraciones de 15% de cloruro de sodio (Halpin-Dohnalek y Marth, 1989). Por esto, alimentos con altas concentraciones de sal que resultan inhibitorios para otros microorganismos, son buenos sustratos para *S. aureus*. Bajo óptimas condiciones de otros factores crece hasta en 25% de NaCl (ICMSF, 1996c).
- El intervalo de pH en el que crece es 4-10. Para producir la toxina requiere entre 4.5 y 9.6 en condiciones aerobias: en anaerobiosis, el pH



mínimo se eleva hasta 5.0. El crecimiento a un determinado pH también depende del ácido empleado (ICMSF, 1980).

- Es capaz de multiplicarse a Aa tan bajas como 0.83, pero las toxinas no se producen en Aa menores a 0.87 (ICMSF, 1996c).
- En aerobiosis se produce 10 veces más enterotoxina B que en una atmósfera que contiene 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono (Carpenter y Silverman, 1974).
- *S. aureus* se inactiva fácilmente por radiaciones ionizantes; las toxinas no se destruyen con las dosis de radiación gamma utilizadas para alimentos (ICMSF, 1996c).
- En la destrucción de este microorganismo con calor, sucede algo similar que con la radiación; *S. aureus* se destruye con la pasteurización, mientras que las toxinas pueden resistir la esterilización que se aplica a los alimentos enlatados de baja acidez (ICMSF, 1996).
- *S. aureus* no se considera un buen competidor; sin embargo, la inhibición del crecimiento debido a la actividad de otros microorganismos es variable; depende del tipo y número de dichos competidores (ICMSF, 1996c). La actividad de algunas bacterias puede, incluso estimular el crecimiento de *S. aureus* e incrementar la cantidad de enterotoxina producida (Halpin-Dohnalek y Marth, 1989).
- Este microorganismo es relativamente resistente al secado y sobrevive bien en la mayoría de las condiciones ambientales; por lo que puede persistir por algún tiempo en áreas de producción de alimentos y convertirlas en fuentes de contaminación (ICMSF, 1996c).

## B.- Patogénesis

Las toxinas producidas por *S. aureus* son los verdaderos agentes etiológicos de la intoxicación estafilocócica. Estas toxinas son proteínas globulares de una sola cadena, solubles en agua, con peso molecular entre 26,000 y 29,000 daltons. Son resistentes a proteasas como pepsina y tripsina, lo que evita que sean hidrolizadas en su paso por el tracto digestivo (Bergdoll, 1990). Son toxinas termoestables que requieren un tratamiento de 100°C por 30 minutos para destruirlas. Las toxinas se han dividido en serotipos: A, B, C, D, E, y H; esta última recientemente descubierta (Bergdoll, 1990; ¿?). Estas toxinas se consideran enterotoxinas porque el sitio donde actúan es el tracto gastrointestinal; sin embargo su acción es sobre receptores nerviosos que transmiten los impulsos hasta el centro del vómito en el cerebro, por medio de nervios simpáticos aferentes y del nervio vago (Halpin-Dohnalek y Marth, 1989).

Se estima que 1µg a 100ng de toxina son suficientes para causar la enfermedad. En un brote debido a leche con chocolate en niños en edad escolar, considerados como población sensible, se estimó en 100 a 200 ng la dosis ingerida (Bergdoll, 1990). Se ha visto que ingestas repetidas del mismo tipo de toxina incrementa la tolerancia en animales (ICMSF, 1996c).

Los síntomas de la enfermedad se presentan entre 1 y 7 horas después de la ingestión del alimento con toxinas. Los síntomas más comunes son náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea; en algunos casos se presenta dolor de cabeza y colapso. La recuperación es rápida generalmente en 24 h, sin embargo por la pérdida de líquidos puede requerirse hospitalización (ICMSF, 1996c).

Experimentos en animales muestran que el crecimiento de *S. aureus* en el tracto intestinal o la inyección de toxina purificada puede producir enteritis. No se conoce como se produce la diarrea, ya que estas toxinas no causan acumulación de fluidos en asa ligada de conejos (Bergdoll, 1990).

### C.- Epidemiología.

*S. aureus* se encuentra colonizando la mucosa y la piel de la mayoría de los animales de sangre caliente; sin embargo, como es un competidor pobre, pocas veces causa intoxicación alimentaria por alimentos crudos. La excepción es la leche proveniente de vacas con mastitis causada por este microorganismo; donde se encuentra en cantidades importantes, y por tanto en mayor proporción que cualquier microorganismo que contamine la leche.

En la mayoría de los brotes de intoxicación estafilocócica se presentan dos factores decisivos: existe un portador que contamina el alimento y ese alimento se conserva en condiciones de abuso de temperatura.

Los alimentos implicados en brotes de intoxicación estafilocócica incluyen carnes rojas, especialmente carnes procesadas, pollo, ensaladas de pollo y papa, pasteles rellenos de crema, mariscos, y productos lácteos (Halpin-Donnalek y Marth, 1989; Lancette y Tatini, 1992). Productos como salami y quesos que han sido fermentados incorrectamente pueden permitir el desarrollo de *S. aureus* y la formación de las toxinas (Gilmour y Harvey, 1990, in ICMSF, 1996).

En Estados Unidos la intoxicación por *S. aureus* en 1981 fue la causa del 17.6% de las ETAs de origen bacteriano (Bergdoil, 1990). Aunque su incidencia tiende a disminuir, sigue ocupando un renglón importante entre las ETAs en ese país.

La mayoría de los brotes de intoxicación estafilocócica involucran números pequeños de personas. Sin embargo también se han presentado grandes brotes, como el que ocurrió en Japón y afectó a 1500 personas; o el que se presentó en Indiana, Estados Unidos a 1300 personas que asistieron a un día de campo (Bergdoil, 1990). La mayor parte de los brotes causados por *S. aureus* involucran toxinas del tipo A y D. Estas dos toxinas se producen en intervalos de pH, Aa y Eh más amplios que las toxinas B y C.

#### D.- Aislamiento e identificación

El recuento directo en placa es uno de los métodos más utilizados para el aislamiento y enumeración de *S. aureus*. Puede realizarse por extensión en superficie, por la técnica de Miles y Misra, o por vaciado en placa. En las dos primeras técnicas se puede apreciar la morfología colonial de *S. aureus* y diferenciarlo de otros microorganismos. En la técnica de vaciado en placa la ventaja es que la cantidad de alimento analizada es mayor. Existen varios medios selectivos y diferenciales para *S. aureus*, pero el más común es el agar Baird-Parker (ICMSF, 1978). Este medio contiene telurito de potasio, glicina y cloruro de litio como agentes selectivos, vema de huevo y piruvato para recuperar las células dañadas. *S. aureus* reduce el telurito e hidroliza la lecitina y la lipovitelenina de la yema de huevo, por lo que las colonias aparecen negras con una zona opaca y/o un halo claro en su rededor (ICMSF, 1996c). El recuento de *S. aureus* también puede realizarse por la técnica de número más probable (NMP); en esta técnica pueden utilizarse medios selectivos y no selectivos. El enriquecimiento no selectivo es útil para recuperar células dañadas (Lancette y Tatini, 1992).

Para la identificación de *S. aureus* se utilizan las pruebas de catalasa, reacción al Gram, morfología celular, coagulasa y termonucleasa. La coagulasa es una enzima soluble que coagula el plasma, al actuar sobre el fibrinógeno en presencia de un factor existente en la sangre de varias especies, entre ellas el humano (Bergdoll, 1990). La termonucleasa es una fosfodiesterasa termoestable que hidroliza el ADN o ARN. Estas dos enzimas son producidas por más del 90% de las cepas de *S. aureus* (Bergdoll, 1990).

La ausencia o la presencia en bajos números de *S. aureus* en un alimento no implica la ausencia de las toxinas. Pueden aplicarse tratamientos al alimento que disminuyan o eliminen a los microorganismos, pero que no sean suficientes para inactivar las enterotoxinas (Lancette y Tatini, 1992). Por ello en algunos casos es necesario evidenciar y cuantificar las toxinas en los alimentos.

Todos los métodos para detectar las enterotoxinas de *S. aureus* utilizan anticuerpos específicos (Bergdoll, 1990). Los más comunes se basan en la difusión en un gel del anticuerpo y la toxina proveniente del alimento. Existen otros métodos, como el radioinmunoensayo, que emplea enterotoxina marcada con  $I^{125}$ .

En el método de ELISA, la toxina en el alimento se cuantifica indirectamente midiendo la actividad de una enzima ligada a un anticuerpo específico contra la toxina. La aglutinación pasiva en latex utiliza anticuerpos adheridos a partículas de latex, que permiten apreciar a simple vista la reacción entre el anticuerpo y la toxina (Bergdoll, 1990). Como la cantidad estimada de enterotoxina necesaria para causar enfermedad es muy pequeña (1µg a 100ng), se requiere un proceso de extracción y concentración antes de realizar las pruebas de detección.

#### **2.4.4 *Escherichia coli* O157:H7.**

##### **A.- Características generales**

*E. coli* es un bacilo no esporulado, Gram negativo, anaerobio facultativo, generalmente móvil y la mayoría de las cepas fermentadoras de lactosa. Se considera como parte de la flora normal del intestino del hombre y de la mayoría de los animales de sangre caliente (Doyle y Cliver, 1990c). La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, pero algunas son capaces de causar enfermedad. Se reconocen 6 grupos de *E. coli* patógenas enterotoxigénica, enteropatógena, enteroinvasiva, enteroagregativa, difusamente adherente, y enterohemorrágica (Nataro y Kaper, 1998).

De estos grupos se distingue la *E. coli* enterohemorrágica por la severidad de la enfermedad que produce. El serotipo O157 es el más involucrado en ETAs. El análisis de electroforesis de enzimas multilocus muestra que la evolución de este serotipo inició hace 5 millones de años a partir de una *E. coli* enteropatógena, pero no se sabe cuando adquirió la virulencia que hoy exhibe (Armstrong y col., 1996). En 1982 con la aparición y estudio de dos brotes de diarrea sanguinolenta grave asociados a una misma cadena de comida de servicio rápido, *E. coli* O157:H7 se reconoce como patógeno para el hombre. Analizando las cepas disponibles en la década anterior en Inglaterra, Estados Unidos y Canadá, se encontraron algunas cepas de este serotipo que habían sido aisladas entre 1975 y 1982 (Amstrong y col., 1996). En Europa entre 1974 y 1981 se investigaron anticuerpos contra el antígeno O157 en pacientes holandeses con síndrome urémico hemolítico, y se encontraron en 14 de 33 pacientes. La

proporción de muestras positivas mostró un incremento estadísticamente significativo con el tiempo (Chart y col., 1991).

El surgimiento de este patógeno está asociado con cambios genéticos en el microorganismo, cambios en la producción y distribución de alimentos, cambios en el estilo de vida y preferencias de los consumidores, y en las prioridades del sistema de salud de vigilancia de ETA's (Wachsmuth, y col., 1997; Altekruze y col., 1997).

Este microorganismo tiene características muy particulares, que le permiten sobrevivir y crecer en diversos ambientes y alimentos:

- A valores de pH entre 5.5 y 7.5 la velocidad de crecimiento es similar, pero disminuye rápidamente a niveles más bajos (Buchanan y Klawitter, 1992). El mínimo pH de crecimiento se encuentra entre 4.0 y 4.5 (Buchanan y Bagi, 1994).
- Experimentalmente este patógeno sobrevive de varias semanas a meses en alimentos como mayonesa, salchichas, cidra de manzana, y queso Cheddar. La sobrevivencia se extiende de manera importante cuando se disminuye la temperatura de almacenamiento. En cidra de manzana sobrevivió 2-3 días a 25°C, mientras que a 8°C se mantuvo viable entre 10 y 31 días (Buchanan y Doyle, 1997).
- La temperatura mínima de crecimiento en condiciones por lo demás óptimas es aproximadamente de 8-10°C (Buchanan y Bagi, 1994; Rajkowski y Marmer, 1995).
- Muchas cepas de *E. coli* O157:H7 no desarrollan a temperaturas mayores de 44°C (Doyle y Schoeni, 1984). Se ha visto que el límite superior de temperatura de crecimiento es dependiente del medio de cultivo. Todas las cepas probadas por Palumbo y col. (1995) crecieron en infusión cerebro corazón a 45°C, pero 6 de 16 cepas no se multiplicaron en caldo EC a esa misma temperatura.
- *E. coli* O157:H7 no presenta una especial resistencia a los compuestos antimicrobianos que se utilizan en los alimentos (Buchanan y Doyle, 1997).

Estas características, aunadas a los factores que propiciaron su "surgimiento", han hecho de *E. coli* O157:H7 uno de los patógenos más importantes de la década.

### **B.- Patogénesis**

La infección por *E. coli* O157:H7 se manifiesta clínicamente de diversas maneras; desde el estado de portador asintomático hasta el síndrome urémico hemolítico (SUH), que puede ocasionar la muerte (Coia, 1997).

La diarrea es la forma más común de esta infección; tiene un período de incubación entre 1 y 14 días; con frecuencia es sanguinolenta y se acompaña de dolores abdominales fuertes. Se presenta vómito en cerca de la mitad de los pacientes y ocasionalmente fiebre. Esta colitis hemorrágica puede causar la muerte, especialmente en los extremos de la edad (Coia, 1997).

El SUH es la complicación más importante de la infección por este microorganismo. Ocurre en el 7% de los casos, después de 5-10 días de presentarse los síntomas de colitis hemorrágica. Se presenta anemia hemolítica croangiopática, trombocitopenia, y falla renal aguda (Coia, 1997). La mayoría de los pacientes con una terapia apropiada se recuperan; pero del 3-5% de los niños afectados pueden morir y entre 12 y 30% tener secuelas severas, como daño renal, hipertensión, o daño al sistema nervioso central (Nataro y Kaper, 1998).

Pueden presentarse otras complicaciones como colecistitis, perforación del colon, pancreatitis, litiasis biliar posthemolítica, prolapso rectal, apendicitis, hepatitis, edema pulmonar, cistitis hemorrágica, disfunción miocárdica, y anormalidades neurológicas, entre otras (Nataro y Kaper, 1998).

*E. coli* presenta varios factores de virulencia, responsables de la sintomatología que causa:

1. Toxinas shiga: Es el principal factor de virulencia; se trata de citotoxinas similares a la producidas por *Shigella dysenteriae*, que son tóxicas a las células Vero. Se han denominado Stx tipo 1 y 2 (Armstrong y col., 1996). Estas toxinas están involucradas en la diarrea y en la colitis; causan acumulación de fluidos y daño a tejidos cuando se inyectan en asa ligada (Nataro y Kaper, 1998). Se ha

propuesto que estas toxinas dañan a las vellosidades que cubren las células del epitelio intestinal, las cuales se encargan de la absorción de nutrientes y agua; las células encargadas de la secreción de fluidos no se ven afectadas, y el balance de absorción-secreción se afecta (Nataro y Kaper, 1998).

2. Enterohemolisina: Esta proteína es producida por casi todas las cepas de *E. coli* O157:H7 y por muchas cepas productoras de Stx, no O157. Está codificada por un plásmido de 60Mda, llamado pO157. El papel de esta toxina no se conoce bien; se ha visto que la lisis de eritrocitos in vivo libera hemoglobina, que estimula el crecimiento de *E. coli* O157:H7, y puede servir como fuente de hierro (Nataro y Kaper, 1998).
3. Factores de adherencia al intestino: Estas proteínas le permiten adherirse al intestino y colonizarlo, con la subsecuente formación de lesiones. También están codificadas en el plásmido O157 (Nataro y Kaper, 1998).
4. Plásmido pO157: Este plásmido está presente en todas las cepas de O157:H7, y codifica para una catalasa-peroxidasa. Se ha sugerido que está involucrado en la supresión de la producción de un exopolisacárido, pero su papel en la patogénesis se desconoce (Nataro y Kaper, 1998).
5. LPS O157: Este lipopolisacárido incrementa la citotoxicidad de Stx sobre células vasculares endoteliales in vitro, pero no se conoce bien su efecto in vivo (Nataro y Kaper, 1998).

### **C.- Epidemiología**

Se han presentado grandes brotes causados por *E. coli* O157:H7; sin embargo los casos esporádicos representan la mayor parte de las infecciones. El CDC estima que se presentan anualmente 20000 casos y cerca de 250 muertes en Estados Unidos. El costo se ha estimado entre 250 y 500 millones de dólares (Griffin y Tauxe, 1991). Los aislamientos y los brotes por este patógeno se han incrementado en los últimos años en Argentina, Australia, Bélgica, Dinamarca, Alemania, Italia, Israel, Suecia y Sudáfrica (Coia, 1998).

*E. coli* O157:H7 se ha asociado principalmente al consumo de carne de res. Se han visto involucrados en brotes otros productos cárnicos, leche, yoghurt, queso, carnes curadas y fermentadas, cidra de manzana sin fermentar,



mayonesa, agua, verduras crudas y ensaladas (Nataro y Kaper, 1998; Coia, 1998). Entre las verduras incriminadas como vehículos se encuentra la lechuga, causante de varios brotes, y germinado de rábano crudo, que causó un gran brote en Japón con más de 6000 casos. Dos brotes recientes de infección por *E. coli* O157:H7 en Michigan y Virginia se asociaron a germinado de alfalfa (Nataro y Kaper, 1998).

La dosis infectante mínima se ha estimado en aproximadamente 100 a 200 células, un número algo menor al de *Shigella* (Nataro y Kaper, 1998). Esta observación ayuda a explicar los brotes asociados a agua, y la alta tasa de casos secundarios en los brotes. En el brote ocurrido en Japón asociado a germinado de alfalfa, se presentaron más de 1000 casos secundarios en las familias de los pacientes (Iijima y col., 1997). Los factores que han propiciado los brotes afectan tanto la contaminación, como la sobrevivencia del microorganismo; se ha presentado contaminación por aguas negras, contaminación de fuentes de agua para beber por contaminación animal; cocción ó pasteurización inadecuada de los alimentos, o fallas en otro proceso que permita la sobrevivencia del patógeno (Coia, 1998).

En Estados Unidos y el Reino Unido, se ha observado un efecto de la época del año sobre la incidencia de estas enfermedades; el 60% de los casos se presentan en el verano y principios de otoño (WHO, 1997).

La eliminación de *E. coli* O157:H7 por niños infectados puede extenderse por varias semanas (hasta de 142 días), con medias entre 13 y 17 días (Armstrong y col., 1996). En un estudio de SUH post-diarrea, se aisló al patógeno en el 100% de heces colectadas dos días después del inicio de los síntomas; la tasa de aislamiento se redujo al 92% a los 3-6 días, y hasta el 33% después de 6 días (Armstrong y col., 1996).

Algunos aspectos sobresalientes de la epidemiología de *E. coli* O157:H7 merecen destacarse: Tiene como reservorio el tracto intestinal del ganado vacuno y otros animales; se transmite por una gran variedad de alimentos, principalmente carne de res; muestra una dosis infectante muy baja, y la tasa de ataque es generalmente alta, al igual que la transmisión persona-persona (Nataro y Kaper,

1998). En la Figura 6 se ilustra los principales reservorios y mecanismos de transmisión de *E. coli* O157:H7.

#### D.- Aislamiento e identificación.

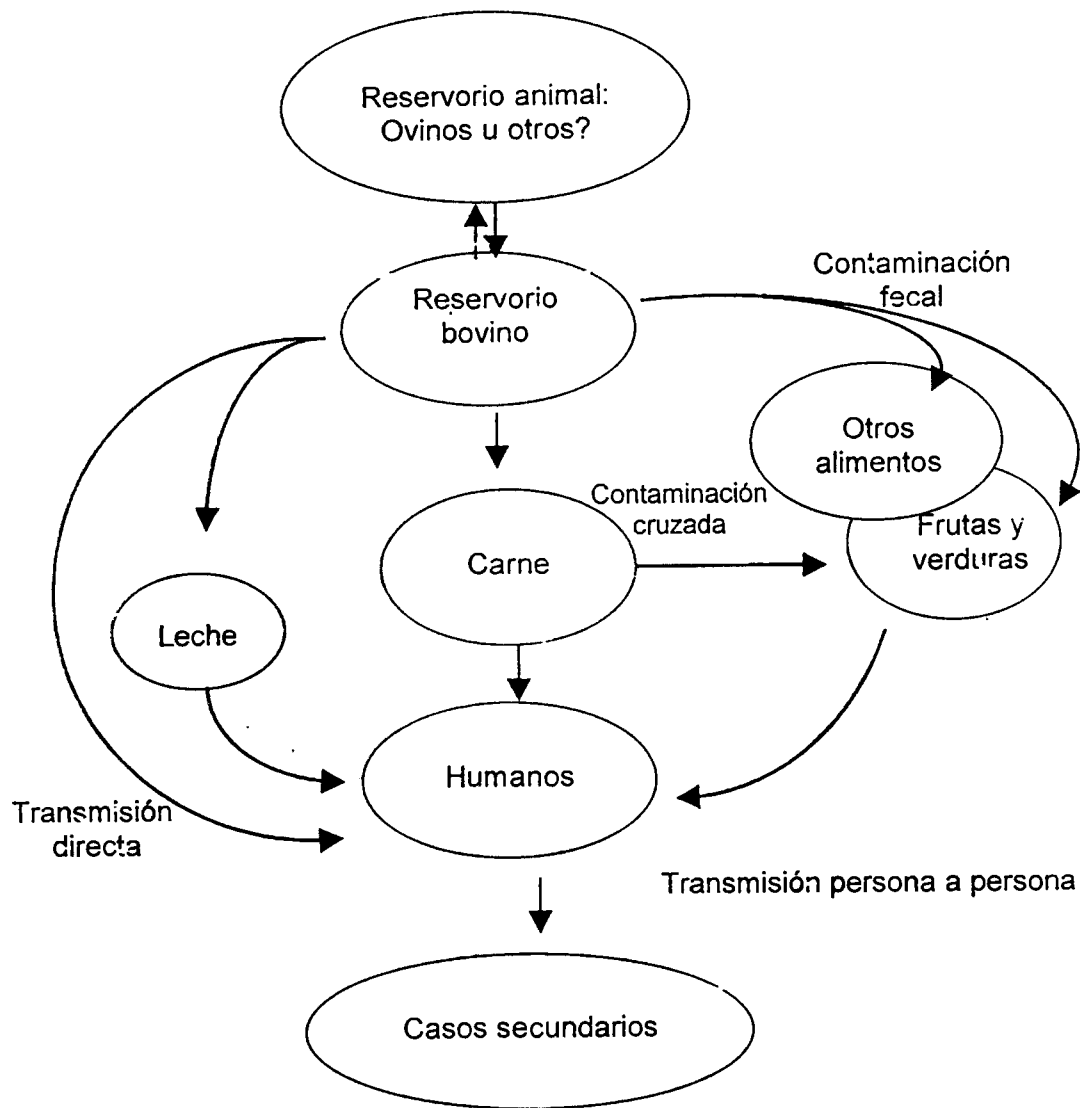
Las cepas de *E. coli* O157:H7 se diferencian de otras *E. coli* por que no fermentan el sorbitol en 24 h, ni hidrolizan el 4-metilumbiferil- $\beta$ -D-glucorónido (MUG) y por la producción de una o más toxinas Stx, factores de adherencia y un plásmido de 60MDa (Meng y col., 1994).

Para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 se han desarrollado métodos convencionales que involucran cultivo del alimento, aislamiento y confirmación bioquímica de las cepas. También se han aplicado técnicas serológicas y genéticas que disminuyen el tiempo y el costo (Meng y col., 1994).

El medio de cultivo más utilizado es el agar MacConkey-sorbitol (MCS), que evidencia la incapacidad del patógeno para utilizar el sorbitol. Esta característica no es exclusiva de *E. coli* O157:H7; los serotipos O26, O55 y O111 aislados de pacientes con SUH en Chile no fermentaron el sorbitol (Ojeda y col., 1995).

El aislamiento de *E. coli* O157:H7 en agar MCS puede realizarse con un enriquecimiento previo en caldos selectivos, como caldo soya tripticasa o caldo GN Hajna adicionados de cefixime (50ng/ml) y vancomicina (40 $\mu$ g/ml) (Nataro y Kaper, 1998). En el Reino Unido se ha utilizado agar MCS con cefixime y telurito, que inhiben a otros microorganismos no fermentadores de sorbitol, como *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Morganella*, y *Providencia* (Coia, 1998). Este medio inhibe por completo a otras cepas de *E. coli*, pero permite el desarrollo de *E. coli* O157:H7 y *Shigella sonnei* (Zadik y col., 1993).

También se ha utilizado agar MCS con MUG ó con bromo-cloro-indolil glucorónido (BCIG), para evidenciar la incapacidad de *E. coli* O157:H7 para producir  $\beta$ -glucoronidasa. Estos medios no se utilizan de rutina por el alto costo de estos sustratos (Coia, 1998). *E. coli* O157:H7 no fermenta ramnosa, a diferencia de la mayoría de cepas de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol. Por tal razón, la adición de ramnosa en el medio MCS con cefixime incrementa la proporción de colonias incoloras que corresponden a *E. coli* O157:H7 (Nataro y Kaper, 1998).



**Figura 6.** Fuentes y mecanismos de contaminación de *E. coli* O157:H7 a los alimentos y al hombre (Armstrong y col., 1996).

Para los estudios epidemiológicos se requiere que las cepas aisladas por cultivo se confirmen y caractericen serológicamente, por perfil de plásmidos, producción de toxinas, electroforesis en gel de campo pulsante, o análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (Meng y col., 1994).

Se han desarrollado métodos para detectar *E. coli* O157:H7 directamente del alimento, como la inmunofluorescencia directa con anticuerpos O157 y la filtración con epifluorescencia directa. Estas técnicas son muy rápidas, se obtienen resultados en aproximadamente 2 horas (Meng y col., 1994). Aunque tienen límites de detección relativamente altos y el anticuerpo presenta reacciones cruzadas con otros microorganismos, se ha observado buena correlación con métodos de cultivo.

Existen ensayos de aglutinación en látex, ensayos de ELISA y métodos que combinan la utilización de anticuerpos específicos (O157) con filtración en membrana hidrofóbica. Todos estos métodos que usan anticuerpos contra O157 tienen la desventaja de que se presentan reacciones cruzadas con otras cepas de *E. coli* O157 no-H7, *Escherichia hermannii*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *Salmonella* grupo N, *Pseudomonas maltophilia* y otras bacterias entéricas (Borczyk y col., 1990).

Doyle y Schoeni desarrollaron un método basado en un ensayo de inmunoblot que detecta hasta 1.5 *E. coli* O157:H7 por gramo de alimento; se ha probado con leche, carne y pollo crudos. Este método utiliza un antisero contra las toxinas Sxt (Doyle y Schoeni, 1994).

Otros métodos de detección incluyen hibridación con DNA específico y métodos basados en PCR. Algunos de estos métodos utilizan porciones de los genes que codifican para las toxinas Sxt, ó asociados a la virulencia de *E. coli* verocitotoxigénicas, por lo que no son específicos para el serotipo O157:H7 (Meng y col., 1994).

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo General.

Evaluar los riesgos microbianos implicados en la preparación y almacenamiento de guacamole.

### 3.2 Objetivos Específicos.

- 3.2.1 Evaluar la sensibilidad de algunas técnicas para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp a partir de pulpa de aguacate.
- 3.2.2 Estudiar la microbiología del guacamole tradicional.
- 3.2.3 Determinar la patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas del guacamole.
- 3.2.4 Investigar el comportamiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en pulpa de aguacate.
- 3.2.5 Determinar la influencia del pH sobre el comportamiento de *Salmonella* sp y *L. monocytogenes* en CST.

## 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 MATERIALES

- Los medios de cultivo para el aislamiento de *L. monocytogenes*:

Caldo UVM

Caldo Fraser

Agar LPM

Agar Oxford

Agar Oxford modificado (MOX)

Se prepararon a partir de sus ingredientes, utilizando reactivos Baker. El resto de los medios de cultivo fueron de la marca BIOXON, México.

- Los equipos utilizados se describen en cada apartado de los métodos.
- Las cepas se obtuvieron de las siguientes instituciones:

Cepas	Institución
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Universidad de Guadalajara
<i>L. monocytogenes</i> 4b	Universidad de Guadalajara
<i>L. monocytogenes</i> V7	Universidad de Guadalajara
<i>Salmonella agona</i>	Empresa P&G
<i>Salmonella michigan</i>	Empresa P&G
<i>Salmonella montevideo</i>	Empresa P&G
<i>Salmonella typhimurium</i>	Universidad de Guadalajara
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Universidad de Davis, California.
<i>S. aureus</i> ATCC 89213	Universidad de Davis, California.
<i>S. aureus</i> termonucleasa +	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Instituto Nacional de Nutrición
<i>Rodococcus equi</i>	Universidad de Guadalajara
<i>E. coli</i> NP	
<i>E. coli</i> O157:H7 0019	Empresa P&G
<i>E. coli</i> O157:H7 932	Empresa P&G
<i>E. coli</i> O157:H7 994	Empresa P&G
<i>E. coli</i> O157:H7 F4546	Empresa P&G

- Se utilizaron incubadoras Felisa y Precision científico, refrigeradores de uso doméstico y materiales comunes en un laboratorio de Microbiología.



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Evaluación de las técnicas propuestas por USDA y FDA para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de aguacate.

Se evaluaron las técnicas de aislamiento propuestas por la administración de drogas y alimentos (FDA) y por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) para el aislamiento de *L. monocytogenes*, aplicándolas a pulpa de aguacate. Se comparó la sensibilidad de las técnicas cualitativas y se estudió la influencia de la pulpa de aguacate sobre la recuperación del microorganismo en ambos procedimientos.

#### 4.2.1.1 Efecto de la pulpa de aguacate sobre la recuperación de *L. monocytogenes* por las técnicas propuestas por USDA y FDA.

Un cultivo de *L. monocytogenes* Scott A de 18 h de incubación a 35°C, se lavó y resuspendió en solución salina. A partir de diluciones decimales de esta suspensión, se inocularon por separado, porciones de 25 g de pulpa de aguacate y de 25 mL de caldo soya tripticasa (CST), de manera que contuvieran 50 células/g ó mL. La pulpa de aguacate se obtuvo en el laboratorio a partir de aguacates maduros sin lavar, ni desinfectar; y el volumen del inóculo fue de 1.25 mL de la dilución requerida. Las porciones de pulpa de aguacate se homogeneizaron manualmente por 2 minutos y 2 minutos más en Stomacher a velocidad normal. Los caldos se homogeneizaron solamente en Stomacher por 2 minutos a la misma velocidad. Se adicionaron de 225 mL de diluyente de peptona, tanto a la pulpa de aguacate como a los caldos, y se homogeneizaron en Stomacher por 1 minuto. De ambas suspensiones se prepararon 3 diluciones decimales y de cada una se transfirió un mL a cada uno de 3 tubos con 9 mL de caldo UVM (Técnica de USDA) y se incubaron por 24 h a 30°C. De igual manera se inocularon 3 tubos con 9 mL de caldo LEB (Técnica de FDA) y se incubaron 48 h a 30°C.

Posteriormente se transfirió 0.1 mL de cada caldo UVM a tubos con 10 mL de caldo Fraser y se incubaron 24-48 h a 35°C. Los caldos UVM que mostraron ennegrecimiento al final de la incubación y todos los caldos LEB, se

sembraron en agar MOX para obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron por 24-48 h a 35°C y se confirmó bioquímicamente una colonia sospechosa de cada placa. El estudio se realizó por duplicado.

Como control se aplicó este mismo esquema sobre porciones de pulpa de aguacate no inoculada.

Se realizó el recuento de la cepa de *L. monocytogenes* siguiendo la técnica de Miles y Misra, utilizando agar soya tripticasa (AST) e inoculando por sextuplicado 10 µL de las diluciones 5, 6 y 7 del cultivo original.

#### **4.2.1.2 Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de USDA y FDA para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate**

En este estudio se empleó una mezcla de 4 cepas de *L. monocytogenes*: Scott A y 3 cepas aisladas de guacamole. Las cuatro cepas se hicieron crecer 18 h a 35°C en caldo soya tripticasa con extracto de levadura (CSTEL) por separado. Los cultivos se lavaron, se resuspendieron en SSI y se mezclaron en proporciones iguales. Con esta mezcla se inocularon porciones de 10 g de pulpa de aguacate obtenida como se describió anteriormente. Los niveles de inóculo fueron ~2, 4 y 45 células por porción. Se homogeneizaron manualmente por 1 minuto y se mantuvieron a 22° por 30 minutos. Se siguieron las técnicas cualitativas para el aislamiento de *L. monocytogenes* de USDA y FDA ilustradas en las Figuras 7 y 8 respectivamente. Para este caso se utilizaron volúmenes de 90 mL de los caldos UVM y LEB para mantener la proporción 1:10 con la muestra analizada. Las cepas aisladas de cada muestra se confirmaron mediante las pruebas bioquímicas que se listan en 6.2.4. El estudio se realizó por cuadruplicado.

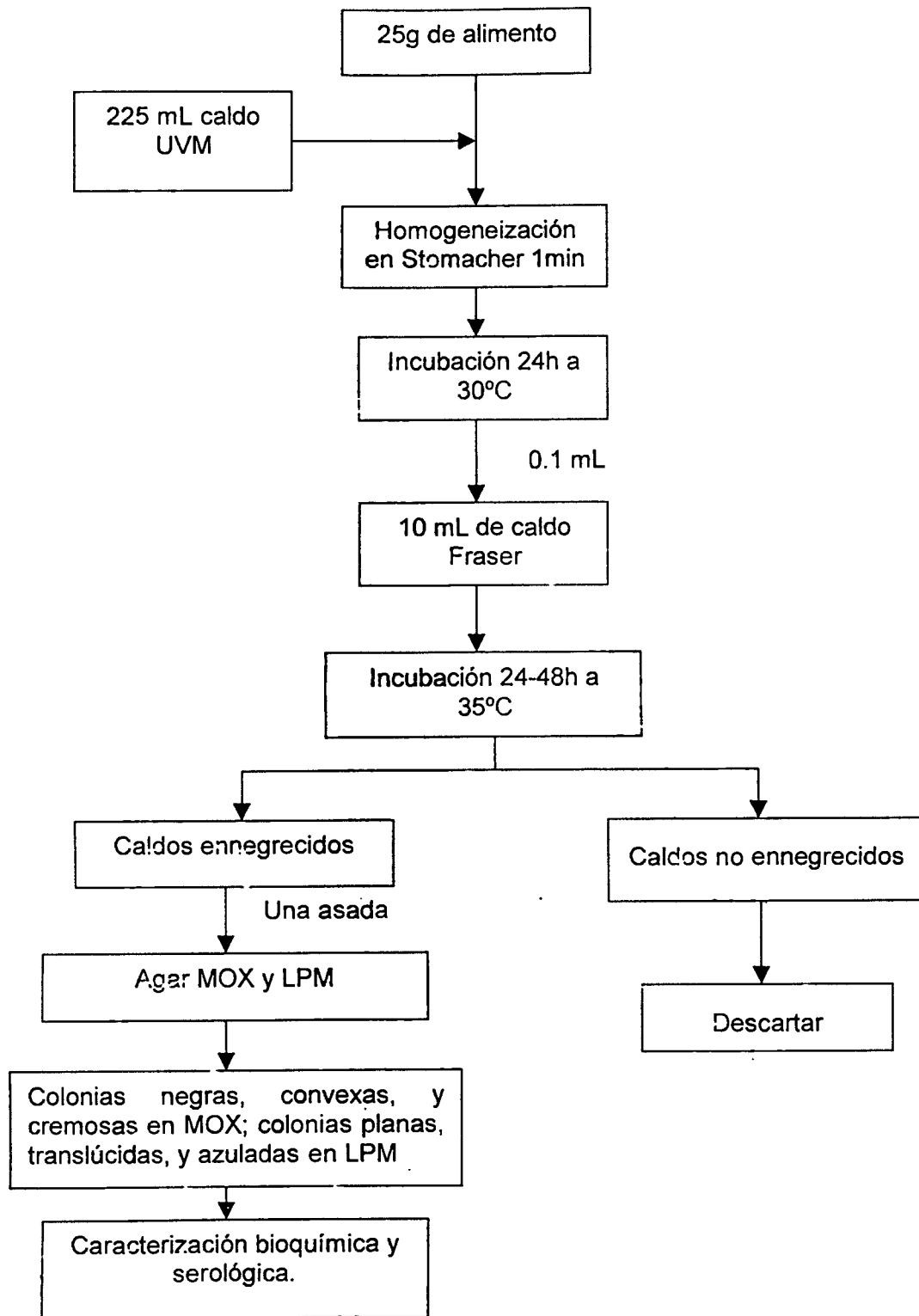
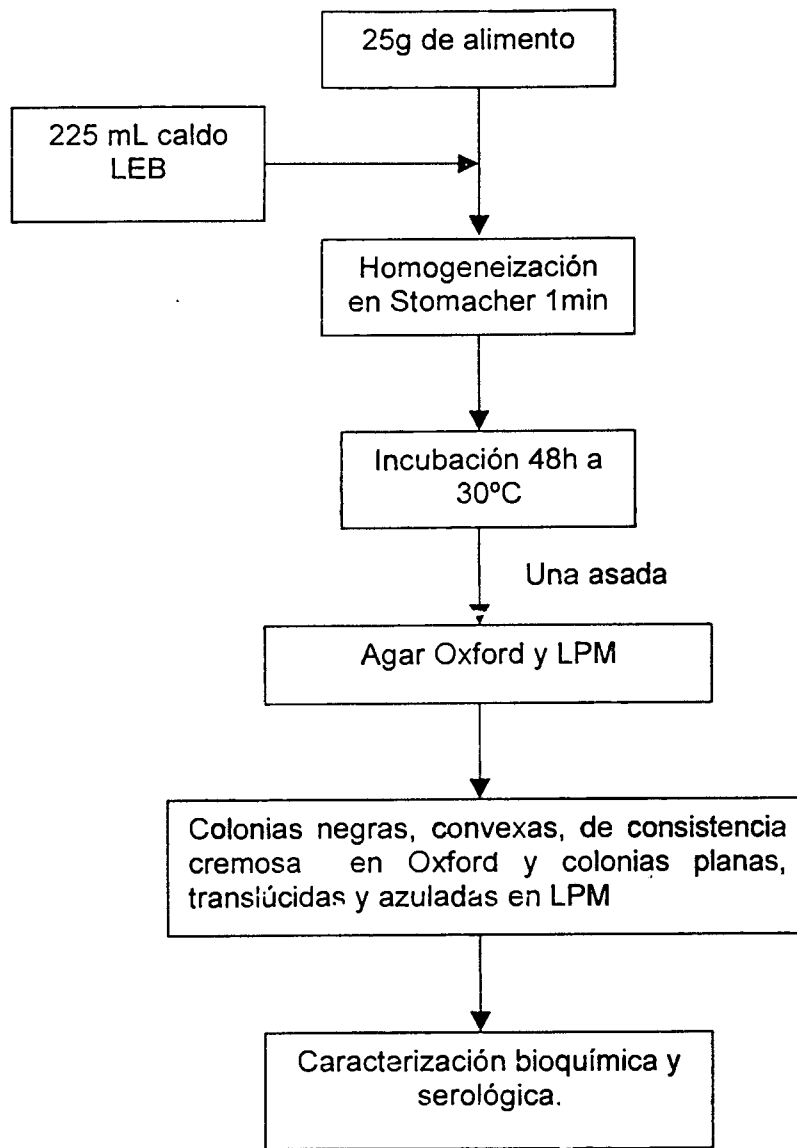


Figura 7. Técnica utilizada por USDA para el aislamiento de *L. monocytogenes* de los alimentos.



**Figura 8.** Procedimiento propuesto por FDA para el aislamiento de *L. monocytogenes* de los alimentos.

#### **4.2.2 Evaluación de la técnica propuesta por HPB para el aislamiento de *Salmonella* spp, aplicada a pulpa de aguacate.**

En este experimento se estudió la sensibilidad de la técnica propuesta por la HPB (Dependencia para la protección de la salud de Canadá) para el aislamiento de *Salmonella*, aplicado a pulpa de aguacate. Se investigó el efecto del preenriquecimiento sobre la recuperación de *Salmonella* a partir del mismo sustrato. Se utilizó una mezcla de cuatro cepas preparada como en el experimento anterior: *S. montevideo*, *S. agona*, *S. michigan*, y *S. typhimurium*. Se inocularon porciones de 25 g de pulpa de aguacate obtenida como se describió previamente, con ~6, 60 y 240 células contenidas en 1mL. Dos muestras de cada nivel de inóculo y una porción de pulpa sin inocular se sometieron al tratamiento que se esquematiza en la Figura 9. Para otro conjunto igual de muestras se omitió el preenriquecimiento, y se siguió el resto del diagrama.

#### **4.2.3 Investigación de la microbiología del guacamole tradicional.**

Se analizaron 76 muestras de guacamole tradicional obtenidas en aproximadamente 1 año de diversos sitios, que se clasificaron en cuatro tipos:

- Restaurante: Lugares cerrados, donde hay un espacio y empleados exclusivamente para preparar los alimentos. Se cuenta con agua potable corriente y sanitarios para el personal.
- Fonda: Se consideran lugares cerrados, donde las personas efectúan otras actividades además de preparar los alimentos; como atención de clientes, limpieza y cobro. También cuentan con agua corriente y sanitarios, que comparten con los consumidores. Generalmente la cocina se encuentra cerca de la entrada del establecimiento.
- Mercado: Lugares que expenden comida en el interior de un mercado.
- Puesto: Expendios de comida en la vía pública.

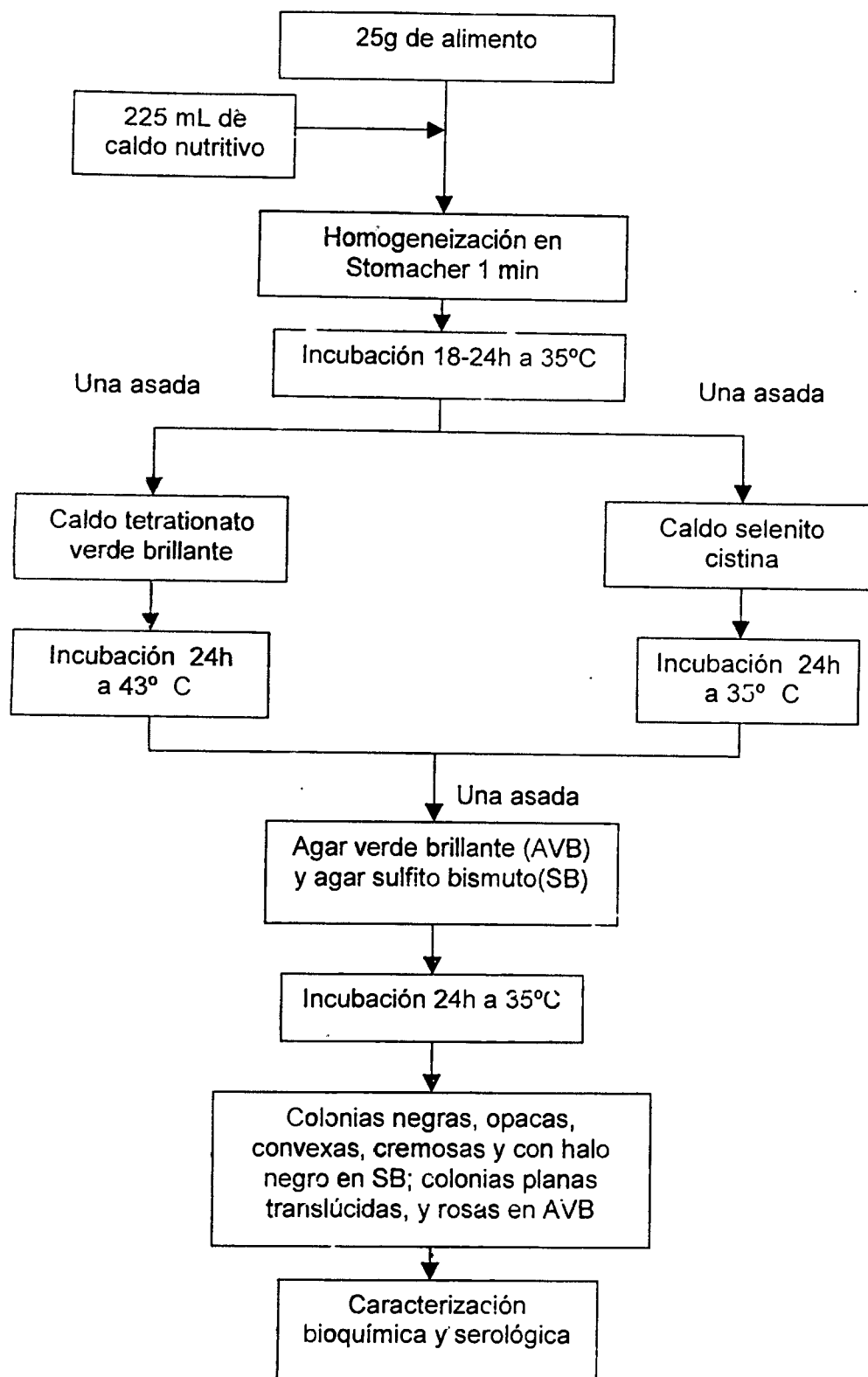


Figura 9. Método propuesto por HBP para el aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración desde su compra hasta el análisis, sin exceder de 4 horas. Se realizaron mediciones de pH y actividad de agua, recuento de microorganismos indicadores: bacterias mesófilas aerobias (BMA), organismos coliformes totales (OCT), hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus*; así com, las investigaciones de *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

#### **4.2.3.1 Medicion de pH**

10 g de muestra se diluyeron en 10 mL de agua destilada recién hervida y enfriada en un baño de hielo hasta temperatura ambiente. La medición se realizó en un potenciómetro Orión 410-A, previamente calibrado con soluciones amortiguadoras Merck de pH 4 y 10.

#### **4.2.3.2 Medición de Actividad de agua (Aa)**

Se utilizó un equipo AquaLab ® modelo CX2, el cual mide la humedad relativa del interior de una cámara donde se coloca la muestra. El equipo se calibró con agua destilada y soluciones saturadas de cloruro de bario (Aa=0.900) y cromato de potasio(Aa=0.970). Cada muestra se analizó por triplicado.

#### **4.2.3.3 Recuentos de microorganismos indicadores**

Se llevaron a cabo recuentos de BMA, OCT, hongos, levaduras y *S. aureus*. Cuando las muestras presentaron un pH menor a 6.0 se neutralizaron con NaOH al 20 y 5% antes de su análisis. A partir de 10 g de muestra se prepararon diluciones decimales con diluyente de petona (0.1%) y se inocularon los medios específicos para cada grupo:

Grupo indicador	Medio	Técnica
BMA	Agar cuenta estándar	Vaciado en placa
OCT	Agar rojo violeta bilis	Vaciado en placa
Hongos	Agar papa dextrosa	Vaciado en placa
Y levaduras	(Ampicilina 0.02%+ rosa de bengala 30ppm)	
<i>S. aureus</i>	Agar Baird-Parker (ABP)	Extensión en superficie

Los recuento se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones del Manual de Análisis Bacteriológico (FDA, 1992), con las siguientes modificaciones:

- La suspensión del alimento se homogeneizó en Stomacher por 1 minuto a velocidad normal.
- Para *S. aureus* se inocularon 200 $\mu$ L de cada dilución.
- La homogeneización de las diluciones decimales se efectuó por 10 segundos en volúmenes de 9+1mL en vortex.

Para cuantificar *E. coli* se utilizó caldo Fluorocult®, que contiene lactosa, un indicador ácido-base, triptófano y 4-metilumbiferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG).

Este medio permite detectar la formación de gas y ácido a partir de lactosa, y la producción de indol y de  $\beta$ -glucuronidasa, que aunado al crecimiento a 44.5°C permite hacer una detección confiable de *E. coli* (Pérez y col., 1986; Bredie y Boer, 1992). Se prepararon 4 diluciones decimales de cada muestra de guacamole y se inocularon tubos con 3 ml de Fluorocult con cada una de ellas. Se incubaron a 44.5 $\pm$ 0.2°C por 24 y 48 horas y se observaron los resultados a ambos tiempos. Para evidenciar la hidrólisis del MUG, se expusieron los tubos a luz UV, utilizando una lámpara Blak-Ray® modelo UVL-56 con una  $\lambda$  de 366nm.

El 10% de las colonias sospechosas de *S. aureus* aisladas al azar de cada placa de ABP se confirmaron en base a la morfología microscópica, la reacción al Gram y la capacidad de producir catalasa y termonucleasa. La prueba de termonucleasa se realizó de la siguiente manera:

En caldos de infusión cerebro corazón (BHI) se inocularon por separado cada una de las colonias y se incubaron 18-14 h a 35°C. El cultivo se sometió a ebullición por 15 minutos en un baño María y se enfrió hasta temperatura



ambiente. Se utilizó agar azul de toluidina extendido en un portaobjetos, con ~2 mm de espesor. Se hicieron perforaciones en el agar, y se depositaron pequeñas alícuotas de los cultivos tratados. Se utilizó como control un cultivo de una cepa de *S. aureus* productora de termonucleasa. Los portaobjetos se incubaron dentro de una caja Petri sobre un soporte de vidrio acompañados de un algodón con agua y glicerina, para evitar la deshidratación del medio. Después de una incubación de 4-6 h a 35°C, la presencia de un halo rosa se consideró como positivo, independientemente del tamaño de su diámetro.

#### 4.2.3.4 Investigación de microorganismos patógenos.

Los microorganismos patógenos investigados fueron *L. monocytogenes* y *Salmonella*, cuyo aislamiento se efectuó de acuerdo con las Figuras 7 y 9.

La caracterización bioquímica de *Salmonella* se realizó basándose en las siguientes pruebas (Flowers y col., 1992):

- Utilización de glucosa y lactosa o sacarosa (TSI/ 35±1°C)
- Producción de lisina descarboxilasa (LIA/ 35±1°C)
- Producción de ureasa
- Producción de ornitina descarboxilasa e indol (MIO/35±1°C)
- Movilidad (MIO/35±1°C)
- Crecimiento en caldo KCN.

Para identificar las cepas de *L. monocytogenes* se llevaron a cabo las siguientes pruebas, según se describe en el Manual de Análisis Bacteriológico (FDA, 1992):

- Morfología microscópica y reacción al Gram
- Producción de catalasa (en portaobjeto)
- Utilización de glucosa y lactosa o sacarosa (TSI/35±1°C)
- Producción de H<sub>2</sub>S (TSI/35±1°C)
- Movilidad (SIM/22±0.5°C)
- Pruebas de rojo de metilo y Voges Proskauer
- Utilización de manitol, ramnosa y xilosa a 35±1°C.
- Producción de hemólisis (Agar sangre de cordero)

- Prueba de CAMP
- Aglutinación con antisueros O tipo 1 y 4 DIFCO.

#### 4.2.4 Determinación de la patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole.

Se determinó la patogenicidad de 24 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole, de las cuales 15 eran hemolíticas y 9 no hemolíticas. Ocho cepas no hemolíticas y 10 hemolíticas se almacenaron en refrigeración; las 6 cepas restantes se almacenaron tanto en refrigeración, como en temperatura ambiente. El almacenamiento se extendió entre 8 y 14 meses.

Se utilizaron ratones hembra donados por el Instituto Nacional de Virología de la Secretaría de Salud en la ciudad de México. D.F. Los animales se adaptaron en el laboratorio por 4 días antes de la realización de la prueba.

Las cepas de *L. monocytogenes* se activaron mediante dos resiembras consecutivas e incubación a 35°C por 24 h en caldo y agar soya tripticasa con 0.6% de extracto de levadura. Los cultivos de 18 h de las cepas de *L. monocytogenes* se concentraron 10 veces centrifugando a 4500 rpm por 10 minutos y resuspendiendo en solución salina.

Cuatro ratones de 16 a 18 g y uno de 18 a 20g se inocularon intraperitonealmente con 0.1 mL de la suspensión de cada una de las cepas, conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^9$  células.

Los ratones se distribuyeron para tener los 5 ratones inoculados con una cepa por jaula y se observaron dos ocasiones por día durante 5 días. De los animales muertos se practicaron necropsias y se realizó cultivo en agar MOX de líquido intraperitoneal, hígado y bazo. Los ratones que permanecieron vivos hasta los 5 días se sacrificaron con éter, se realizaron necropsias, cultivo de líquido intraperitoneal, hígado y bazo en agar MOX; una porción del bazo se preenriqueció en caldo Fraser por 48 h a 35°C. Los caldos ennegrecidos se sembraron en agar MOX y se incubaron por 48 h a 35°C. Al menos un aislamiento de cada cepa se caracterizó con tinción Gram, catalasa, perfil bioquímico y hemólisis como se describió en el apartado anterior.

#### 4.2.5 Comportamiento de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *S. aureus* en pulpa de aguacate.

El estudio se llevó a cabo mediante un procedimiento similar para los cuatro patógenos; se describe una metodología general y algunos detalles particulares para cada microorganismo estudiado.

Aguacates maduros obtenidos del supermercado, se lavaron con agua y jabón en el laboratorio, y se desinfectaron con una solución de yodoforo (~50 ppm de yodo disponible) por 20 minutos. Después de enjuagarlos con SSI estéril se separó la pulpa asépticamente, se homogeneizó y se distribuyó en porciones de 10 g. En la pulpa de aguacate se efectuaron mediciones de pH y Aa. Las porciones se inocularon por separado con ~50 y 2500 células del microorganismo estudiado; el inóculo consistía en 0.5 ml de una mezcla de cepas lavadas, resuspendidas en SSI y diluidas hasta obtener la concentración deseada. Las porciones de pulpa inoculadas se homogeneizaron manualmente por un minuto, y se almacenaron a  $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$  o en refrigeración. A diferentes intervalos se tomaron tres muestras inoculadas de cada nivel de microorganismos, en las cuales se realizaron recuentos del patógeno y de la flora asociada.

- *L. monocytogenes*: La temperatura del refrigerador donde se almacenaron las muestras del estudio a temperaturas bajas, se mantuvo entre  $3.5$  y  $7.5^\circ\text{C}$  los 29 días del estudio; solamente el día 14 se elevó la temperatura hasta  $9.6^\circ\text{C}$ . Se utilizaron 4 cepas de *L. monocytogenes*: Scott A, V7, 4b (aislada de queso asociado a un brote), y una aislada de guacamole. El recuento del patógeno se realizó por extensión en superficie usando agar Oxford modificado (MOX) e incubando 48h a  $35^\circ\text{C}$ . El comportamiento de BMA y OCT se efectuó en porciones de pulpa no inoculadas que se almacenaron bajo las mismas condiciones ya descritas. Los recuentos de estos microorganismos se realizaron como se indica en el apartado 4.2.3.3

- *Salmonella*: El recuento de *Salmonella* se llevó a cabo por vaciado en placa en agar sulfito bismuto (SB), con incubación de 24h a  $35^\circ\text{C}$ . El comportamiento de la flora asociada se estudió de igual manera que para *L. monocytogenes*. La temperatura del refrigerador se mantuvo entre  $3.4$  y  $8.0^\circ\text{C}$ .

Las cepas utilizadas fueron: *S. montevideo*, *S. agona*, *S. michigan*, y *S. typhimurium*.

- *E. coli* O157:H7: Se utilizaron 4 cepas resistentes a 50 ppm de ácido nalidíxico. El recuento de este microorganismo se realizó por vaciado en placa en agar soya tripticasa (AST) adicionado de 50 ppm de ácido nalidíxico. También se efectuó un recuento en AST sin antibiótico, y la diferencia entre los recuentos de los medios con y sin antibiótico se consideró como flora asociada. Ambos medios se incubaron 24h a 35°C. La temperatura del refrigerador osciló entre 1-11°C.

- *S. aureus*: El recuento de *S. aureus* se realizó por extensión en superficie en agar Baird-Parker suplementado con 200U de polimixina B/mL de medio e incubado 48h a 35°C. Se realizaron recuentos de OCT como se describe en el apartado 4.2.3.3. La temperatura del refrigerador osciló entre 1.0 y 9.5°C.

#### **4.2.6 Evaluación del efecto del pH sobre el comportamiento de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en caldo soya tripticasa.**

Para este estudio se recurrió el equipo computarizado Bioscreen, que realiza mediciones turbidimétricas del desarrollo bacteriano. Se utilizaron 2 cepas de *Salmonella* y 25 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole. Como cepas control se utilizaron *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* Scott A. Se preparó caldo soya tripticasa (CST) a diferentes valores de pH: 5.0, 5.2, 5.5, 5.7, 6.0 y 7.0 ajustado con ácido cítrico. Se distribuyeron 390 µL de los caldos en cada fosa de placas de plástico.

Las cepas se hicieron crecer por separado en CSTEL a 35°C por 18h. Se lavaron, se resuspendieron en solución salina y se diluyeron hasta tener  $1 \times 10^5$  células/mL de caldo. Se inocularon en cada fosa 10µL de esta suspensión, de manera que contuvieran ~1000 células por fosa. El equipo se programó para incubar las placas a 35° por 48h, con agitación y mediciones cada 15 minutos a una  $\lambda$  de 600nm.

Una vez que el aparato ha registrado la información y trazado las gráficas de absorbencia vs tiempo, se puede disponer de los siguientes parámetros: área bajo la curva, tiempo de detección, duración y pendiente de la fase logarítmica.

### 4.3 Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Statistica versión 4.3 (1993) para analizar los resultados de los siguientes estudios:

1. En la investigación de la microbiología del guacamole se aplicaron:
  - a) Prueba de Kruskal-Wallis: Se analizó de manera independiente el efecto de 3 factores sobre el contenido de microorganismos indicadores:
    - Sitio de muestreo con 4 niveles.
    - Almacenamiento: con 2 niveles.
    - Presencia de *L. monocytogenes*: con 2 niveles.
2. En la evaluación del efecto del pH sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* se aplicó un análisis de varianza; considerando a las cepas como réplicas, y como único factor al pH con 6 niveles.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 5.1 Evaluación de la técnica propuesta por el Departamento de Protección a la Salud de Canadá para el aislamiento de *Salmonella* aplicada a pulpa de aguacate.

Se eligió la metodología utilizada por el Departamento de Protección a la Salud de Canadá para aislar *Salmonella* a partir de guacamole, porque ha resultado ser una técnica que recupera bien las células estresadas por ácido (Hoffman y col., 1997).

El preenriquecimiento es un paso del aislamiento de los microorganismos patógenos muy importante, que permite la recuperación de células subletalmente dañadas y su ulterior desarrollo en los medios selectivos.

Los caldos GN, lactosado y nutritivo se señalan como algunos de los más eficientes para el aislamiento de *Salmonella* (D'Aoust y Maishment, 1979). Organizaciones como la Asociación Oficial de Químicos analistas (AOAC) y la Organización Internacional de la Estandarización (ISO), utilizan el caldo lactosado como preenriquecimiento, mientras que el HPB utiliza el caldo nutritivo.

D'Aoust y col. (1992) evaluaron la recuperación de *Salmonella* a partir de alimentos naturalmente contaminados utilizando las técnicas del HBP y de ISO: encontraron que la sensibilidad de ambos métodos es similar.

Hoffman y col. (1997) encontraron resultados diferentes; ellos evaluaron los métodos propuestos por la AOAC y el HPB para la recuperación de *Salmonella javiana* a partir de queso Mozzarella. Estas técnicas resultaron comparables cuando las muestras artificialmente contaminadas se analizaron inmediatamente; pero cuando se almacenaron por 7 días a 4°C antes del análisis, la recuperación de *S. javiana* fue mayor por el método del HPB. Se encontró que en el caldo lactosado se presentaba un cambio en el pH del medio de 2-3 unidades entre las 5 y las 9 horas de incubación; este cambio tan brusco pudo haber afectado el desarrollo de *Salmonella*.

En el caldo nutritivo la disminución en el pH es menor y más lenta. Al final de la incubación se encontró una población de *S. javiana* de 1 log<sub>10</sub> mayor en el caldo nutritivo que en el caldo lactosado.

Parece ser que el caldo nutritivo es mejor para recuperar células de *Salmonella* estresadas por el ácido y por el almacenamiento en refrigeración que el caldo lactosado.

Como el guacamole incluye en sus ingredientes jugo de limón, es de esperar que el pH sea bajo. Por ello se requiere un método capaz de recuperar células estresadas por la acidez, como el propuesto por el HBP.

Algunos autores recomiendan el uso del enriquecimiento directo en alimentos crudos o muy contaminados; sin embargo, evaluaciones realizadas con carne cruda y materiales de desecho, muestran que la detección de *Salmonella* es hasta 3 veces mayor cuando se realiza el preenriquecimiento, que con el enriquecimiento directo (Edel y Kampelmacher, 1973; Harvey y Price, 1977).

En la evaluación realizada en el presente trabajo se encontró que el preenriquecimiento permite una mayor recuperación del patógeno, especialmente cuando la cantidad de células de *Salmonella* presentes en la pulpa de aguacate es baja. El uso de enriquecimiento directo podría producir muchos falsos negativos (Tabla 14).

En las muestras preenriquecidas el patógeno se aisló de todos los niveles de inóculo, tanto de caldo tetrionato verde brillante (TVB), como de caldo seienito cistina (SC). Sin embargo, se presentó mayor desarrollo de la flora asociada en los medios sólidos inoculados con caldo SC, que en aquellos inoculados con caldo TVB (Tabla 15).

El abundante desarrollo de la flora asociada en el caldo SC pudo haber interferido en la recuperación del *Salmonella* en las tres ocasiones que no se aisló de agar sulfito bismuto (ASB) y de agar verde brillante (AVB). La temperatura a la cual se incubó el caldo TVB puede ser en gran medida responsable de la mayor selectividad mostrada por este medio.



**Tabla 14.** Evaluación de la sensibilidad y del preenriquecimiento del método propuesto por HPB para el aislamiento de *Salmonella* aplicado a pulpa de aguacate.

Nivel de Inóculo UFC/25g	Aplica HPB	Con preenriquecimiento						Sin preenriquecimiento					
		Caldo TVBO			Caldo SC			Caldo TVB			Caldo SC		
		ASB	AVB	T <sup>1</sup>	ASB	AVB	T	ASB	AVB	T	ASB	AVB	T
6	A	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
60	A	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
240	A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Aislamiento de *Salmonella* en el caldo.

**Tabla 15.** Desarrollo de la flora asociada en medios sólidos del método de aislamiento de *Salmonella* propuesto por HPB aplicado a pulpa de aguacate (Con preenriquecimiento).

Nivel de inóculo UFC/25g	Réplica	Caldo TVB		Caldo SC	
		ASB	AVB	ASB	AVB
6	A	+	++	+++	+++
	B	+	+	+++	+++
60	A	+	+	+++	+++
	B	+	+	+++	+++
240	A	+	+	+++	+++
	B	+	+	+++	+++

- + crecimiento en 25% de la placa.
- ++ crecimiento en 50% de la placa.
- +++ crecimiento en 75% de la placa.
- ++++ crecimiento en 100% de la placa.

Partiendo de muestras de alimentos naturalmente contaminadas se ha observado que la eficacia de ASB y AVB cuando se inoculan a partir de TVB son similares; sin embargo, cuando estos medios sólidos se inoculan con caldo SC ó caldo selenito verde brillante la eficacia del ASB es mayor que la del AVB (D'Aoust y col., 1992). En contraste, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la eficacia de los dos medios sólidos fue semejante, independientemente del caldo de enriquecimiento. La alta selectividad del ASB no fue suficiente para inhibir el desarrollo de la flora asociada proveniente del caldo SC (Tabla 15). Probablemente se deba a la cantidad y al tipo de gérmenes presentes en la pulpa de aguacate.

La técnica evaluada parece ser eficaz para la recuperación de *Salmonella* a partir de pulpa de aguacate, ya que mostró sensibilidad para recuperar hasta 6 células en porciones de 10 g.

## **5.2 Evaluación de las técnicas propuestas por USDA y FDA para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de aguacate.**

Las metodologías propuestas por USDA y FDA son las más utilizadas en la actualidad para recuperar *L. monocytogenes* de los alimentos. Se han realizado estudios para comparar la sensibilidad y la capacidad de estas técnicas para recuperar células estresadas, con resultados contradictorios. En este trabajo se evaluó la sensibilidad de las técnicas cualitativas y la recuperación cuantitativa de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate.

### **5.2.1 Efecto de la pulpa de aguacate sobre la recuperación de *L. monocytogenes* por las técnicas propuestas por USDA y FDA.**

El aguacate contiene aproximadamente 13.5% de lípidos (Zubiran, 1992), pero en especial la variedad Hass puede contener hasta 20% (Rodríguez, 1982). Esta elevada concentración de grasa podría interferir en la liberación de los microorganismos a los caldos de cultivo, o de alguna otra manera en su desarrollo; por ello se comparó cuantitativamente la recuperación de *L. monocytogenes* de pulpa de aguacate respecto al caldo soya tripticasa (CST), donde los gérmenes se encuentran libremente suspendidos y libres de inhibición.

Considerando que la técnica de NMP no es muy precisa, se puede afirmar que las diferencias obtenidas entre el CST y la pupa de aguacate no son significativas (Tabla 16). Aparentemente existe poca o nula interferencia de la pulpa de aguacate sobre la recuperación del germen. Tampoco se observaron diferencias importantes entre las dos técnicas.

### **5.2.2 Evaluación de la sensibilidad de las técnicas de USDA y FDA para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate.**

Se evaluó la capacidad de estas técnicas para recuperar números pequeños de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate. Se logró recuperar con ambas técnicas hasta 2 células de 10 gramos de pulpa de aguacate (nivel más bajo utilizado).

Aparentemente no existen diferencias en la sensibilidad de las técnicas, sin embargo, una mayor abundancia de la flora asociada en los medios sólidos al seguir la técnica de FDA dificultó el aislamiento del patógeno. Comparando la eficacia de los medios sólidos, se encontró que el LPM y el MOX permitieron mejores resultados que el OXFORD (Tabla 17). La mayor selectividad la presentó el MOX, donde en la mayoría de las ocasiones *Listeria* spp creció en cultivo puro.

Tabla 16. Efecto de la pulpa de aguacate en la recuperación de *L. monocytogenes* mediante las técnicas cualitativas de la FDA y la USDA

Técnica	USDA				FDA			
	CST		PULPA		CST		PULPA	
Dilución	A	B	A	B	A	B	A	B
1:10	3*	3	3	3	3	3	3	3
1:100	3	1	3	2	2	2	3	2
1:1000	0	0	0	0	0	2	2	0
NMP	200	40	200	90	90	210	210	90
Media NMP	120		145		150		150	
	133.5				150			

\* Número de tubos positivos a *L. monocytogenes*.

Tabla 17. Evaluación de la sensibilidad de las técnicas propuestas por la FDA y la USDA para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate.

Nivel de inóculo (UFC/porción)	FDA			USDA		
	LPM	OXFORD	Total	LPM	MOX	Total
2.0	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
4.0	4/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4
44.0	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

\* Muestras positivas / número de réplicas.

La técnica propuesta por la USDA permite poner de manifiesto las muestras negativas desde las 36 horas, antes de llevar a cabo los aislamientos en placa, lo que representa un ahorro en tiempo y costo de los análisis.

En una evaluación de estas técnicas realizada por 12 laboratorios de Canadá, se encontró que de 165 muestras naturalmente contaminadas 11 resultaron positivas a *L. monocytogenes* por la técnica de USDA y negativas por FDA; mientras que solamente 3 muestras fueron positivas por la técnica de FDA y negativas por la USDA. Utilizando células de *L. monocytogenes* estresadas térmicamente se realizaron cultivos en los caldos de preenriquecimiento de ambas técnicas con diferentes niveles de inóculo. Al cabo de 24 horas de incubación a 30°C, se aisló el patógeno de todas las muestras preenriquecidas por la técnica de USDA y tan solo el 28.6% de caldo LEB (técnica FDA). A las 48 horas de incubación se recuperó el patógeno de todos los cultivos de ambas técnicas. También se observó una mayor disminución del pH en el caldo LEB, que en UVM después de 24 y 48 h de incubación (Warburton y col., 1992).

La disminución en el pH durante la incubación también ha sido observada por Dallas y Hitchins (1993), que estudiaron el efecto del desarrollo de microorganismos aislados de alimentos sobre *L. monocytogenes* en el preenriquecimiento con caldo LEB. Encontraron que algunos microorganismos, (enterococos por ejemplo) disminuían el pH del medio cerca de 2 unidades después de 48 horas incubación. Este pH adverso al desarrollo del patógeno, podría limitar su crecimiento y/o inducir estrés celular; lo que disminuiría las posibilidades de que estas células se expresaran en los medios sólidos que contienen agentes inhibitorios (Dallas y Hitchins, 1993).

En consecuencia se decidió utilizar la técnica utilizada por USDA para investigar la presencia de *L. monocytogenes* en guacamole.

### **5.3 Investigación de la microbiología del guacamole tradicional.**

De las 75 muestras de guacamole analizadas 26 procedían de restaurante, 24 de mercado, 20 de fonda y 5 de la vía pública. La venta de guacamole en la vía pública no es muy común, especialmente cuando se eleva el precio del aguacate.

### 5.3.1 pH y actividad de agua

El pH de las muestras fue muy variable, desde 4.04 hasta 7.25. Todas las muestras obtenidas en puestos de la vía pública presentaron valores cercanos a 6. Entre el resto de los establecimientos no hubo diferencias marcadas, pero los tres grupos presentaron una gran dispersión en los valores de este parámetro (Figura 10).

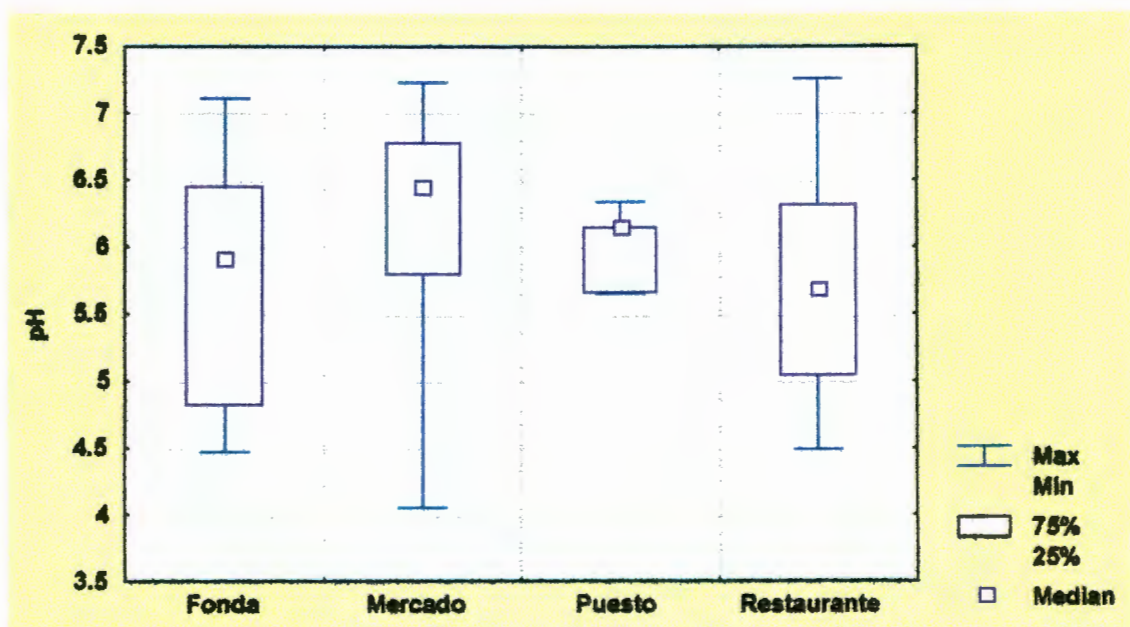
Las muestras adquiridas en restaurantes tienden a presentar los valores de pH menores; el 50% de estas muestras tuvieron un  $\text{pH} \leq 5.67$ , comparadas con 6.45, 6.14 y 5.90 de las muestras obtenidas en mercado, puesto y fonda respectivamente.

El nivel de pH que presentaron algunas muestras inhibe el crecimiento de muchos microorganismos, e incluso podrían comprometer su sobrevivencia; sin embargo, por lo menos la mitad de ellas tuvieron un pH muy cercano o ligeramente mayor a 6, lo que proporciona condiciones favorables al desarrollo microbiano.

El pH de un alimento está determinado por su composición; es evidente que la adición de limón al guacamole puede generar un pH que limite el desarrollo de los microorganismos, si éste es posible. Sin embargo, la inhibición del desarrollo no siempre asegura la inocuidad de un alimento; algunos microorganismos patógenos tienen dosis infectantes muy bajas, y la sobrevivencia de algunas células que contaminen el alimento puede ser suficiente para causar enfermedad.

Un valor bajo de pH puede cancelar el riesgo por microorganismos toxigénicos, como es el caso de *S. aureus*; para los microorganismos infecciosos, en cambio, la inhibición del crecimiento solamente disminuye el riesgo, ya que este es directamente proporcional a la concentración del patógeno.





Sitio de muestreo	Mínimo	Máximo	Percentiles		Mediana
			25	75	
Fonda	4.46	7.10	4.81	6.43	5.89
Mercado	4.04	7.22	5.78	6.76	6.43
Puesto	5.64	6.33	5.64	6.14	6.14
Restaurante	4.48	7.25	5.03	6.30	5.67

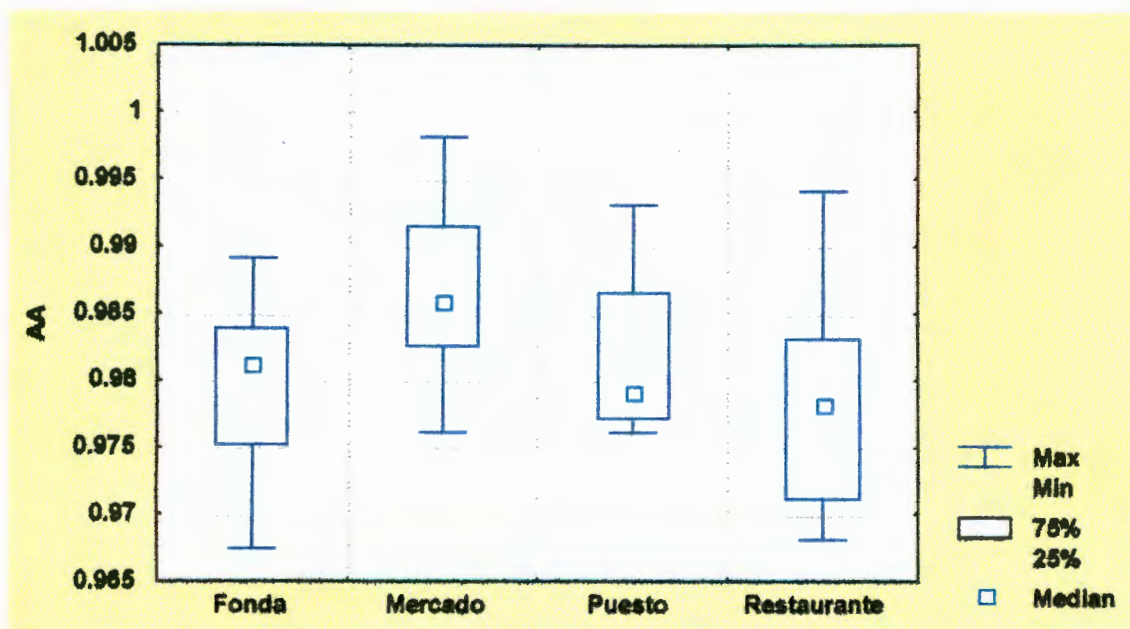
**Figura 10.** Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos del pH de guacamole según sitio de muestreo.

Las muestras de guacamole presentaron valores de actividad de agua (Aa) entre 0.967 y 0.998, los cuales son favorables para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Jay, 1978). En todos los establecimientos se observó una variación semejante en los valores de Aa del guacamole. Las muestras de fonda y restaurante presentaron los valores más bajos; en el 75% de las muestras se detectaron niveles de Aa  $\leq$  0.984 y 0.983, respectivamente (Figura 11).

La actividad de agua es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo y la sobrevivencia de los microorganismos. No obstante, por sí sola no determina la actividad microbiana; ésta se ve afectada por otros factores, como la temperatura, el pH, el potencial de oxidación-reducción, y la presencia de inhibidores en el alimento, entre otros. Por ejemplo, si un alimento con un pH y Aa favorables al desarrollo se almacena a una temperatura adversa, ese desarrollo se verá frenado.

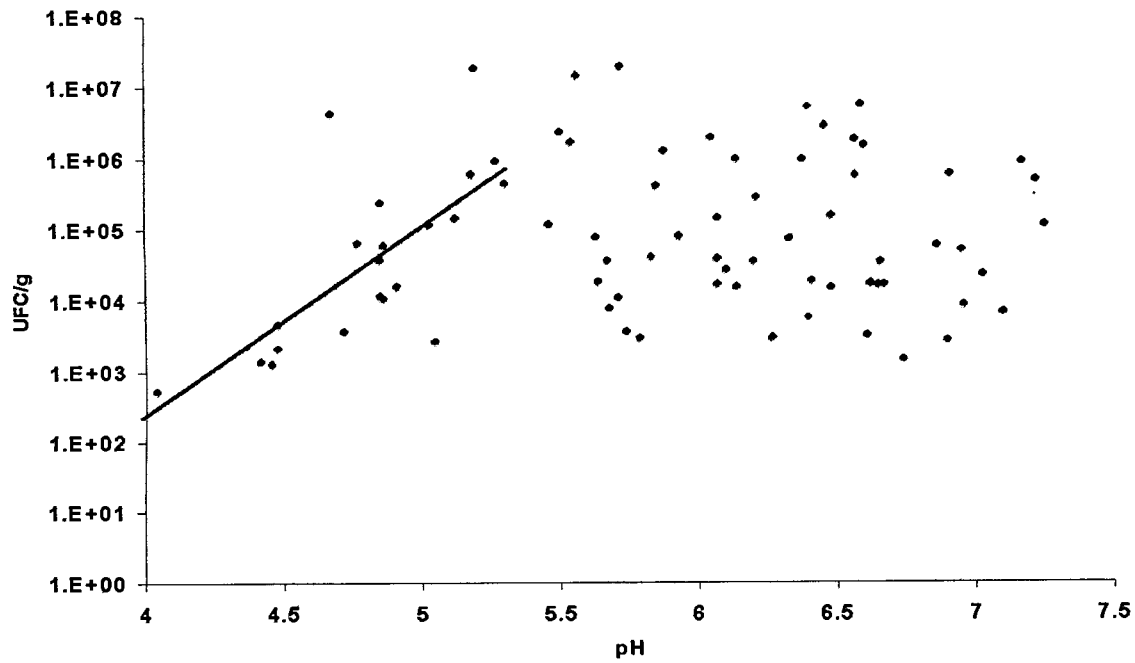
Al relacionar los valores de pH con el contenido de los diferentes grupos microbianos, se encontró cierta correlación entre este parámetro y el contenido de OCT (Figura 12). Entre los valores de pH de 4.0 y 5.3, el contenido de coliformes se incrementa a medida que el pH aumenta. A valores de pH superiores esta relación se pierde.

En la Figura 13(a) se muestra el contenido de OCT y el pH de las muestras que presentaron un pH entre 4 y 5.3. El índice de correlación es aceptable, y permite afirmar que el modelo (la línea) explica el 81% de los datos. El nivel de significancia obtenido ( $p \leq 0.05$ ) valida estadísticamente la correlación.



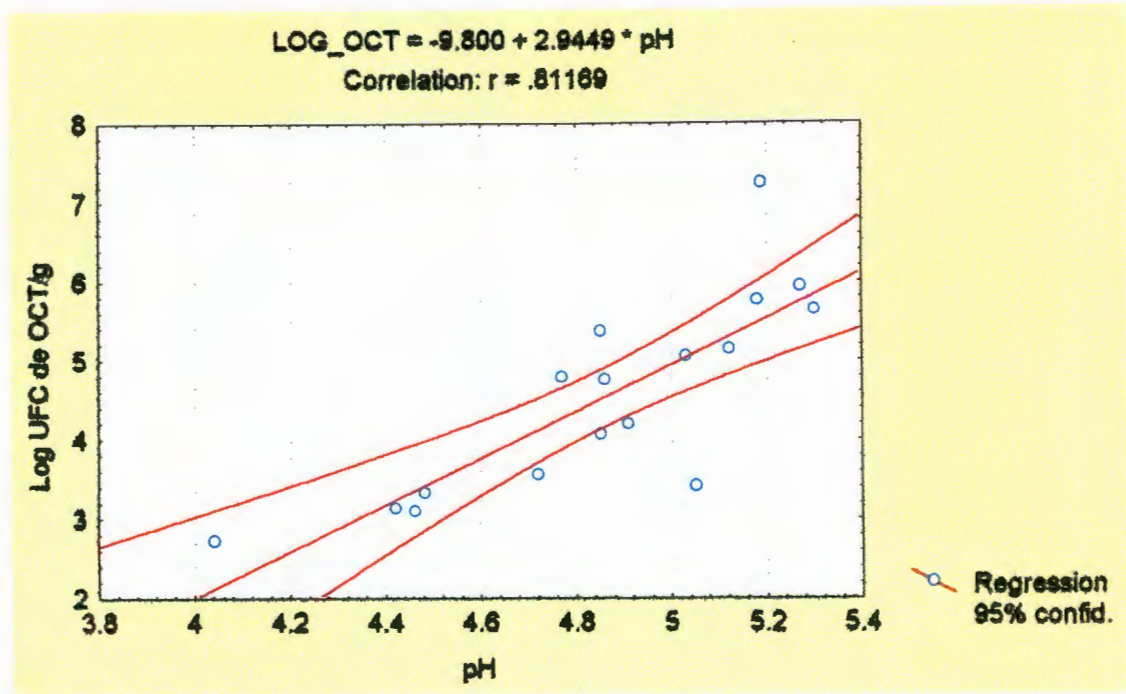
Sitio de muestreo	Mínimo	Máximo	Percentiles		Mediana
			25	75	
Fonda	0.967	0.989	0.975	0.984	0.981
Mercado	0.976	0.998	0.982	0.991	0.986
Puesto	0.976	0.993	0.977	0.987	0.979
Restaurante	0.968	0.994	0.971	0.983	0.978

**Figura 11.** Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas, y mínimos de la actividad de agua de guacamole según el sitio de muestreo.

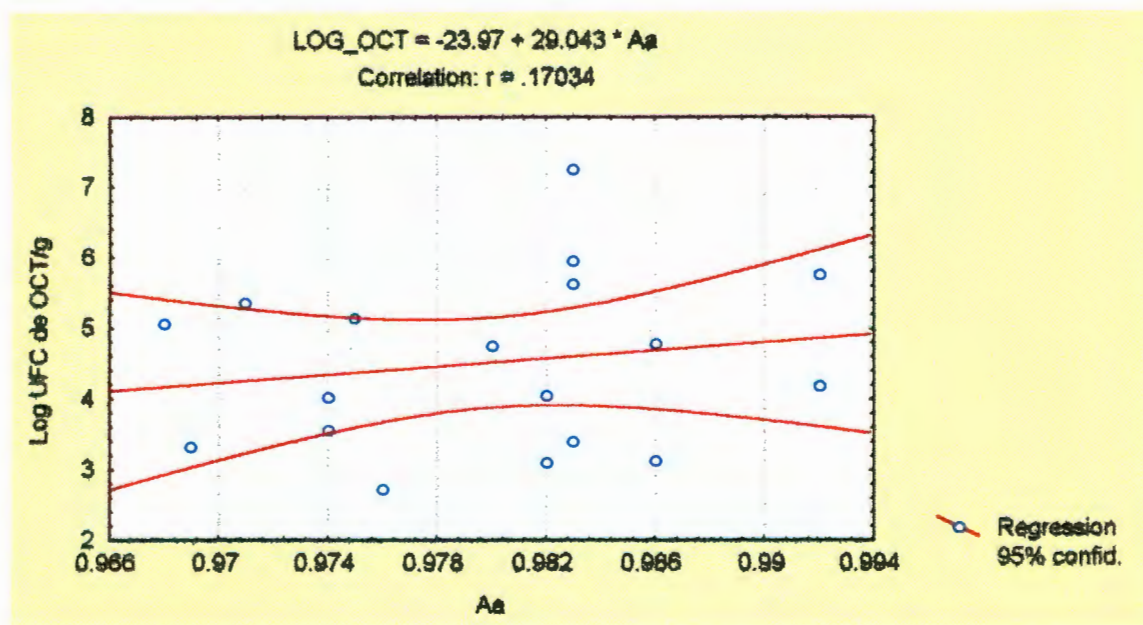


**Figura 12.** Relación entre el contenido de OCT y el pH del guacamole.

(a)



(b)



**Figura 13.** Correlación del pH (a) y actividad de agua (b) con el contenido de OCT.

Sin embargo, esta correlación se limita en 18 muestras, y no es posible saber si la población cuantificada en cada muestra se encontraba en activo crecimiento, estabilizada, o inactivándose, lo que hace aún más compleja la interpretación.

El intervalo de valores de pH implicados en la correlación permite la sobrevivencia y el desarrollo de los microorganismos en condiciones óptimas de otros factores; sin embargo, las células podrían estar disminuidas en su estado fisiológico al llegar al alimento y a los valores menores de pH verse afectada su sobrevivencia. La correlación observada podría ser el resultado principalmente del efecto del pH sobre el desarrollo de los coliformes.

Lo que se hace evidente es que el pH resulta un factor que puede ser decisivo para la calidad sanitaria de este alimento; sobretodo si consideramos que los coliformes tiene una gran similitud con los patógenos entéricos en cuanto a su respuesta a los factores evaluados.

No se observa una influencia definida de la actividad de agua sobre el contenido de OCT de las 13 muestras en (Figura 13b). El hecho de que los límites de actividad de agua sea muy favorable para la actividad microbiana puede ser la razón de que, aparentemente, no se vea afectado algún grupo indicador por este parámetro.

En la Figura 14 se muestra una gráfica donde se relaciona el pH, la actividad de agua y el contenido de OCT. La forma de la superficie de respuesta obtenida sugiere la interacción entre los dos factores, ya que se puede advertir que el efecto de la actividad de agua cambia con el pH. Aunque la interacción entre el efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo y la sobrevivencia de los microorganismos se ha demostrado experimentalmente, no se puede afirmar que este sea el caso; se carece de datos que validen todos los puntos de la superficie. Las cifras de actividad de agua de las muestras se encuentran solamente en los niveles medios de la superficie de respuesta.

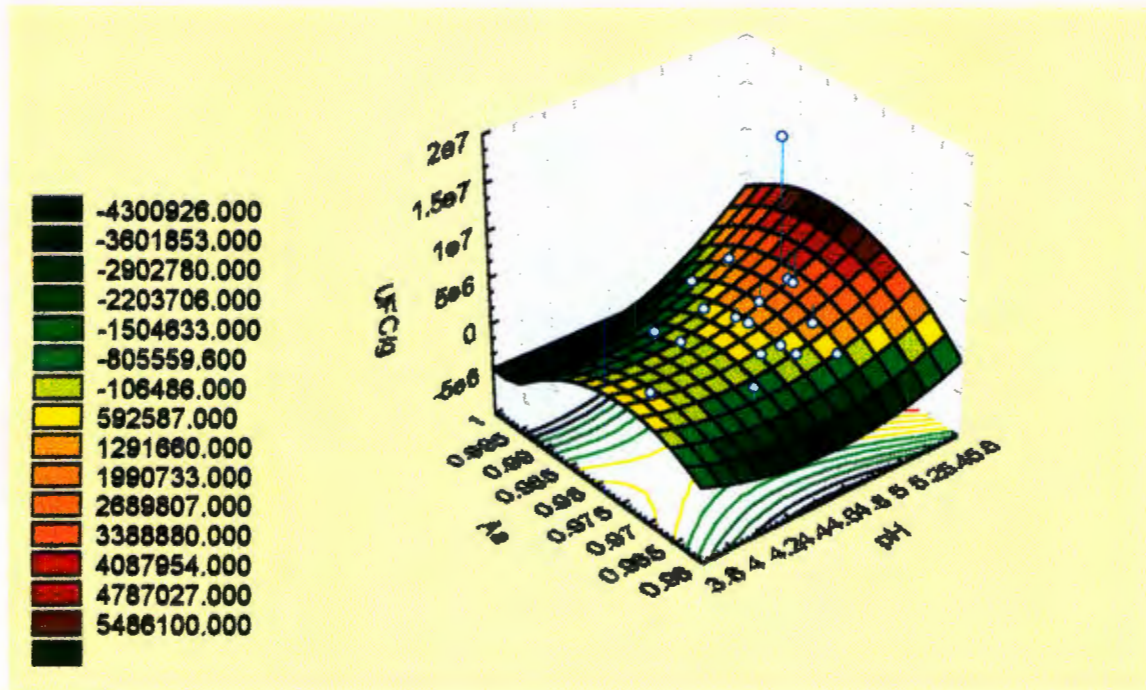


Figura 14. Contenido de OCT (UFC/g) vs pH vs actividad de agua

### 5.3.2 Microorganismos indicadores

El contenido de BMA varió desde  $1.2 \times 10^4$  hasta  $1.5 \times 10^8$ . Las dispersiones más amplias se presentaron en las muestras obtenidas en mercado y restaurante (Figura 15a); en este último se encontraron las muestras con menor contenido de BMA. Para los OCT se obtuvieron resultados similares a los de BMA (Figura 15), pero los recuentos de OCT fueron aproximadamente 1  $\log_{10}$  menores que los de BMA.

Los niveles de estos grupos bacterianos fueron similares en las muestras obtenidas de los diferentes establecimientos, independientemente del lugar de procedencia las cargas microbianas del alimento tienden a ser elevadas. Este hecho puede ser el resultado de una contaminación muy intensa o de actividad microbiana en el alimento. Las dos situaciones son factibles, ya que se trata de un alimento crudo, que con frecuencia se mantiene varias horas a temperatura ambiente en los sitios de venta expuesto a múltiples fuentes de contaminación. Por otra parte, la variabilidad en el contenido de BMA y OCT en el alimento podrían explicarse de varias maneras:

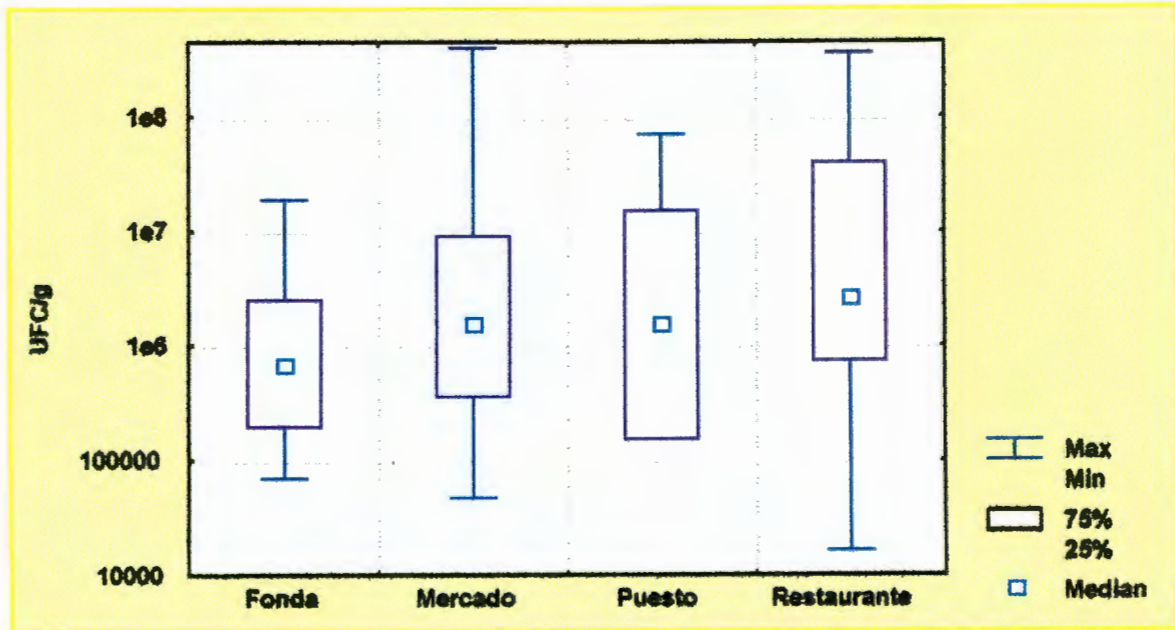
- Si las cargas microbianas se deben sólo a una contaminación, el guacamole menos contaminado podría haber sido preparado con ingredientes de mejor calidad sanitaria, o haber recibido tratamientos para disminuir su carga microbiana.
- En el caso del desarrollo de los microorganismos en el alimento, la variación resultaría de las diferentes condiciones de conservación del alimento (tiempo y temperatura), así como de su pH.
- Ambas situaciones podrían haber prevalecido.

La correlación encontrada entre el contenido de OCT y el pH de las muestras favorece la posibilidad de que se presenta desarrollo en el alimento (Figura 12).

También se observa que las muestras obtenidas de mercado y de restaurante, que presentaron una mayor dispersión de valores de pH (Figura 10), corresponden a las que muestran un intervalo más amplio en el contenido de todos los microorganismos indicadores (Figuras 15 y 16).



(a)



(b)

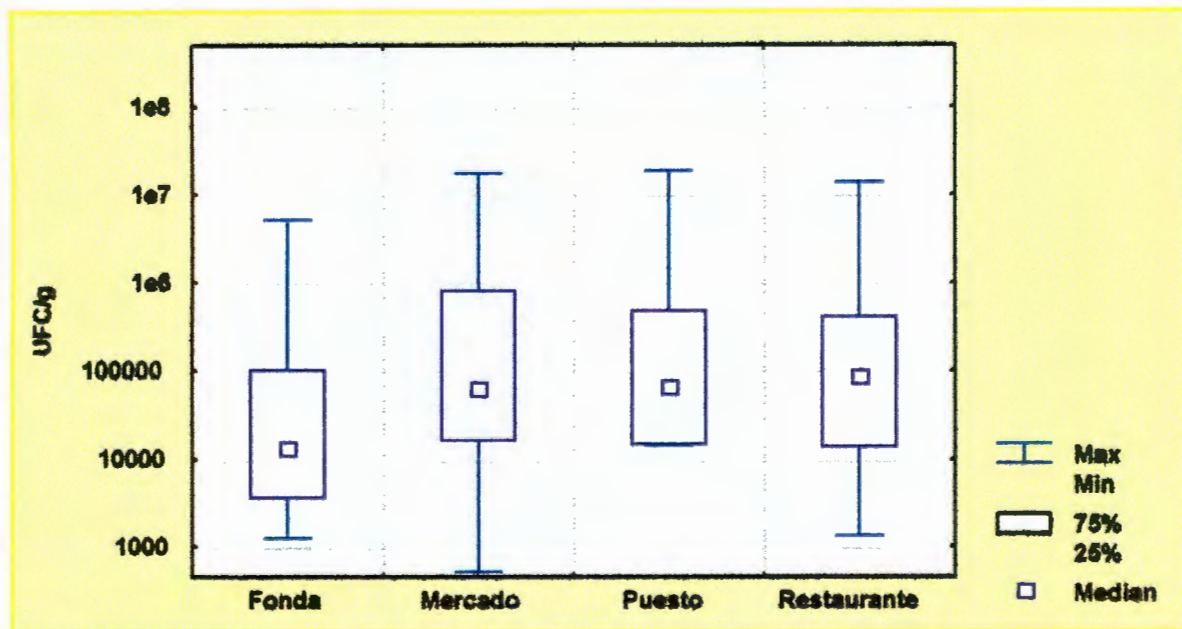
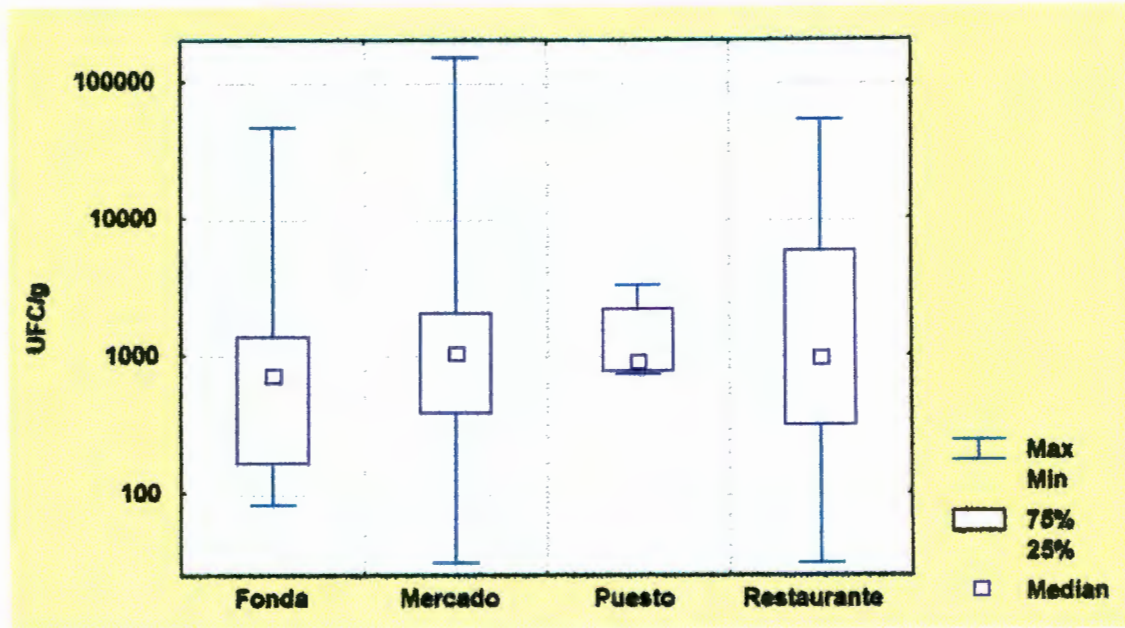


Figura 15. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas y mínimos de BMA (a) y OCT (b) de guacamole según el sitio de muestreo.

(a)



(b)

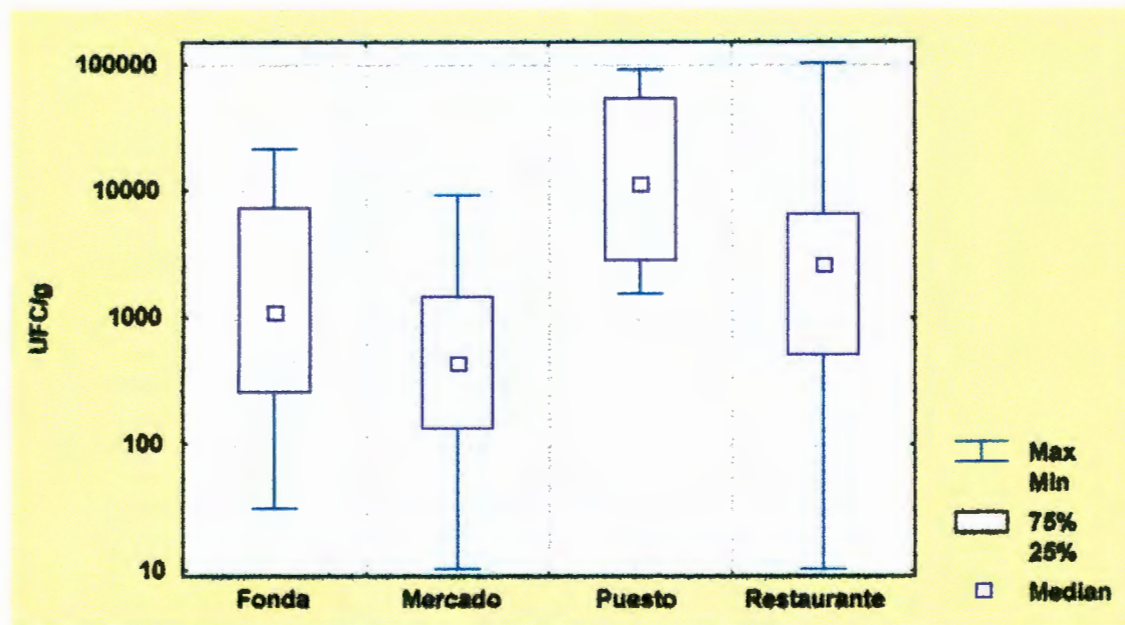


Figura 16. Valores máximos, percentiles 25 y 75, medianas y mínimos del contenido de hongos (a) y levaduras (b) de guacamole según el sitio de muestreo.

Algunas de las muestras de guacamole fueron elaboradas justo al momento de la compra, mientras que otras ya estaban preparadas cuando se adquirieron. Desgraciadamente, sólo se contó con esta información para 19 muestras.

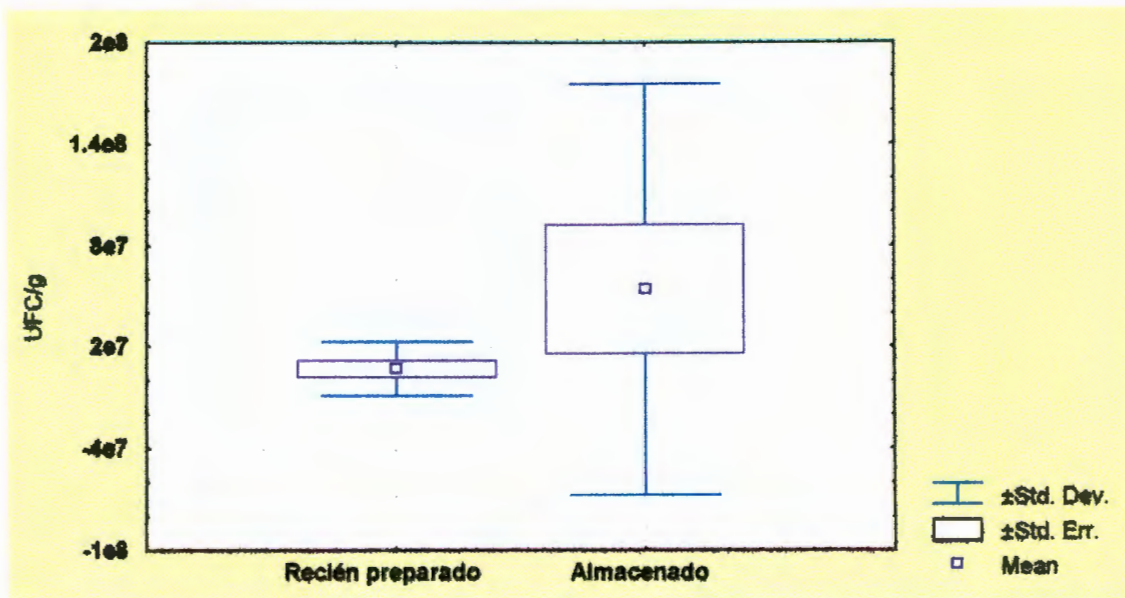
Al comparar estos dos grupos de muestras, se advirtió que el guacamole recién preparado o sin almacenar, presenta en general menor contenido de microorganismos indicadores que el guacamole preparado con antelación (Figuras 17 y 18).

Como se puede observar en la Figura 16a la dispersión de los datos es notable, principalmente en las muestras almacenadas; esto impide validar las diferencias aplicando un análisis de varianza basado en la comparación de medias. En la Figura 16a sólo se muestra la media, la desviación estándar y el error estándar de los datos de BMA, pero para OCT y hongos se observó el mismo comportamiento. El análisis de los datos se efectuó con la prueba de Kruskal-Wallis, la cual hace comparaciones entre las medianas y los rangos de los grupos. La mediana es un parámetro que representa mejor este tipo de poblaciones que la media, porque la presencia de un dato muy alejado del comportamiento general afecta significativamente a la media, no así a la mediana. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras almacenadas y sin almacenar en cuanto al contenido de BMA, OCT y hongos.

Estas observaciones apoyan la posibilidad de que se ha propiciado el desarrollo de los microorganismos en el alimento. Se puede apreciar que la carga microbiana en aproximadamente el 25% de las muestras almacenadas coincide con la mayor parte de las muestras sin almacenar; estas muestras almacenadas de "baja carga microbiana" podrían haber sido preparadas justo antes de la compra. La dispersión observada en las muestras almacenadas es explicable, ya que los períodos transcurridos entre la preparación y el muestreo pudieron variar desde algunos minutos hasta varias horas.

Los valores de pH y Aa del guacamole almacenado y sin almacenar fueron semejantes; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas comparando medias, o medianas ( $p \geq 0.05$ ). El efecto de estos factores está incluido en la variación.

(a)



(b)

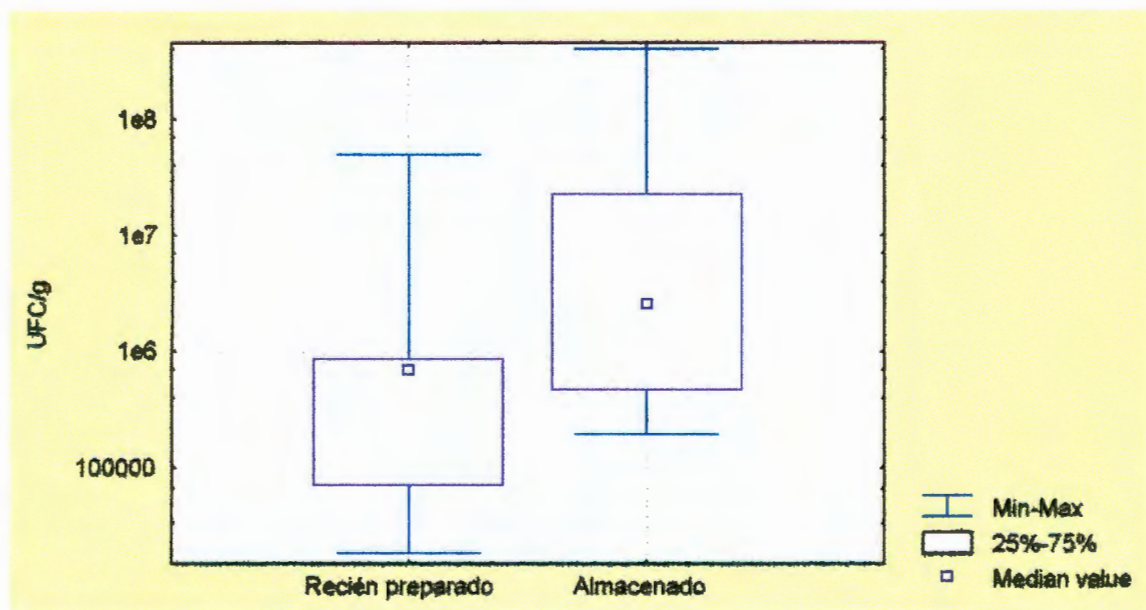
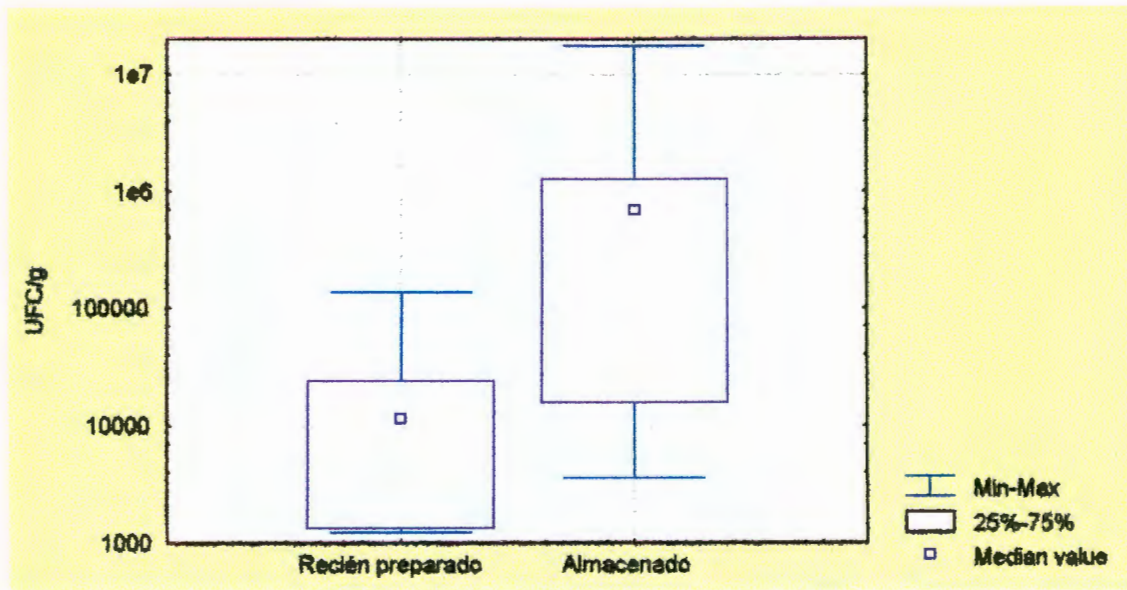
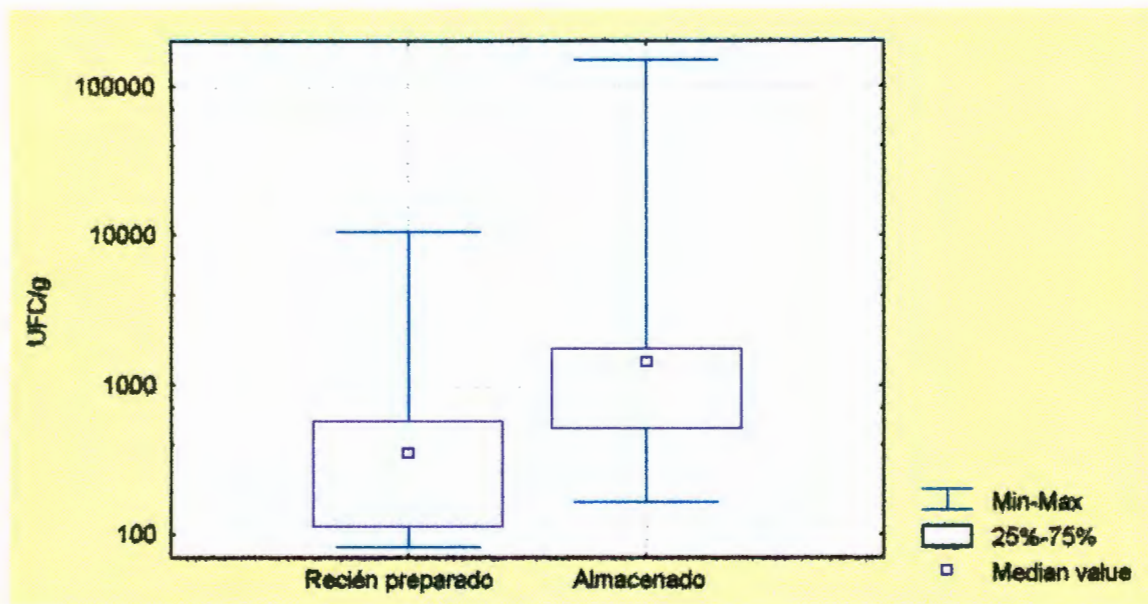


Figura 17. Contenido de BMA en guacamole recién preparado y almacenado.

(a)



(b)

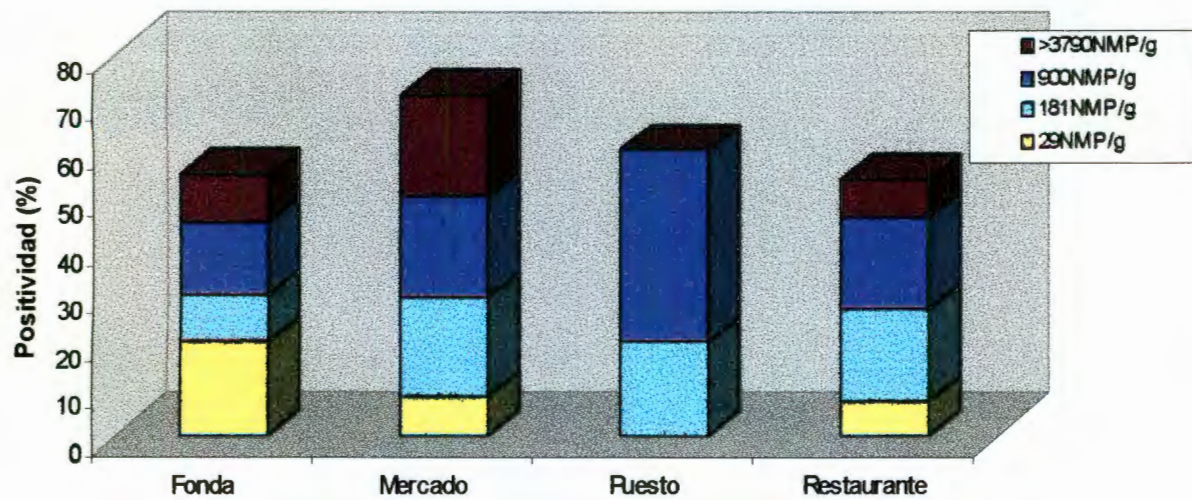


**Figura 18.** Contenido de OCT (a) y hongos (b) en guacamole recién preparado y almacenado.

El contenido de hongos en las muestras de guacamole mostró una tendencia similar a la encontrada en BMA y OCT (Figura 16a). Las medianas del contenido de hongos de los diferentes establecimientos fueron semejantes, cercanas a 1000 UFC/g. En contraste, el contenido de levaduras es diferente; la mediana de las muestras obtenidas en puestos fue casi  $1 \log_{10}$  mayor que las medianas de las muestras de los restantes establecimientos (Figura 18b). Se validó estadísticamente esta diferencia con la prueba de Kruskal-Wallis.

Cifras elevadas de levaduras en los alimentos suelen ser indicadores de deterioro. El guacamole generalmente se mantiene a temperatura ambiente en los comercios de la vía pública y el pH de todas las muestras obtenidas en estos establecimientos fue cercano a 6. Bajo estas condiciones se favorece el deterioro. Tal condición no implica necesariamente el desarrollo abundante de toda la flora microbiana de un alimento. Generalmente la alteración de un alimento particular resulta de la actividad de un grupo específico de microorganismos (Escartín, 1981). Estos resultados deben interpretarse con reserva, ya que el número de muestras analizado de guacamole obtenido de comercios de la vía pública fue mucho menor que para el resto de los establecimientos.

*E. coli* se encontró en el 60% de las muestras, es decir, por lo menos 1 de cada 2 muestras mostraba indicios de contaminación fecal. Este microorganismo indicador nos evidencia la posibilidad de que estén presentes microorganismos patógenos de origen entérico, como *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, entre otros. La positividad a *E. coli* fue alta en las muestras obtenidas de todos los establecimientos (desde 54 hasta 71%), aunque se presentaron algunas diferencias entre ellos (Figura 19): No obstante las diferencias no resultaron estadísticamente significativas aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Se encontró una gran variabilidad en el contenido de *E. coli* de las muestras de fonda, mercado y restaurante, desde  $< 29$  NMP/g hasta  $\geq 3790$  NMP/g. En el guacamole obtenido en el mercado se obtuvo la mayor incidencia de este microorganismo (71%), así como la mayor proporción de muestras contaminadas con el nivel más alto (21%).



**Figura 19.** Incidencia de *E. coli* en guacamole según tipo de establecimiento de obtención.

Esta contaminación puede provenir de los ingredientes, de la persona que prepara el alimento, o de los utensilios con los que se elabora el alimento. Si consideramos que todos los establecimientos disponen de ingredientes con calidad sanitaria semejante, las diferencias se deberían principalmente a las prácticas sanitarias que se llevan a cabo en los sitios de venta del alimento. La presencia de *E. coli* en este alimento constituye un riesgo potencial severo para los consumidores. Es una evidencia de prácticas de operación inaceptables

### 5.3.3 Microorganismos patógenos

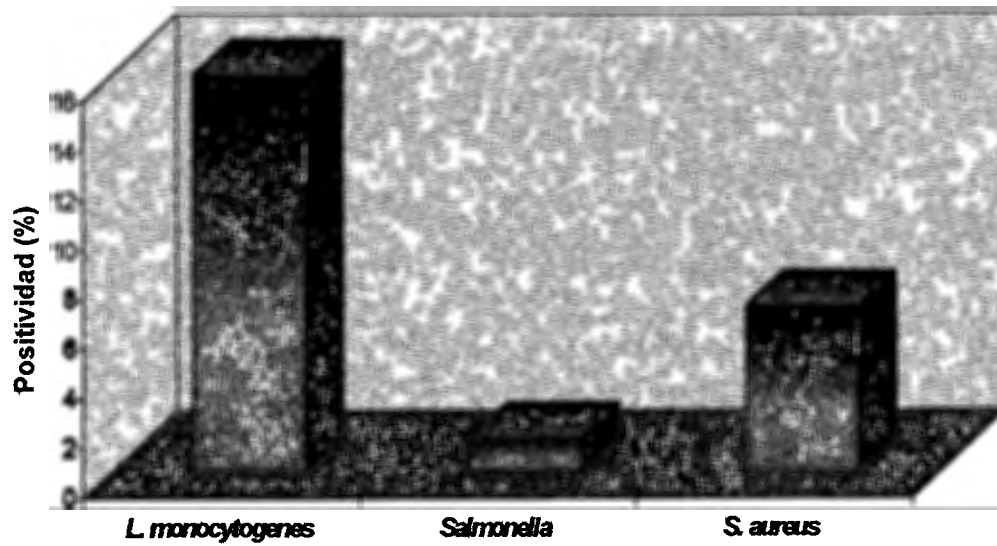
#### 5.3.3.1 *Listeria monocytogenes*

De los tres microorganismos patógenos estudiados, *L. monocytogenes* se aisló con mayor frecuencia del alimento (16%), como se aprecia en la Figura 20. Se presentaron algunas diferencias entre las muestras obtenidas de los distintos establecimientos; diferencias que son semejantes a las obtenidas para *E. coli* (Figuras 19 y 21). Las muestras de mercado presentaron la incidencia más alta para *E. coli* y para *L. monocytogenes*.

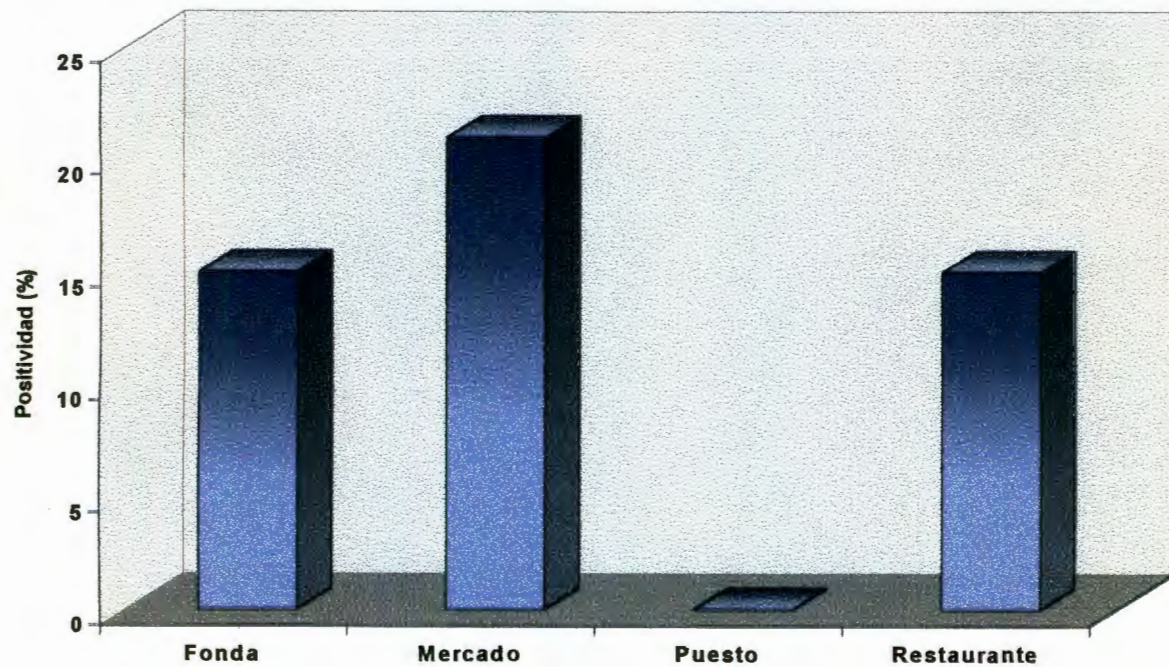
Si las muestras procedentes de puestos ~~hubieran presentado una~~ incidencia a *L. monocytogenes* semejante a las de restaurantes o fondas (15%), como ocurrió para *E. coli*, habría resultado 1 muestra positiva por ~ cada 7 muestras examinadas; como solamente se dispuso de 5 muestras, resulta poco probable el hallazgo de al menos una positiva (Figura 21).

La incidencia de *L. monocytogenes* en este alimento es menor que la reportada en productos de origen animal crudos y algunos cocidos (Tabla 18); este hecho es compatible con los reportes epidemiológicos en Estados Unidos, donde los productos de origen animal son los vehículos más frecuentes de este microorganismo (NACMC, 1991). Los quesos son alimentos importantes en varios países como vehículos de *L. monocytogenes*; la incidencia de este microorganismo en guacamole resultó mayor que la reportada en los quesos (Tabla 18).





**Figura 20.** Positividad de *L. monocytogenes*, *Salmonella*, y *S. aureus* en guacamole.



**Figura 21.** Positividad a *L. monocytogenes* en guacamole según el sitio de muestreo.

Tabla 18. Incidencia de *L. monocytogenes* reportada en diversos alimentos.

Alimento	Muestras analizadas	Positividad (%)	Ref.
Guacamole	75	16.0	
Pollo crudo	58	59.0	1
Pollo cocido	96	0.0	1
Leche cruda	650	4.2	2
Quesos (Europa)	8848	4.3	3
Alimentos cocidos a base de res	1102	30	3
Salchichas ahumadas	480	6.9	3
Verduras	64	6.2	4
Verduras (lechuga, apio, repollo, papas, tomates y ajos)	103	7.8	5
Ensaladas empacadas (lechuga, zanahoria y repollo)	71	30.0	6

1. Lawrance y Gilmour, 1994
2. Lovett y col., 1987.
3. Ryser y Marth, 1991.
4. MacGowan y col., 1994.
5. Simon y col., 1992.
6. García-Gimeno y col., 1996.

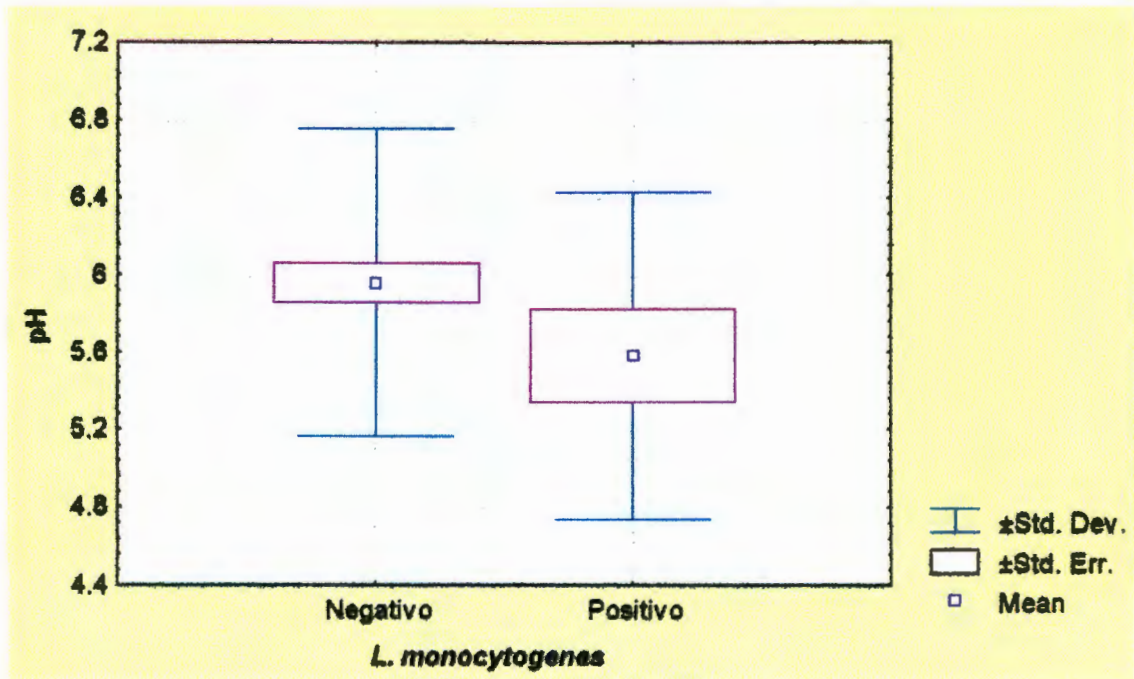
La incidencia de *L. monocytogenes* en guacamole fue mayor que la reportada para verduras en otros países (Tabla 18). A juzgar por las condiciones en las que se maneja este alimento, *L. monocytogenes* encuentra posibilidades de desarrollar en él, lo que incrementaría la posibilidad de su aislamiento.

Las muestras positivas a *L. monocytogenes* presentaron Medias de pH y del contenido de los microorganismos indicadores menores que las muestras negativas. (Figuras 22 y 23). Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis las diferencias resultaron estadísticamente significativas solamente para el contenido de BMA y de hongos. Sin embargo la tendencia se presenta en todos los microorganismos indicadores y en el pH.

El pH pudo haber influido en los contenidos microbianos de las muestras, que al ser más bajos representarían menor competencia para el patógeno. Esto no significa que a mayor carga microbiana, menor probabilidad de contener patógenos; un alto contenido de microorganismos indicadores sugiere un manejo no higiénico del alimento, lo que podría propiciar la contaminación y/o desarrollo de microorganismos patógenos. Sin embargo, un bajo contenido de indicadores no asegura la ausencia de patógenos en el alimento (Escartín, 1981). El destino de los microorganismos en un alimento lo determinan una multitud de factores (Escartín, 1981), uno de ellos es el antagonismo de algunos microorganismos sobre otros; Tal efecto es congruente con los resultados obtenidos.

Se ha observado que la mayor proporción de otros microorganismos, así como su habilidad para sobrevivir y crecer rápidamente en los caldos de enriquecimiento utilizados para aislar *L. monocytogenes*, son los factores más importantes en la interferencia de la flora asociada en esta etapa del aislamiento. La producción de agentes inhibidores de *L. monocytogenes*, parece tener un papel secundario en la competencia (Dallas y Hitchins, 1993).

(a)



(b)

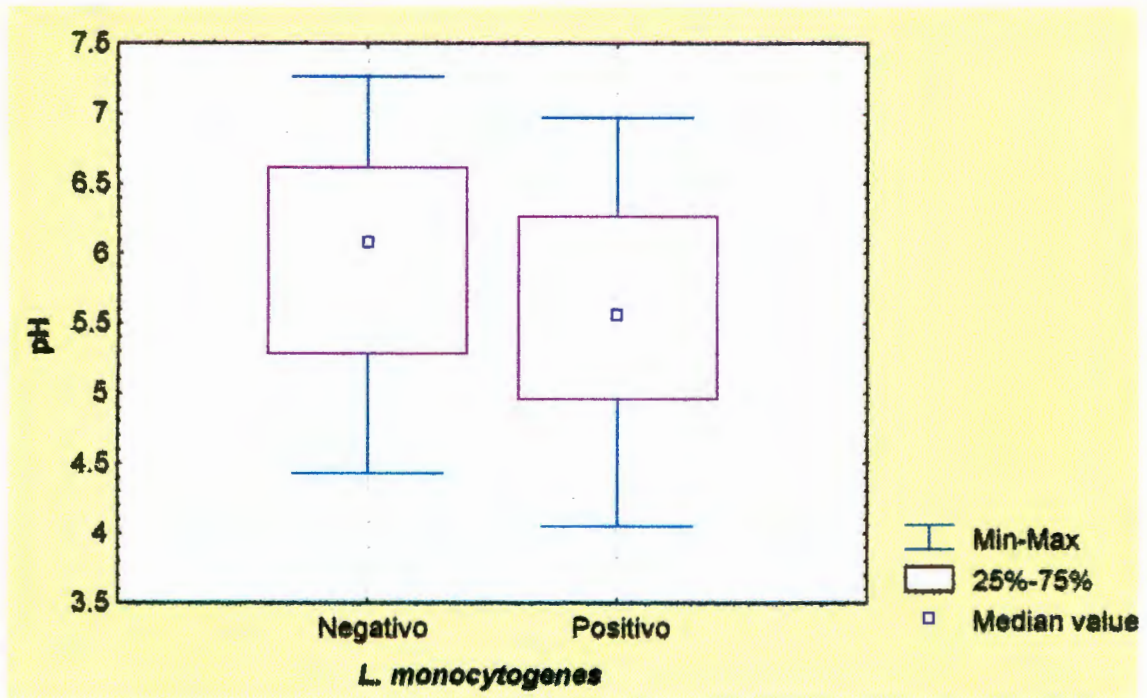


Figura 22. Relación entre el pH y la positividad a *L. monocytogenes* en guacamole.

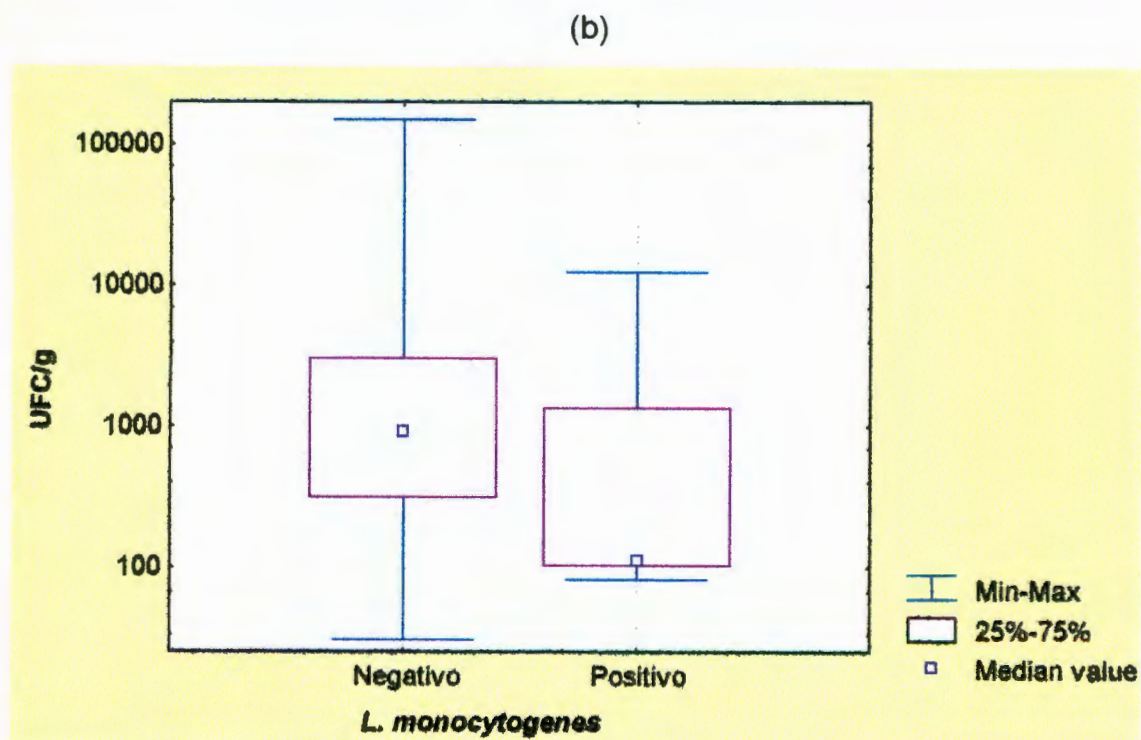
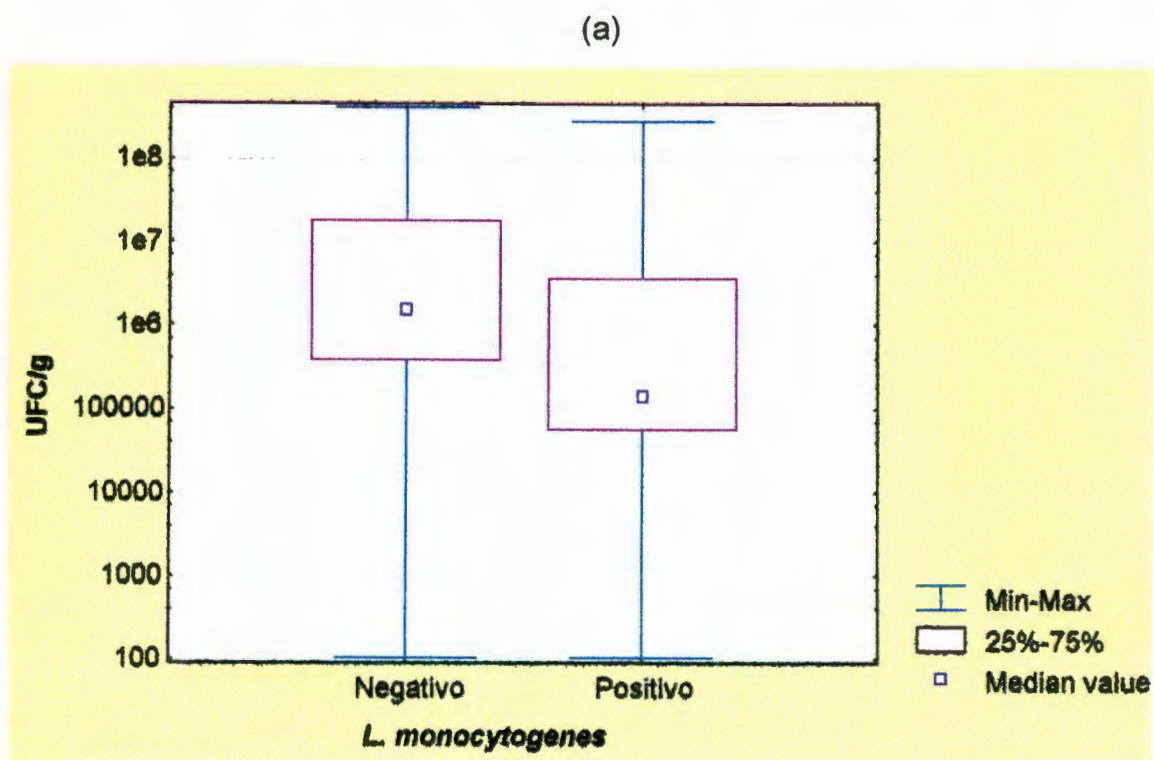


Figura 23. Contenido de BMA (a) y hongos (b) en muestras de guacamole positivas y negativas a *L. monocytogenes*.

### 5.3.3.2 *Staphylococcus aureus*

Sorpresivamente, *S. aureus* se detectó en solo 5 de 75 muestras de guacamole (6.7%). Esta incidencia podría estar causada por una tasa baja de portadores del microorganismo entre los manejadores del alimento, y/o por la abundancia de otros microorganismos que inhibieran su desarrollo; e incluso produjeran condiciones que comprometieran su sobrevivencia.

Tampoco se descarta la existencia de compuestos inhibitorios para *S. aureus* en alguno de los ingredientes del guacamole.

Se encontraron cifras de *S. aureus* entre  $9.0 \times 10^2$  a  $2.3 \times 10^5$  UFC/g de alimento; solo la cantidad más alta encontrada se acerca a la necesaria para que se acumule suficiente toxina para causar intoxicación (Jablonski y Bohach, 1997). Debe destacarse que la muestra que contenía  $2.03 \times 10^5$  tenía un pH de 4.67, el más bajo de las 5 muestras en las que *S. aureus* estaba presente. Aunque este pH no es muy favorable para el desarrollo del microorganismo, ni para la producción de la toxina, podría disminuir la actividad de algunos microorganismos que ejerzan competencia contra *S. aureus* y permitir el desarrollo de este germen, así como la producción de la toxina.

En relación con otros alimentos, la incidencia de *S. aureus* en el guacamole, puede considerarse baja; sin embargo, los niveles que encontramos del microorganismo, son superiores a la mayoría de los que se reportaron en otros trabajos (Tabla 19).

### 5.3.3.3 *Salmonella*

*Salmonella* se detectó solamente en una de las 75 muestras analizadas (Figura 20). A pesar de esta baja frecuencia, al evaluar el riesgo a la salud, se debe subrayar la presencia de *E. coli* en el 60% de las muestras, que como se indicó sugiere la posibilidad de la presencia de microorganismos patógenos entéricos en el alimento. El hecho de que se hayan presentado brotes por verduras y frutas crudas contaminadas por este tipo de gérmenes (Besser y col., 1993), confirma que el riesgo existe. La ausencia de enteropatógenos en un alimento expuesto a contaminación fecal constituye un riesgo de consideración.

Tabla 19. Incidencia de *S. aureus* en diversos alimentos. Varios autores.

Alimento	Muestras analizadas	Positividad (%)	<i>S. aureus</i> /g <sup>1</sup>
Guacamole	75	6.7	900-2.26x10 <sup>5</sup>
Carne molida de res	74	57	≥ 100
	1830	8	≥1000
	1090	9	>100
Salchicha de puerco	57	25	100
Filete de salmón	86	2	>3.6
Ostión	59	10	>3.6
Carne molida de pavo	50	6	>10
	75	80	>3.4
Pies de crema	465	1	≥25
Ensaladas	517	12	≥3

<sup>1</sup> Determinado por recuento en placa o por la técnica de número más probable (Jablonski y Bohach, 1997).



El resultado negativo en tales alimentos se explica, entre otras razones, por la ausencia del patógeno en los individuos que provocan dicha contaminación. Por tanto, el riesgo de contaminación por este tipo de patógenos al alimento quedará determinado porque alguna de las personas que manejen el producto sea un portador actual del patógeno.

El aislamiento de microorganismos patógenos de los alimentos presenta dificultades inherentes a los alimentos y a los microorganismos. Los patógenos generalmente se encuentran en bajos números en los alimentos y no suelen hallarse homogéneamente distribuidos, especialmente en alimentos heterogéneos como el guacamole. Como solamente se analizan 25 gramos del alimento, existe la posibilidad que la porción analizada no contenga al patógeno, aún cuando el alimento este contaminado. Conforme la concentración del patógeno es menor, se incrementa la probabilidad de un resultado negativo. Por ello, la investigación microorganismos patógenos en los alimentos como único criterio para evaluar su inocuidad, puede conducir a interpretaciones erráticas.

El uso de los microorganismos indicadores permite evidenciar prácticas inadecuadas, desde el punto de vista sanitario, que puedan propiciar la contaminación o el desarrollo de microorganismos patógenos. La presencia y número de microorganismos indicadores permite visualizar los riesgos potenciales, es decir aquellos riesgos que en cualquier ocasión podrían expresarse y hacer al alimento riesgoso.

En Malasia y Egipto se han encontrado incidencias de *Salmonella* en verduras, semejantes a la que observamos en esta investigación (Arumugaswamy y col., 1995; Saddik y col., 1985). En Malasia se encontró *Salmonella* en una de 24 muestras de verduras (4%), mientras que en Egipto solo 2 de 57 resultaron positivas (3.5%).

## 5.1 Comportamiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en pulpa de aguacate.

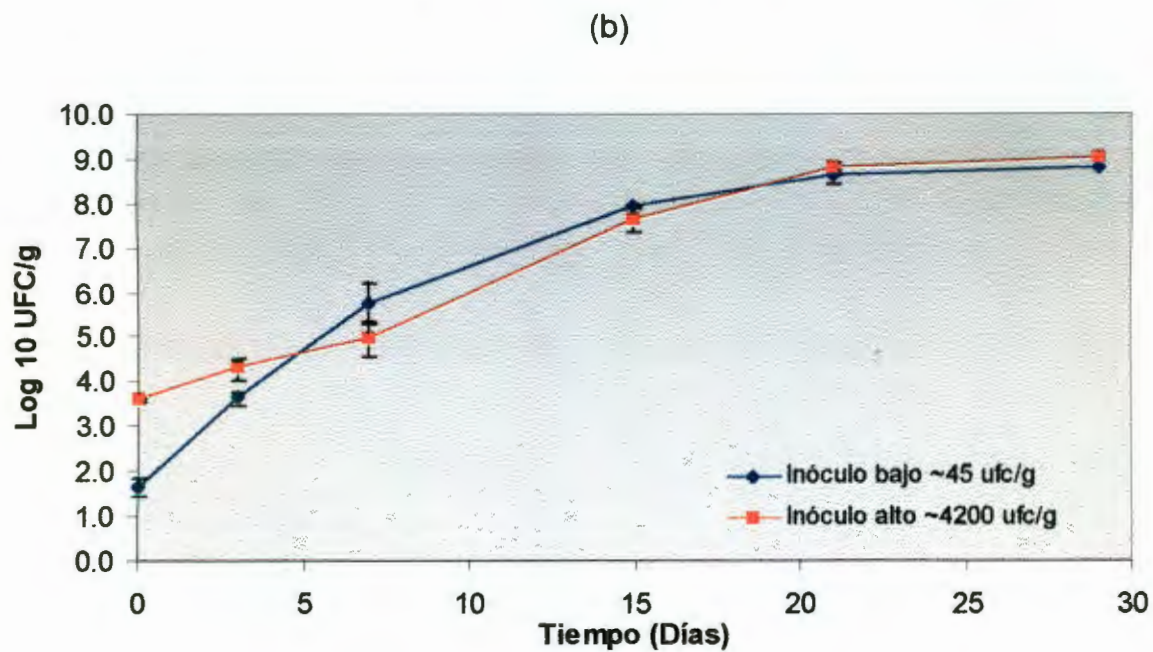
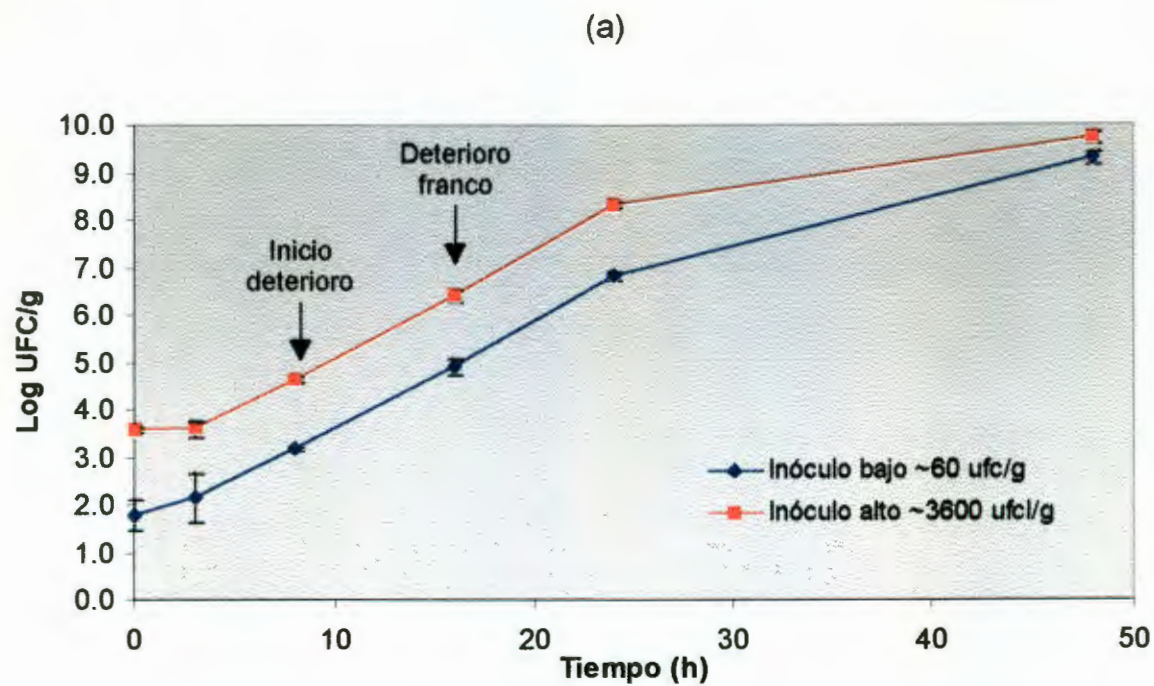
A pesar de que por su composición, la pulpa de aguacate no parecería un buen sustrato para el desarrollo de los microorganismos, todos los microorganismos patógenos ensayados y la flora naturalmente presente mostraron amplio potencial para desarrollarse en este sustrato. Esto confirma la posibilidad de que, los altos contenidos microbianos encontrados en las muestras de guacamole comercial sean el producto de actividad microbiana.

### 5.1.1 *Listeria monocytogenes*

Este microorganismo fue el único que desarrolló en las dos condiciones de temperatura probadas: 22°C y refrigeración (Figura 24). El comportamiento de este microorganismo en la pulpa de aguacate sigue una curva de crecimiento bacteriano clásica. El desarrollo de los dos niveles de inóculo tienden a converger. Este comportamiento es más evidente a temperatura de refrigeración, donde desde la fase logarítmica ya se detectaban números del patógeno similares con los dos niveles de inóculo.

A 22°C el crecimiento del germen es activo desde cerca de las 3 horas de almacenamiento (Figura 24a). Aparentemente con inóculo bajo se inicia el desarrollo antes de las 3 horas, sin embargo si consideramos la magnitud de la dispersión que se presentó en los dos primeros puntos de esa curva de crecimiento, no existe diferencia entre ellos. El error fue mayor en estos dos puntos ya que los recuentos se acercaban al límite de detección de la técnica empleada (extensión en superficie).

El deterioro de la pulpa de aguacate se inicia aproximadamente a las 8 horas de almacenamiento con un ligero oscurecimiento del producto. En ese momento los niveles del patógeno se encontraban próximos a 1400 UFC/g con el nivel de inóculo bajo y de  $4.1 \times 10^4$  UFC/g con el alto; lo que significa un incremento de 24 veces el nivel inicial de células para el inóculo bajo y de un poco más de 11 veces para el alto. En la práctica este alimento puede llegar a conservarse en los



**Figura 24.** Comportamiento de *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate almacenada a: (a) 22° y (b) 4-7°C.

lugares de venta y a temperatura ambiente hasta 9 horas, por lo que los incrementos observados son factibles de presentarse.

*L. monocytogenes* generalmente se encuentra en los alimentos en número bajos (Rocourt y Cossart, 1997):

- Leche <1 a 10 UFC/g
- Helado de crema <1 UFC/g
- Carne cruda y productos cárnicos <10 a 100UFC/gLangosta y ostras listas para consumir 0.2 a 2 UFC/g
- Pescado congelado <100UFC/g

En otros alimentos, como el queso se han encontrado desde 10 hasta  $10^7$  UFC/g; en pescado ahumado se han detectado cifras superiores a  $10^4$  UFC/g (Rocourt y Cossart, 1997). Estos elevados números que representan un serio riesgo a la salud, se presentan en alimentos que permiten el desarrollo del patógeno, y que por su forma de fabricar y manejar proporcionan condiciones favorables al desarrollo de este microorganismo; características que cumple el guacamole.

La pendiente y la duración de la fase logarítmica que presenta *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate a 22° son muy semejantes con ambos niveles de inóculo (Figura 24a). Modelando esta fase para los dos niveles de inóculo se tienen las siguientes ecuaciones:

$$\text{Inóculo alto} \quad Y = 0.2258X + 2.8383 \quad R^2 = 0.9990$$

$$\text{Inóculo bajo} \quad Y = 0.2226X + 1.4039 \quad R^2 = 0.9992$$

donde:

Y es el  $\log_{10}$  de UFC/g en un tiempo X.

El término independiente es el intercepto en el eje de las ordenadas (b).

Los valores de b son aproximadamente 0.8 veces el inóculo expresado en  $\log_{10}$ . Conociendo este valor y calculando el promedio de las dos pendientes se puede obtener una sola ecuación que defina el desarrollo logarítmico de *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate a 22°C:

$$Y = 0.2242X + 0.8 [\log_{10}(\text{inóculo})]$$

Por ejemplo, si se parte de una pulpa de aguacate con 3 UFC/g, y se almacena por 8 horas (inicio del deterioro), se tendrán 2.18 log<sub>10</sub> de UFC/g, es decir 150UFC/g. En los brotes ocurridos por *L. monocytogenes* se ha calculado que los alimentos responsables del brote contenían más de 100UFC/g; pero como este microorganismo desarrolla en refrigeración y siempre existe un lapso de tiempo entre la aparición del brote y el análisis del alimento se considera que ese número debe ser más bajo (Rocourt y Cossart, 1997).

En mercados y puestos de la vía pública se ha observado el uso de sobranes, los cuales se mezclan con alimento recién preparado. Si el sobrante de guacamole estuviera contaminado con 10 UFC/g y hubiera permanecido 4 horas a 22° C, de acuerdo con el modelo anterior se habrían detectado cerca de 50 UFC/g. Si una porción de este guacamole se mezclara con nuevo alimento, y se mantuviera a la misma temperatura por 4 horas más, la concentración final sería de 180 UFC de *L. monocytogenes* de pulpa de aguacate. Esto es, considerando que nuevamente se presentara una fase lag de 3 horas. Sin embargo, se esperaba que estos microorganismos estuvieran adaptados al sustrato y no presentaran fase lag, o esta fuera muy corta. Si no existiera fase lag, al cabo de las 4 horas de almacenamiento se tendrían 848 UFC de *L. monocytogenes* por gramo de pulpa de aguacate. Utilizando las siguientes ecuaciones se calculó el tiempo de generación para ambos niveles de inóculo (Kasrazadeh y Ginegeorgis, 1994):

$$TG = \ln 2/K$$

donde:

TG : Tiempo de generación

K : Velocidad específica de crecimiento = 2.302 m

m: Pendiente de la fase logarítmica.

Para el inóculo bajo el tiempo de generación fue 1.35 h, y para el inóculo alto de 1.33 h. Estos tiempos de generación son muy semejantes a los que presenta *L. monocytogenes* en leche de soya a 22° C (Tabla 20), pero hay que observar en pulpa de aguacate (Fase lag= 3h) el crecimiento inicia aproximadamente 1 hora antes que en leche de soya (Ferguson y Shelef, 1990).

**Tabla 20.** Tiempo de generación de *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate conservada a 22°C comparado con otros alimentos a temperaturas similares.

Substrato	Temperatura (°C)	Tiempo de Generación (h)	Ref.
Caldo soya tripticasa	20	1.88	1
Huevo entero (tratamiento térmico)	20	2.6	2
Leche con chocolate	21	1.72	3
Leche entera	21	1.86	3
Suero de leche (6% de NaCl)	22	3.67	4
Leche de soya	22	1.33	5
<b>Pulpa de aguacate</b>	<b>22</b>	<b>1.35</b>	

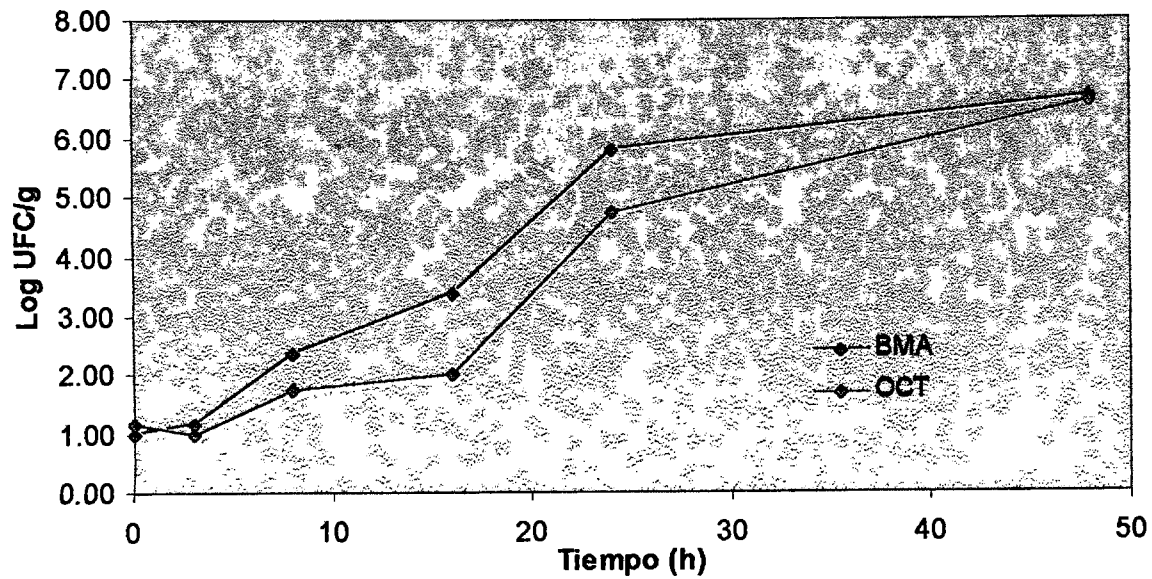
1. Petran y Zoioia, 1989.
2. Sionkowski y Shelef, 1990.
3. Ryser y Marth, 1991.
4. Papageorgiou and Marth, 1989.
5. Ferguson y Shelef, 1990.

En la tabla 20 se advierte que el tiempo de generación que presenta *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate es semejante al que se presenta en leche; la leche que es un alimento muy completo que contiene azúcares sencillos, proteínas, grasas, vitaminas, y un pH y actividad de agua muy favorables al desarrollo microbiano. La pulpa de aguacate parece ser un buen sustrato para el desarrollo de *L. monocytogenes*.

También es destacable el número que alcanza *L. monocytogenes* en la pulpa de aguacate. Después de 48h de incubación a 22°C se detectó un poco más de 9 log<sub>10</sub> UFC/g con los dos niveles de inóculo (Figura 24). El comportamiento de la flora asociada se estudió en muestras no inoculadas con *L. monocytogenes* (Figura 25). A pesar que inicialmente se partió con niveles muy bajos de BMA y OCT en la pulpa de aguacate, las cifras se incrementaron rápidamente hasta alcanzar cerca de 7 log<sub>10</sub> de UFC/g en las 48 horas que duró el estudio.

En refrigeración, *L. monocytogenes* alcanzó niveles de 1.5x10<sup>8</sup> y 1.0x10<sup>9</sup> al cabo de 4 semanas de almacenamiento para el nivel de inóculo bajo y alto, respectivamente (Figura 24b). En este caso, solamente la curva de crecimiento del inóculo bajo presenta una fase logarítmica definida. Considerando los primeros tres puntos de la línea se obtuvo el valor de la pendiente y se calculó el tiempo de generación. El valor obtenido fue de 0.52 días, es decir 12.4 h.

Es evidente que a temperaturas de refrigeración (3.5-7.5°C) el desarrollo de *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate es relativamente rápido. En huevo líquido pasteurizado a 4°C el tiempo de generación es de 24-26h, y a 10°C de 7.8-12h (Ryser y Marth, 1991). En jamón rebanado empacado al vacío e inoculado con 0.2 y 500 UFC/g, *L. monocytogenes* alcanzó 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/g en 4 semanas a 4.4°C independientemente del nivel de inóculo (Glass y Doyle, 1989). En un estudio con pollo cocido y rebanado almacenado a 4.4°C con 2.79 log<sub>10</sub> de UFC/g como inóculo, se detectaron 6.94 log<sub>10</sub> de UFC/g después de 14 días (Ryser y Marth, 1991); en pulpa de aguacate al cabo del mismo tiempo, la cifra que se obtuvo fue de 7.6-7.9 log<sub>10</sub> de UFC/g.



**Figura 25.** Comportamiento de BMA y OCT nativos de pulpa de aguacate almacenada a 22°C.



Cuando se compara el comportamiento de *L. monocytogenes* en pulpa de aguacate y en productos de origen animal como el huevo y el pollo, no hay duda que se trata de un buen substrato para el desarrollo del patógeno; con lo que se confirma el riesgo potencial de listeriosis que constituye el guacamole.

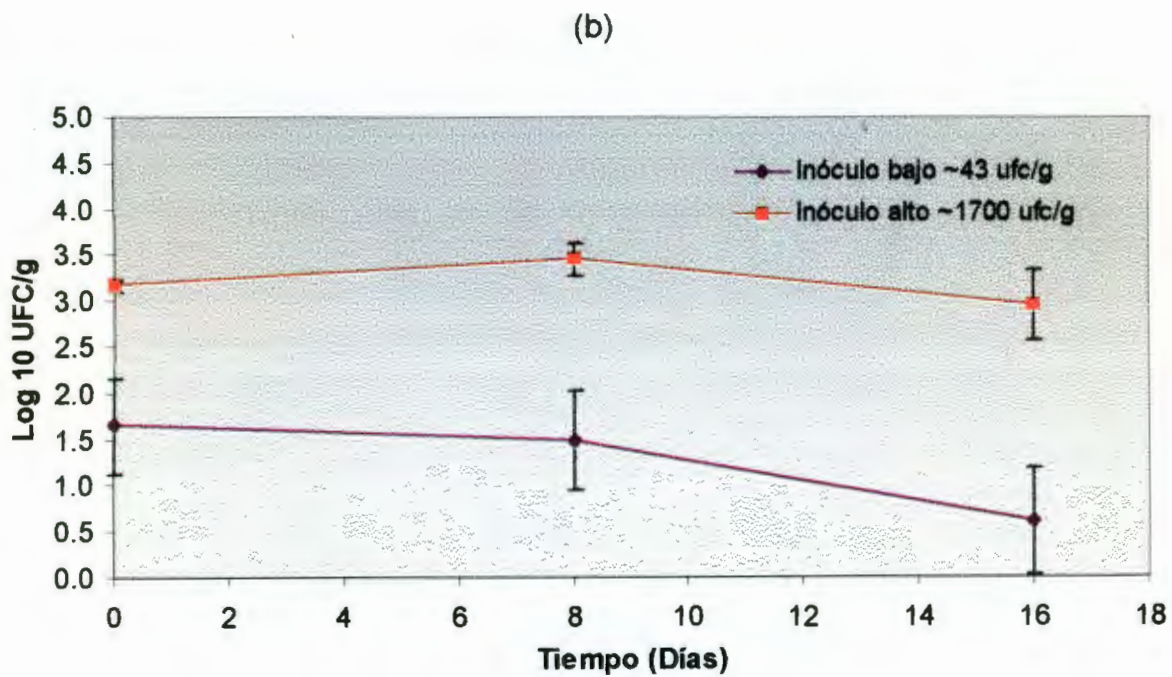
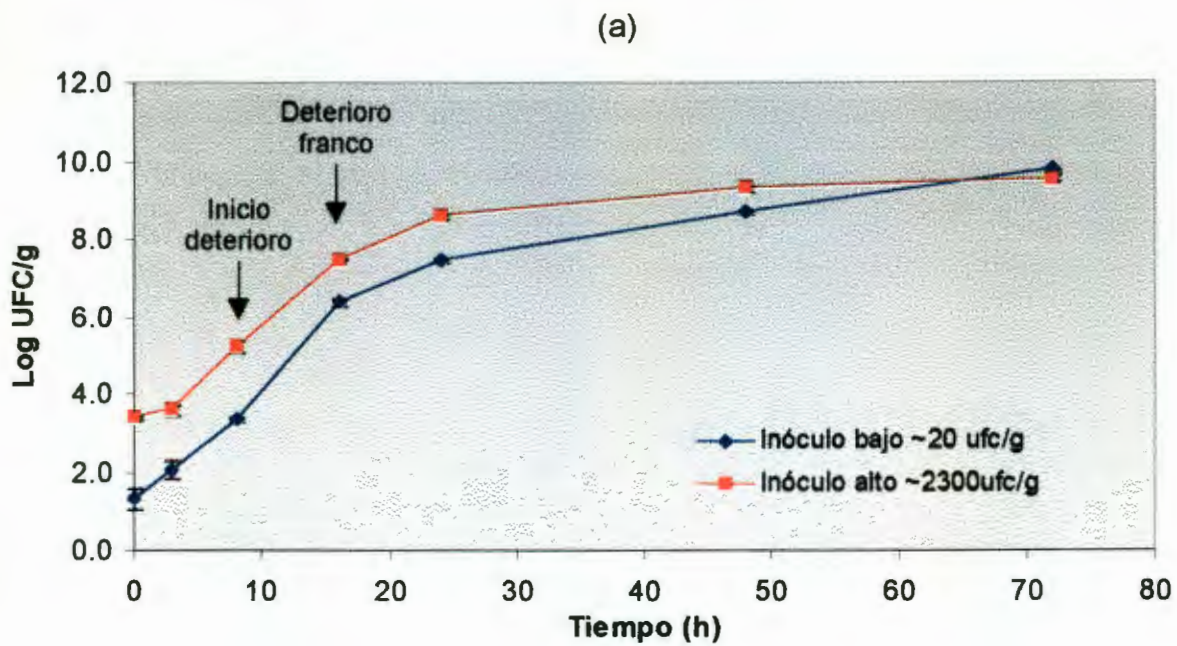
La refrigeración disminuye la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que la conservación de pulpa de aguacate y guacamole a bajas temperaturas por tiempos cortos (algunas horas) disminuye el riesgo por este microorganismo.

### 5.1.2 *Salmonella*.

De los cuatro microorganismos estudiados *Salmonella* fue el más activo a 22°C (Figura 26a). Para obtener la curva de crecimiento completa el estudio se llevó a cabo durante 72 h. El deterioro de la pulpa de aguacate se inició a las 8 horas de almacenamiento; a las 16 horas se percibían olores desagradables y un oscurecimiento intenso. El inicio del deterioro se presentó en pleno crecimiento logarítmico del patógeno, cuando se tenían ~ 5 y 3 log<sub>10</sub> de UFC/g para el inóculo alto y bajo, respectivamente.

Las pendientes de la fase logarítmica de los dos niveles de inóculo fueron distintas, siendo mayor la del inóculo bajo. Sin embargo, esta diferencia no afectó de manera significativa los tiempos de generación, que fueron de 60.8 minutos para el inóculo alto y de 53.6 minutos para el bajo. Ambos tiempos de generación son semejantes a los que presenta *Salmonella* en otros alimentos.

En leche almacenada a 20°C *Salmonella* spp crece a una velocidad de 0.450 h<sup>-1</sup>, con un tiempo de generación de 1.54 h, mientras que a 30°C la velocidad de crecimiento es de 0.936 h<sup>-1</sup> y el tiempo de generación de 44.4 minutos (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1994). En la pulpa de aguacate la velocidad de crecimiento de *Salmonella* fue de 0.684 h<sup>-1</sup> para el inóculo alto y de 0.776 h<sup>-1</sup> para el inóculo bajo. También para *Salmonella* la pulpa de aguacate resultó ser un substrato tan favorable como la leche.



**Figura 26.** Comportamiento de *Salmonella* en pulpa de aguacate almacenada a: (a) 22°C y (b) en refrigeración (3.4-8.0°C).

Otros componentes del guacamole también permiten el desarrollo de *Salmonella*. Por ejemplo, Zhuang y col., (1995) encontraron que *S. montevideo* en jitomates maduros y picados incrementaba ~1.5 y 2.5 log<sub>10</sub> UFC/g después de 22 h de almacenamiento a 20 y 30°C, respectivamente.

Aunque el desarrollo de *Salmonella* parece ser más lento en el jitomate que en pulpa de aguacate, se incrementa la posibilidad del desarrollo de patógenos que contaminen el guacamole, cuando este se almacene en condiciones de temperatura inadecuadas.

Es importante comparar el comportamiento de *Salmonella* en productos de origen animal, ya que estos alimentos son frecuentemente vehículos de este microorganismo. En carne de res cocida, deshebrada e inoculada con 220 UFC/g de *Salmonella typhimurium*, este microorganismo alcanza 2500 UFC/g cuando se almacena a 20°C por 8 horas (Escartín, y col. 1993); en pulpa de aguacate en ese mismo período, pero a 22°C y con un inóculo de 20UFC/g, la concentración final es de 2100 UFC/g. Aparentemente la diferencia entre la capacidad de carne de res cocida y pulpa de aguacate para sostener el desarrollo de *Salmonella*, no es muy grande.

Se ha demostrado que otros frutos, como la sandía permiten el crecimiento de microorganismos patógenos entéricos (Escartín, y cols., 1989). *Salmonella typhi* desarrolla en una suspensión al 20% de sandía almacenada a 22°C, y alcanza a las 24 horas 7.53 log<sub>10</sub>UFC/mL. Con los datos que se proporcionan en esa publicación calculamos la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación, que resultaron de 0.656 h<sup>-1</sup> y 1.06 h, respectivamente. Los valores son muy semejantes a los que se obtuvieron con pulpa de aguacate.

*Saimonella* es un germen infeccioso, y por tanto a mayor número de microorganismos en los alimentos mayor será el riesgo para el consumidor.

Durante el almacenamiento en refrigeración *Salmonella* mantuvo sus niveles iniciales por 8 días y después tendió a disminuir (Figura 26b). La conservación de la pulpa de aguacate en refrigeración elimina el riesgo de desarrollo de *Salmonella*, sin embargo algunos serotipos de ese microorganismo muestran dosis infectantes bajas, de tal forma que algunas células que contaminen el alimento podrían causar daño al consumidor. La refrigeración como

única medida para asegurar la inocuidad de este alimento no es suficiente, sí bien debe considerarse como una medida complementaria.

### 5.1.3 *Escherichia coli* O157:H7

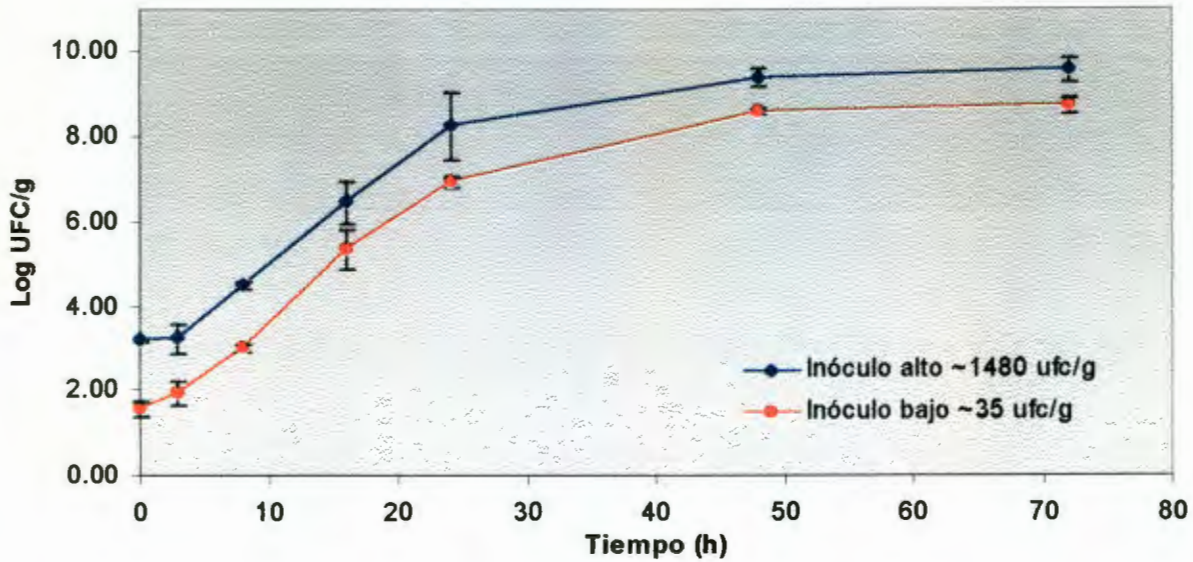
*E. coli* O157:H7 como los otros patógenos, desarrolló activamente en la pulpa de aguacate conservada a 22°C (Figura 27). Sin embargo, a diferencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella*, los dos niveles de inóculo de *E. coli* O157:H7 no alcanzaron el mismo número de microorganismos en la fase estacionaria. Para corroborar estos resultados el estudio se repitió en dos ocasiones, con el mismo comportamiento. En la Figura 27 se muestran dos de los tres estudios realizados.

En general, las velocidades de crecimiento y los tiempos de generación de los dos niveles de inóculo en ambos estudios fueron similares; las mayores diferencias se presentaron entre los niveles bajos de los dos estudios (Tabla 21). La cantidad de microorganismos inoculados en los dos estudios es muy semejante, como se puede ver en la Figura 27.

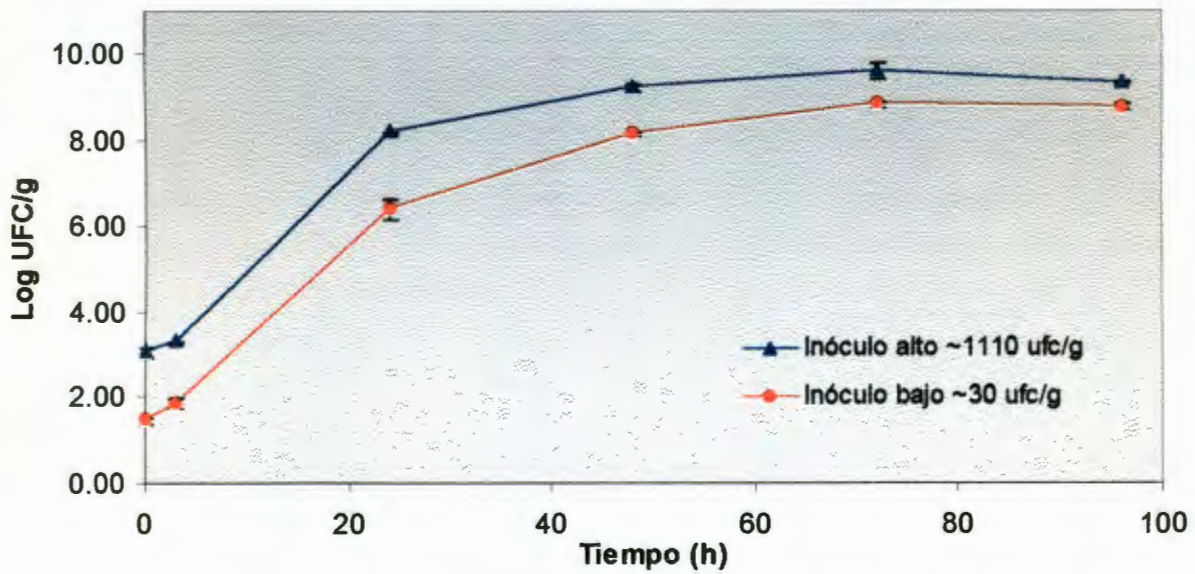
Aparentemente la flora asociada, influye en el comportamiento de *E. coli* O157:H7. En el primer estudio para el nivel de inóculo bajo, la flora nativa de la pulpa de aguacate se encontraba en el inicio aproximadamente medio  $\log_{10}$ UFC/g por encima del patógeno; la fase lag fue de 3h, en contraste, *E. coli* O157:H7 solo requirió 1.42 h para iniciar su crecimiento (Figura 28a). Esta diferencia en la duración de las fases lag permitió al patógeno compensar la menor proporción en la que se encontraba; de tal forma que cuando la flora asociada empezó a desarrollar *E. coli* O157:H7 ya se encontraba en igualdad numérica. Los niveles alcanzados por la flora y por el patógeno al final de este primer estudio fueron muy semejantes (Figura 28a).

En el segundo estudio con el mismo nivel de inóculo, la flora asociada también se encontraba en números superiores a *E. coli* O157:H7, pero en este caso aparentemente la flora presentó una fase lag mínima, mientras que el patógeno inició la fase logarítmica después de 1.26 h (Figura 28b). A las tres horas de incubación a 22°C la flora asociada se encontraba 1.5  $\log_{10}$ UFC/g por arriba de *E. coli* O157:H7, es decir un poco más de 38 veces el nivel del

(a)



(b)

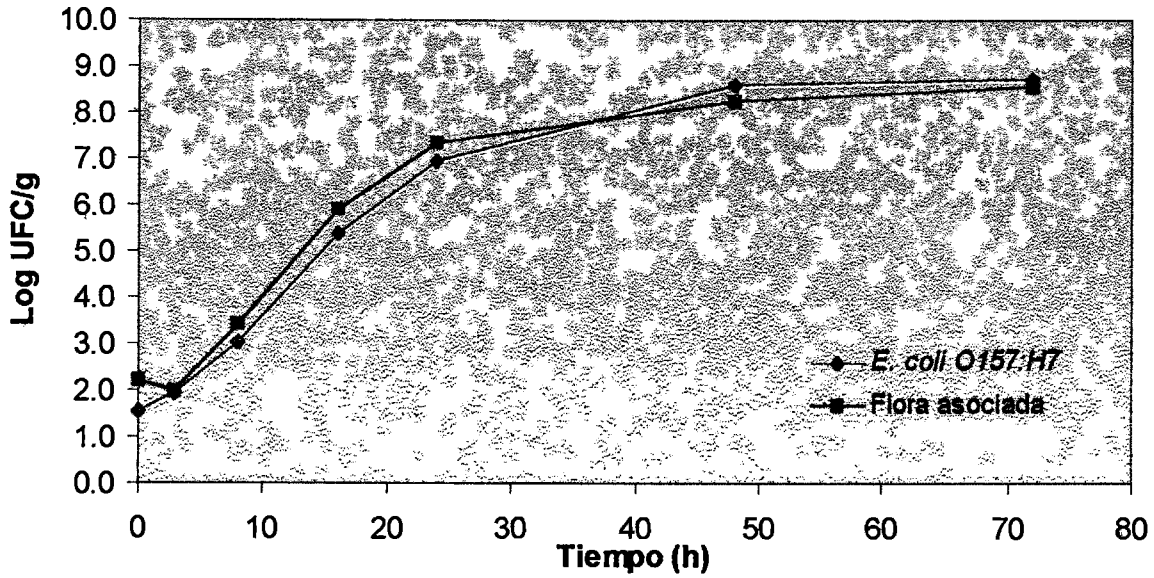


**Figura 27.** Comportamiento de *E. coli* O157:H7 en pulpa de aguacate almacenada a 22°C. (a) y (b) muestran estudios independientes. Las barras verticales en las gráficas muestran una desviación estándar de cada punto.

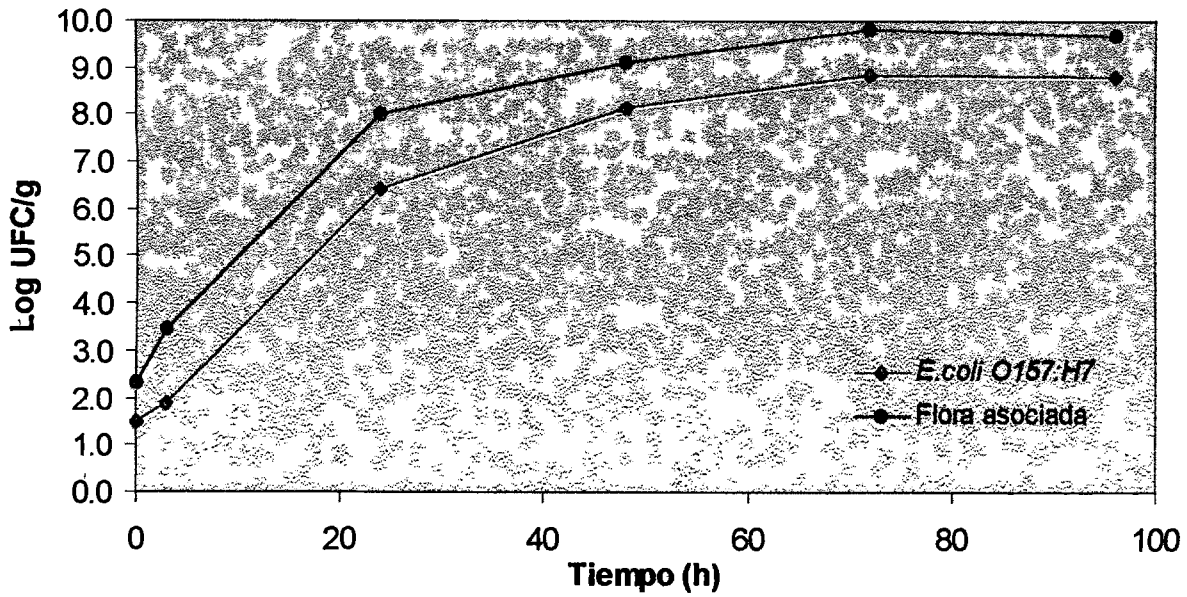
**Tabla 21.** Velocidad de crecimiento y tiempo de generación en dos estudios del comportamiento de *E. coli* O157:H7 en pulpa de aguacate a 22°C con dos niveles de inóculo.

Nivel de inóculo	Estudio	Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (h)
Alto	1	0.5499	1.26
	2	0.5372	1.29
Bajo	1	0.5625	1.23
	2	0.4983	1.39

(a)



(b)



**Figura 28.** Comportamiento del nivel de inóculo bajo de *E. coli* O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada a 22°C. En a y b se muestran estudios independientes.

patógeno; esta diferencia se mantuvo durante toda la fase logarítmica. Aparentemente, la flora asociada fue un factor importante en la disminución de la velocidad de crecimiento de *E. coli* O157:H7, extendiendo el tiempo de generación de ~1.23 a 1.39 h.

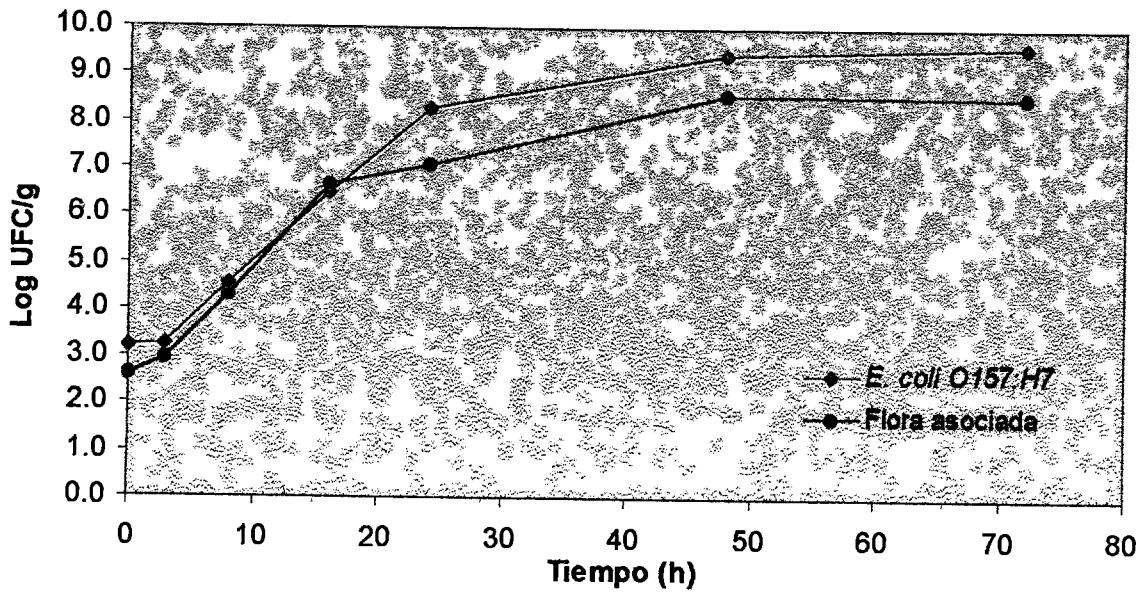
En el primer estudio, el nivel de inóculo alto se encontraba en concentraciones más próximas al de la flora asociada (Figura 29); pero como la flora asociada presentó una fase lag de 3 h, *E. coli* O157:H7 alcanzó niveles aproximadamente de 1 log<sub>10</sub>UFC/g mayor que esa flora desde las 24h de almacenamiento. El crecimiento acelerado de los microorganismos asociados concluyó a las 16 horas y alcanzó un nivel máximo de 8.52 log<sub>10</sub>UFC/g a las 48 h, mientras que para *E. coli* O157:H7 la fase logarítmica se prolongó hasta las 24 h, y alcanzó 9.56 log<sub>10</sub> UFC/g a las 48 h.

En el segundo estudio, donde la flora asociada aparentemente no presentó fase lag, tanto la fase logarítmica de la flora asociada, como la de *E. coli* O157:H7 terminaron a las 24 h; ambos alcanzaron número finales semejantes, de ~9.4 log<sub>10</sub>UFC/g. Aunque la velocidad de crecimiento del patógeno no resultó tan afectada como ocurrió en el nivel de inóculo bajo, se obtuvo un tiempo de generación más grande en el segundo estudio que en el primero (Tabla 21). La flora asociada presente en la pulpa de aguacate del segundo estudio parecía estar adaptada a ese substrato, porque aparentemente no presentó fase lag y a las 3 h de almacenamiento ya se encontraba en fase logarítmica. Probablemente estos microorganismos eran diferentes a los que se encontraban en la pulpa de aguacate del primer estudio; podría tratarse de microorganismos que ya se encontraban activos en la pulpa de aguacate y por esta razón la fase lag fue tan corta, que no fue posible detectarla.

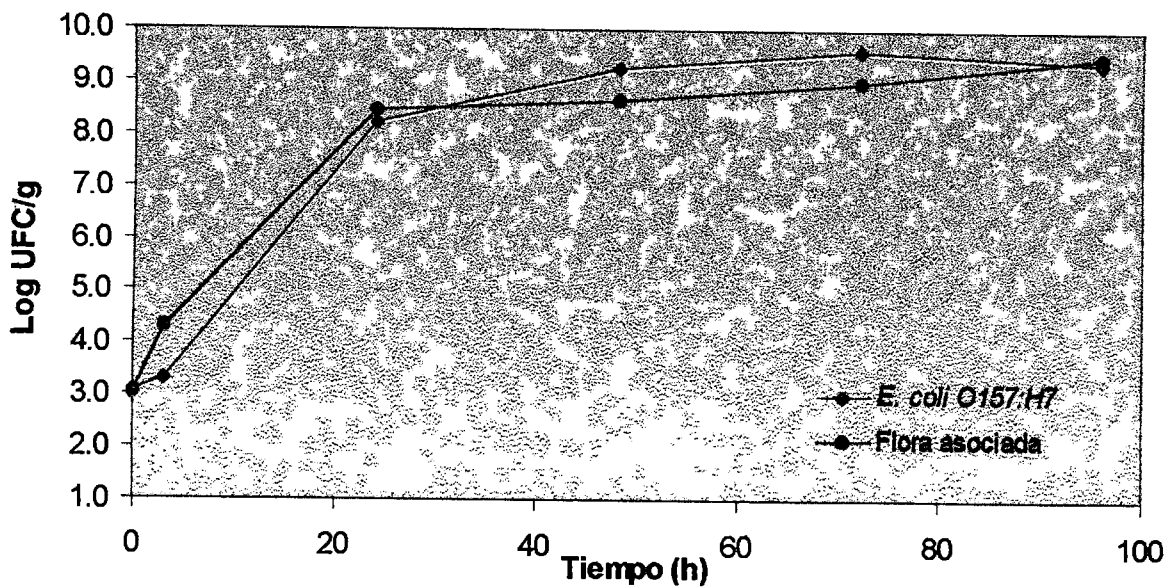
Estos resultados sugieren que la influencia de la flora asociada sobre el comportamiento de los microorganismos patógenos no solo depende del número de competidores en el alimento, sino también del tipo y de las condiciones metabólicas en las que se encuentren dichos competidores.



(a)



(b)



**Figura 29.** Comportamiento del nivel de inóculo alto de *E. coli* O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada a 22°C. En a y b se muestran dos estudios independientes.

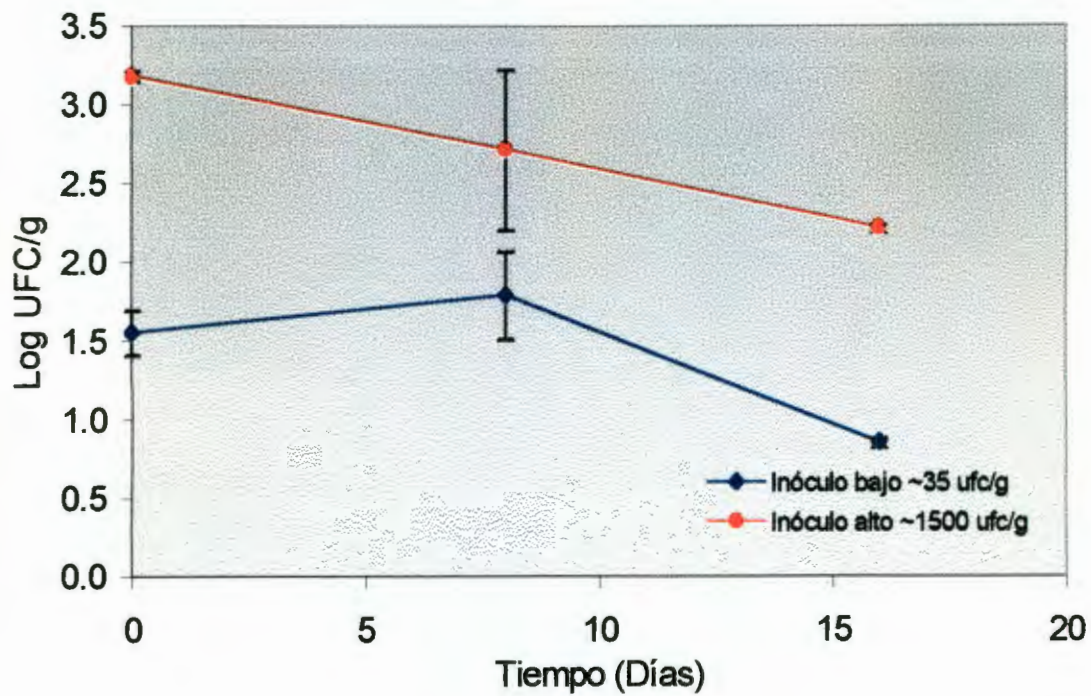
La competencia e inhibición que la flora asociada ejerce sobre los patógenos se ha demostrado en muchos alimentos, principalmente en alimentos crudos que presentan altas cargas microbianas, o en alimentos fermentados por el tipo y número de microorganismos que contienen (Upton, 1995; Schaack y Marth, 1988).

La pulpa de aguacate constituye un medio adecuado para el crecimiento de *E. coli* O157:H7, considerando que en caldo soya tripticasa a pH 7.3 y 25°C *E. coli* O157:H7 presenta un tiempo de generación de 1.46h (Doyle y Schoeni, 1984). La dosis infectante de *E. coli* O157:H7 es baja, se estima en algunos cientos de células; en los alimentos responsables de brotes se han encontrado concentraciones hasta de 0.3 células /g (Doyle y col., 1997).

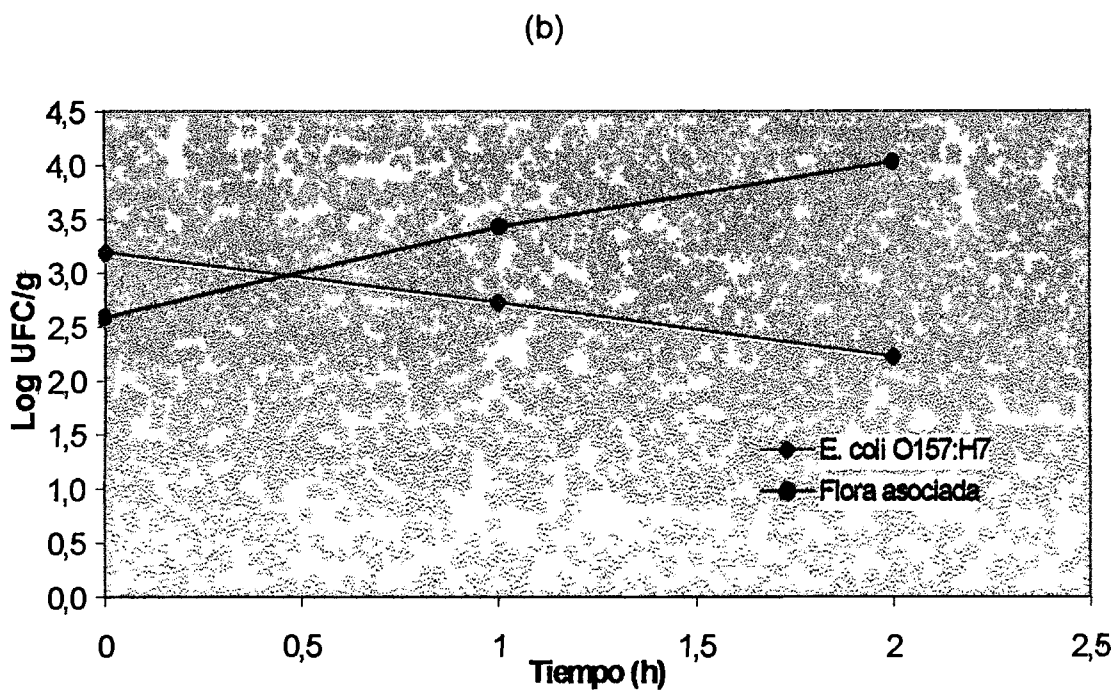
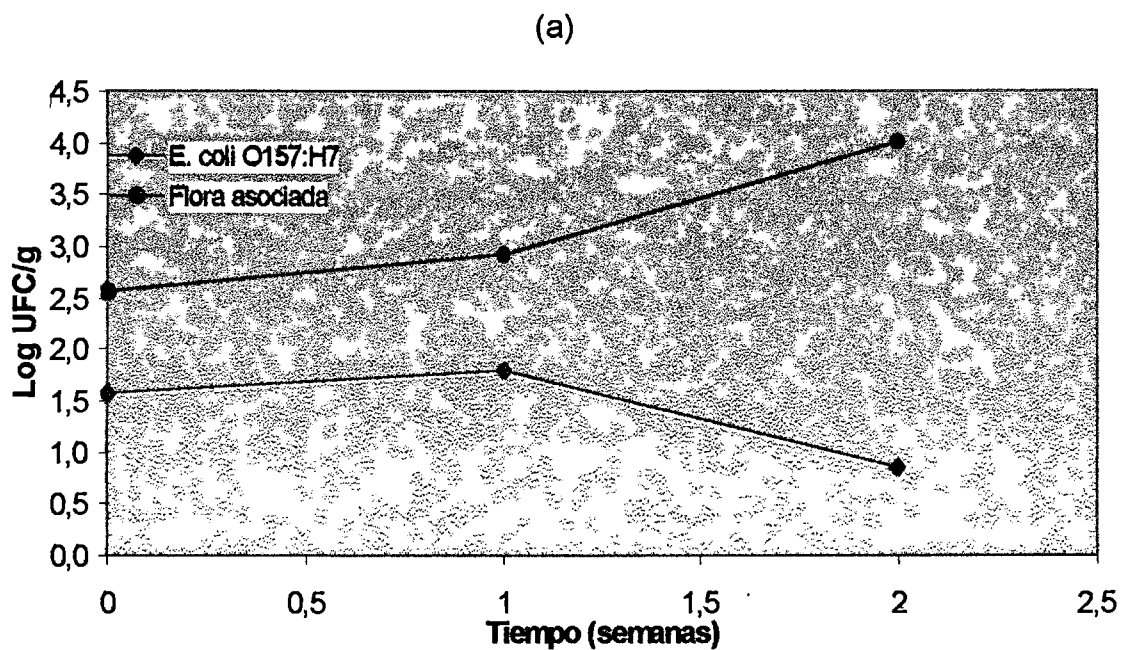
La contaminación de un alimento por este germen y su sobrevivencia son eventos suficientes para que dicho alimento represente un serio riesgo a la salud del consumidor. Sin embargo, como ya se ha comentado a mayor cantidad de microorganismos mayor será el riesgo de enfermar; por tanto los alimentos que permiten el desarrollo de los microorganismos patógenos deben constituir una prioridad en las acciones de prevención y control de las ETAs.

En refrigeración *E. coli* O157:H7 tiende a disminuir, como se muestra en la Figura 30. Aunque los dos niveles de inóculo presentan un comportamiento similar; la línea del nivel de inóculo bajo empieza a disminuir hasta después de 8 días de almacenamiento, mientras que esta tendencia se presenta desde el inicio con el nivel de inóculo alto. Por otra parte, el comportamiento de la flora asociada en los dos niveles de inóculo fue diferente.

En el nivel de inóculo bajo la flora asociada al igual que *E. coli* O157:H7 no modifican sus niveles sustancialmente a los 8 días de almacenamiento; a partir de entonces, el desarrollo de la flora asociada es manifiesto, en coincidencia con la disminución del patógeno (Figura 31a). En el nivel de inóculo alto desde los 8 días de almacenamiento la flora asociada se incrementó, y pudo haber liberado compuestos nocivos para el patógeno, dando por resultado un proceso antagónico.



**Figura 30.** Dinámica de *E. coli* O157:H7 en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración (1-11°C). Las barras de error representan  $\pm$  una desviación estándar de cada punto (media de tres réplicas).



**Figura 31.** Comportamiento de *E. coli* O157:H7 y de la flora asociada en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración (1-11°C). En (a) se muestra el nivel bajo de inóculo y en (b) el nivel alto.

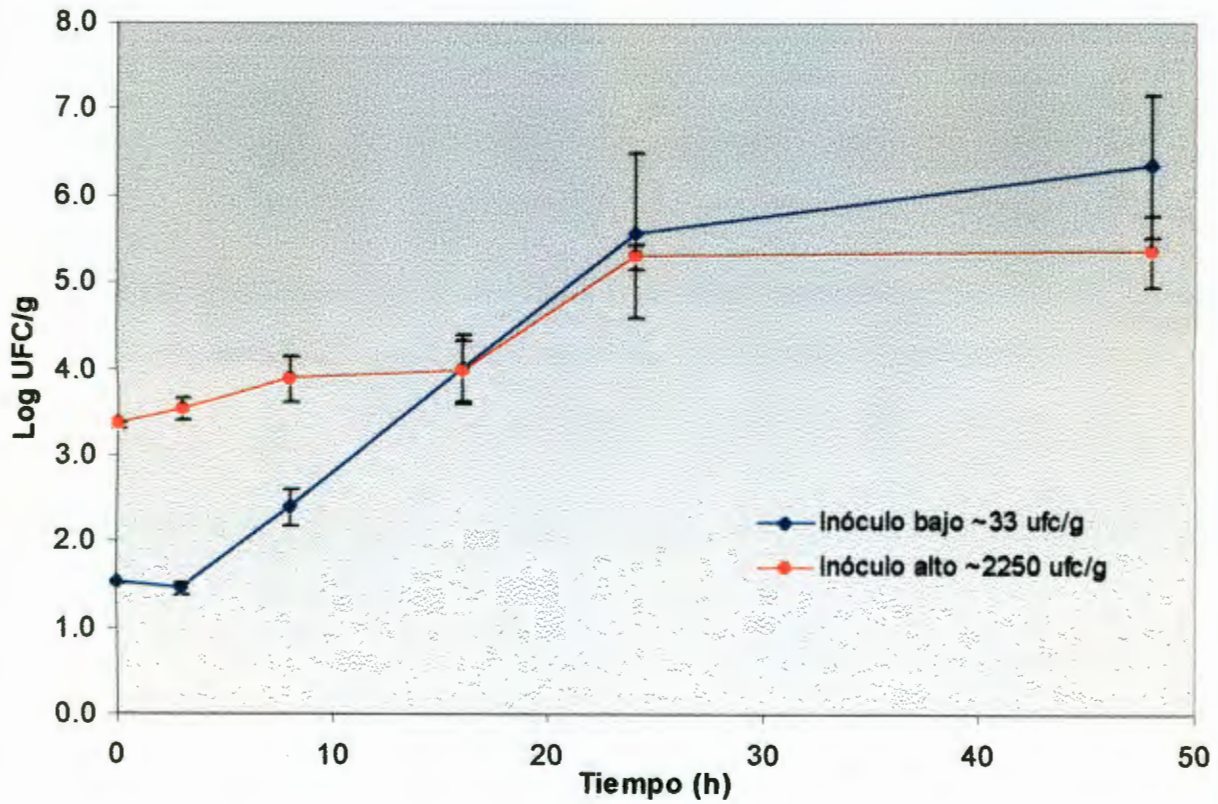
Otros autores ya han reportado la incapacidad de *E. coli* O157:H7 para crecer a 4°C en medios de cultivo (Doyle y Schoeni, 1984; Conner y Kotrola, 1995). La cepa causante de un brote por cidra mostró un ligero crecimiento a 8°C en este producto, cuyo pH oscilaba entre 3.6 y 4.0; bajo esas condiciones sobrevivió por 21 días (Besser y col., 1993). Ese ligero incremento y por supuesto la prolongada sobrevivencia del germen en el alimento, fueron los antecedentes de un brote de diarrea y síndrome urémico hemolítico que involucró a 18 personas. De acuerdo con nuestros resultados, la refrigeración puede disminuir el riesgo por *E. coli* O157:H7 en el guacamole, pero no cancelarlo.

#### 5.1.4 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* fue el microorganismo que menos desarrolló en la pulpa de aguacate a 22°C de los cuatro patógenos estudiados, y el que presentó diferencias mayores entre el comportamiento de los dos niveles de inóculo (Figura 32).

Las variaciones más grandes en los recuentos se presentaron a las 24 y 48 h de almacenamiento para el nivel de inóculo bajo, y a las 24 h para el nivel de inóculo alto. Esto puede deberse al tipo de medio que se utilizó para realizar los recuentos; el Baird-Parker es un medio que tiene la capacidad de recuperar células estresadas, pero es muy poco selectivo. Por lo que la flora asociada en las etapas finales del almacenamiento causó mucha interferencia en los recuentos de *S. aureus*. En estos puntos los OCT se encontraban en cerca de 8 log<sub>10</sub>UFC/g en la pulpa de aguacate.

El nivel de inóculo bajo se comportó de manera semejante que los otros patógenos estudiados; presentó una fase lag de 3.46 h; una fase logarítmica de cerca de 20 h de duración y después una fase estacionaria. En contraste, el nivel de inóculo alto requirió cerca de 16 horas para iniciar el crecimiento logarítmico, el cual duró aproximadamente 8 horas, y a las 24 h de almacenamiento alcanzó la fase estacionaria. A pesar de las diferencias, los dos niveles de inóculo alcanzaron números máximos semejantes a las 24h, y la velocidad de crecimiento que mostraron en la fase logarítmica fue de 0.451h<sup>-1</sup> para el nivel de inóculo bajo y de 0.384h<sup>-1</sup> para el alto.

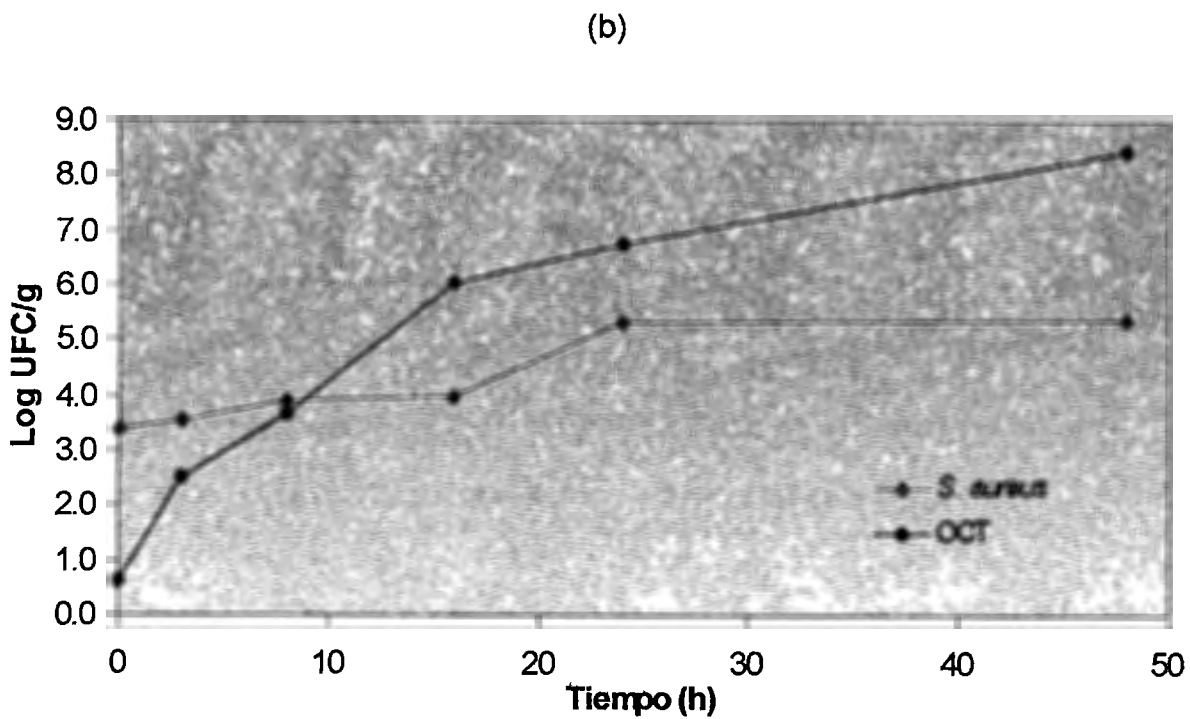
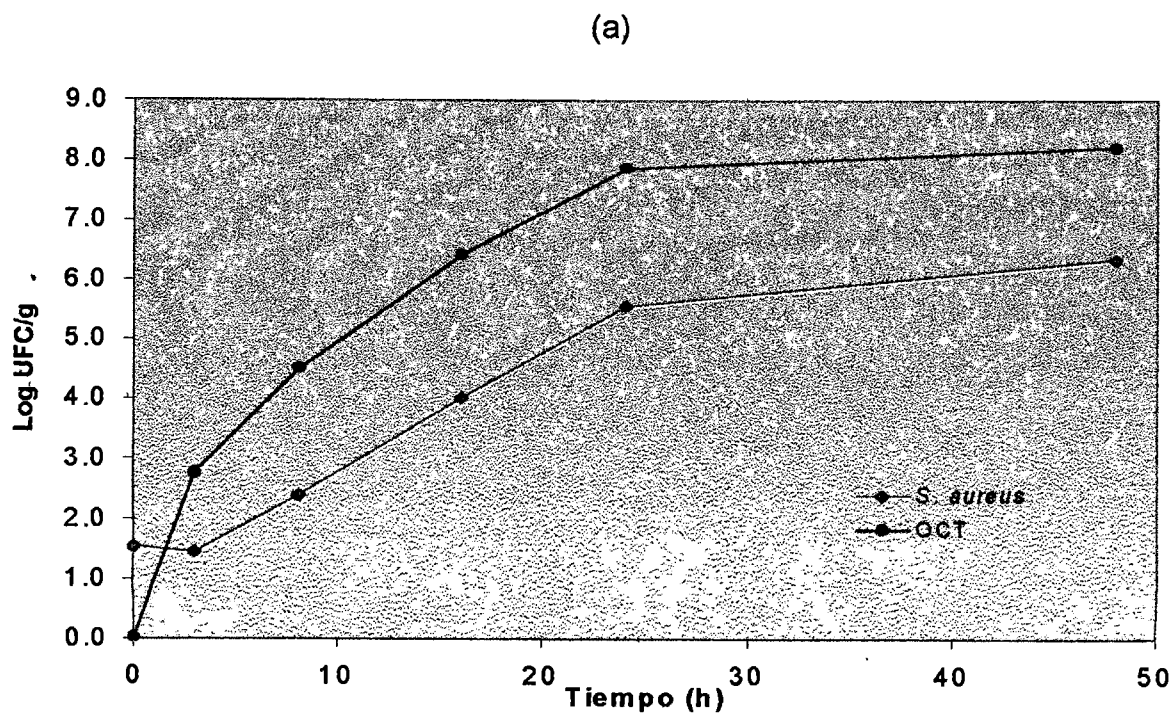


**Figura 32.** Comportamiento de *S. aureus* en pulpa de aguacate almacenada a 22°C con dos niveles de inóculo. Las barras verticales representan  $\pm 1$  desviación estándar.

Por la dispersión de los datos en el recuento del nivel bajo de *S. aureus* a las 24 h de almacenamiento, se puede considerar que la velocidad de crecimiento fue semejante para ambos niveles de inóculo. La diferencia se presentó en la duración de la fase lag.

En la Figura 33 se muestra el comportamiento de los dos niveles de inóculo y de OCT en la pulpa de aguacate a 22°C. Si se considera solamente el comportamiento del inóculo alto (Figura 33b), parece claro; *S. aureus* en un inicio se encontraba en mayor proporción que los OCT, pero estos iniciaron rápidamente el crecimiento logarítmico, lo que pudo haber inhibido el crecimiento del patógeno. Cuando los OCT disminuyen su tasa de crecimiento, *S. aureus* presenta su incremento más grande (~ 1 log<sub>10</sub>UFC/g). En el nivel de inóculo bajo (Figura 33a) no se aprecia esta inhibición y *S. aureus* crece hasta alcanzar ~ 5.5 log<sub>10</sub>UFC/g a la par con los OCT.

Dowe y col. (1997) observaron comportamientos diferentes con dos niveles de inóculo de *L. monocytogenes* inoculada en tierra; mientras que el nivel de inóculo alto (~ 6 log<sub>10</sub> UFC/g) disminuyó cerca de 1.5 log<sub>10</sub>UFC/g después de 32 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25-30°C), el nivel de inóculo menor (~2 log<sub>10</sub> UFC/g) bajo las mismas condiciones incrementó cerca de 2 log<sub>10</sub> UFC/g. Al final del período los dos niveles alcanzaron números semejantes. Estos autores también estudiaron el efecto de la flora asociada sobre el comportamiento del patógeno. Encontraron que cuando se inocula *L. monocytogenes* (~ 4 log<sub>10</sub> UFC/g) en tierra que había recibido un tratamiento térmico con autoclave, el patógeno incrementó en un poco más de 1 log<sub>10</sub>UFC/g después de 16 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En contraste, cuando se utilizó tierra con la flora nativa intacta, *L. monocytogenes* tendió a disminuir ligeramente. Dowe y col. También encontraron que el efecto competitivo de la flora no se relaciona con la disponibilidad de fuente de carbono o nitrógeno.



**Figura 33.** Comportamiento de *S. aureus* y OCT en pulpa de aguacate almacenada a 22°C. En (a) se muestra el nivel de inóculo bajo y en (b) el alto.



No se tienen suficientes elementos para explicar la diferencia entre el comportamiento de los dos niveles de inóculo de *S. aureus* en pulpa de aguacate, pero es posible que exista algún efecto derivado de la actividad de la flora asociada. Tal efecto podría estar relacionado con espacio biológico disponible o con la producción de sustancias inhibitorias.

Cuando *S. aureus* se encuentra en números elevados se favorece la interacción con la flora asociada que cuando se encuentra en números pequeños, y en consecuencia cualquier potencial antagónico posible será manifiesto.

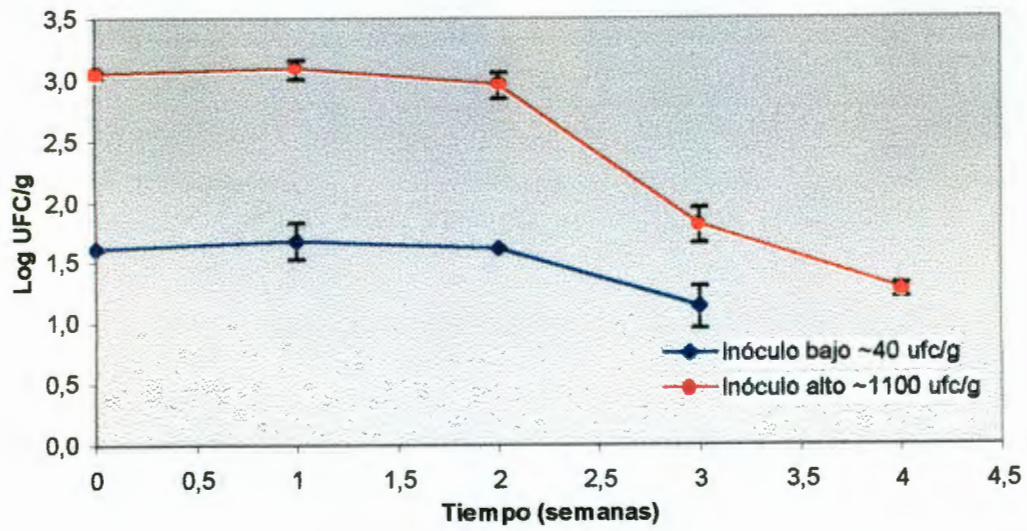
En la Tabla 22 se presentan los tiempos de generación de *S. aureus* en distintos substratos; nuevamente el tiempo de generación que este microorganismo presenta en la pulpa de aguacate es semejante al que muestra en la leche. Los números alcanzados por este germen en la pulpa de aguacate al final del almacenamiento a 22°C son compatibles con niveles de enterotoxina suficiente para provocar un cuadro clínico; sin embargo, para evaluar el riesgo por intoxicación estafilococcica, es necesario comprobar la capacidad de *S. aureus* para producir la enterotoxina en la pulpa de aguacate. El riesgo que puede significar el guacamole como vehículo de intoxicación estafilococcica se ve disminuido por la baja frecuencia de *S. aureus* en el guacamole comercial y el posible efecto antagónico de la flora asociada.

Como se esperaba, *S. aureus* en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración no desarrolló (Figura 34). Los niveles del germen tendieron a disminuir desde la primera semana de almacenamiento, pero fue hasta la segunda semana cuando se presentó la mayor reducción. En este estudio el comportamiento de los dos niveles de inóculo fue similar. Como se conoce bien, la refrigeración adecuada es una medida capaz de cancelar el riesgo por *S. aureus*.

**Tabla 22.** Tiempo de generación de *S. aureus* en pulpa de aguacate a 22°C y en otros substratos a temperaturas similares.

Alimento o medio de cultivo	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de generación (h)	Referencia
Medio de cultivo no especificado	22	7.4	1.8-2.1	1
Leche entera	22	6.5	1.7-1.9	1
Leche UHT	20	6.5	1.3	2
Leche estéril	25	6.5	0.63	3
Carne de res, pollo	21	5.56-6.10	8.03	4
<b>Pulpa de aguacate</b>	<b>22</b>	<b>7.18</b>	<b>1.54, 1.80</b>	

1. Walker y Harmon, 1965.
2. Broughall y Brown, 1984.
3. Yotis y Teodoro, 1957.
4. Scheusner y Harmon, 1973.



**Figura 34.** Dinámica de *S. aureus* en pulpa de aguacate almacenada en refrigeración (4-7°C) con dos niveles de inóculo.

## 5.5 Evaluación del efecto del pH sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en caldo soya tripticasa.

### 5.5.1 *L. monocytogenes*

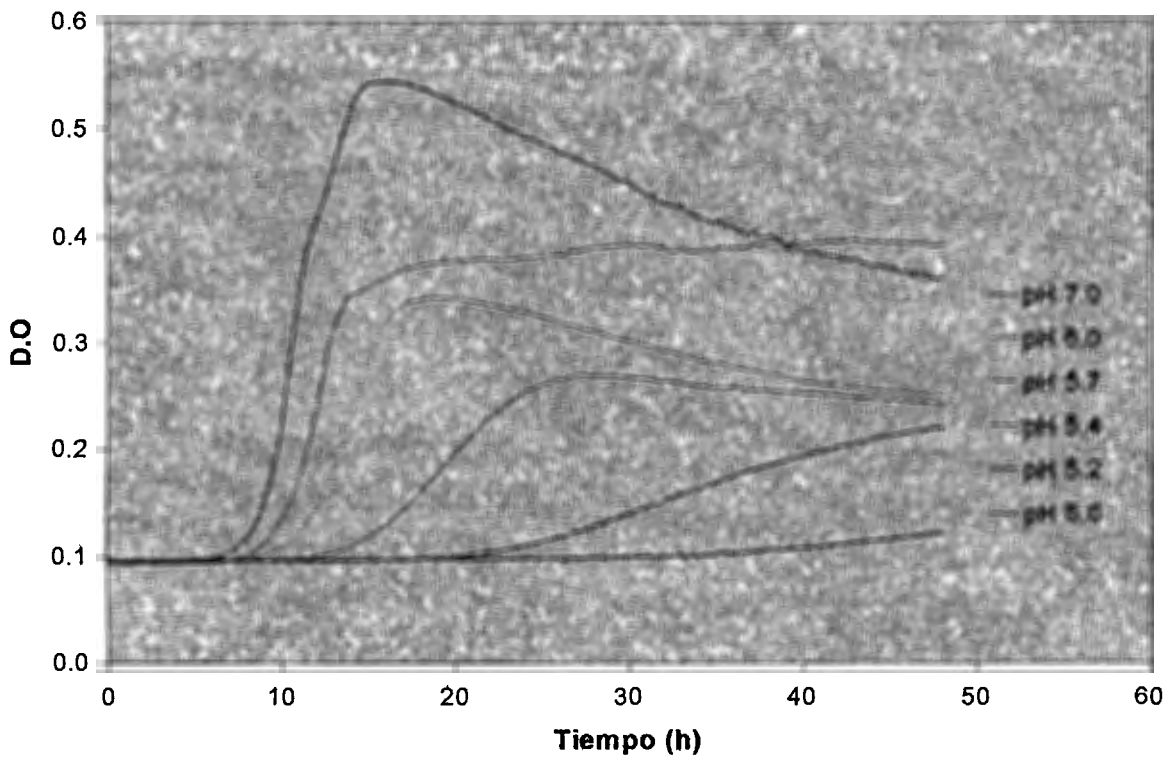
El pH mostró un efecto marcado sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* (Figura 35). Conforme el pH disminuye se presenta un incremento en el tiempo de detección y disminución tanto en la pendiente de la fase logarítmica, como en el nivel de densidad óptica máximo de las curvas de desarrollo.

A niveles de pH 7, 6 y 5.7 la mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* mostraron una pendiente en la fase logarítmica muy pronunciada, con valores promedio de 171, 93, y 59, respectivamente. A pH 5.4, 5.2 y 5.0 el desarrollo es menos activo con valores promedio de pendientes de 22, 6.8 y 1.7, respectivamente (Figura 35).

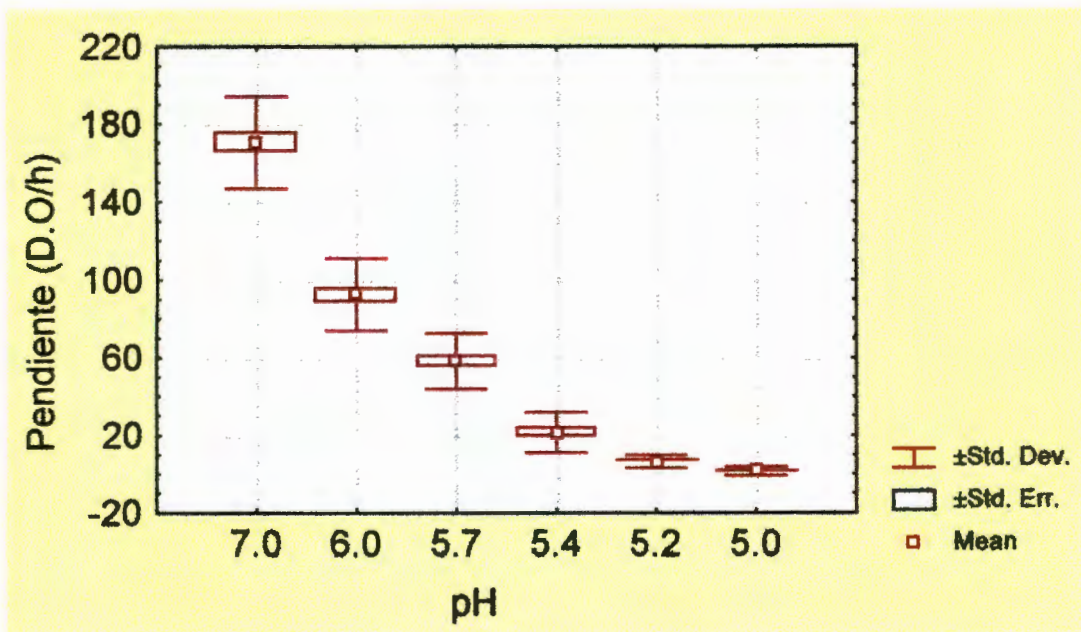
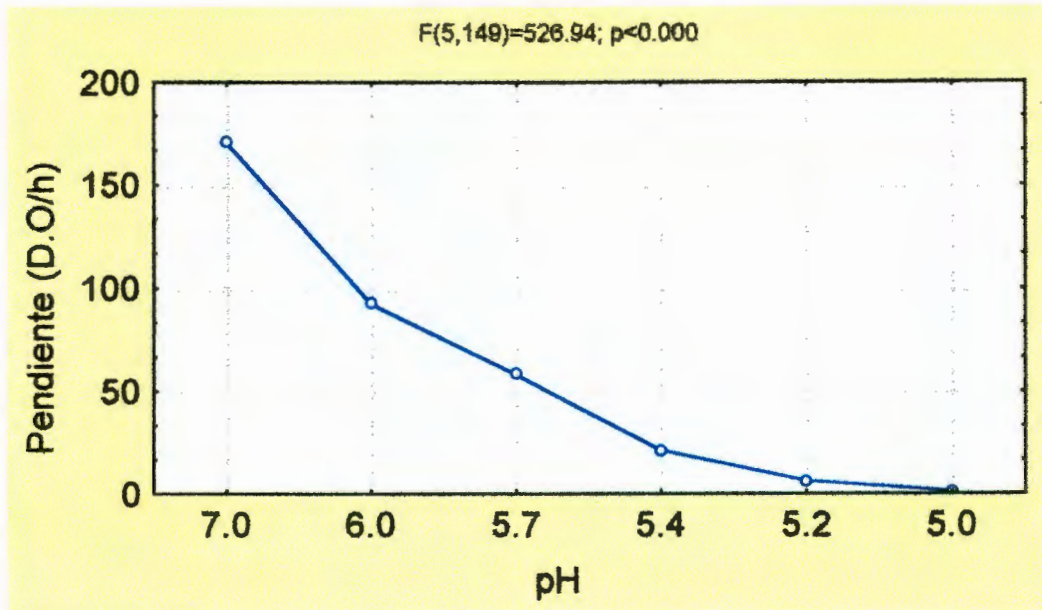
El tiempo de detección que consignamos, incluye la duración de la fase lag y el tiempo necesario para que el inóculo alcance la concentración celular necesaria para ser detectada por el aparato. Es decir, la multiplicación bacteriana ya ha tenido lugar cuando el registro de la densidad óptica del aparato se mantiene en el nivel inicial. Para comparar el comportamiento de una cepa a diferentes niveles de pH la variación en el inóculo es mínima, ya que se inocularon con la misma suspensión celular; sin embargo entre cepas la diferencia de inóculo fue de hasta medio  $\log_{10}$ . La pendiente de la fase logarítmica no se ve influenciada por esta variación, por lo que constituye un parámetro consistente para comparar el comportamiento entre cepas y entre diferentes niveles de pH.

Con un análisis de varianza, resultaron estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) los valores de las pendientes a pH 7.0, 6.0, 5.7 y 5.4 (Figura 36). No hubo diferencia significativa entre los niveles de pH 5.2 y 5.0.

Como se señaló en el estudio de la microbiología del guacamole comercial (Página 88), el pH es un parámetro que afecta de manera notable su calidad sanitaria. Con un valor de  $\text{pH} \leq 5.2$  se inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* por lo menos 24 h.



**Figura 35.** Comportamiento de *L. monocytogenes* en CST a 35°C a seis niveles de pH: 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0.

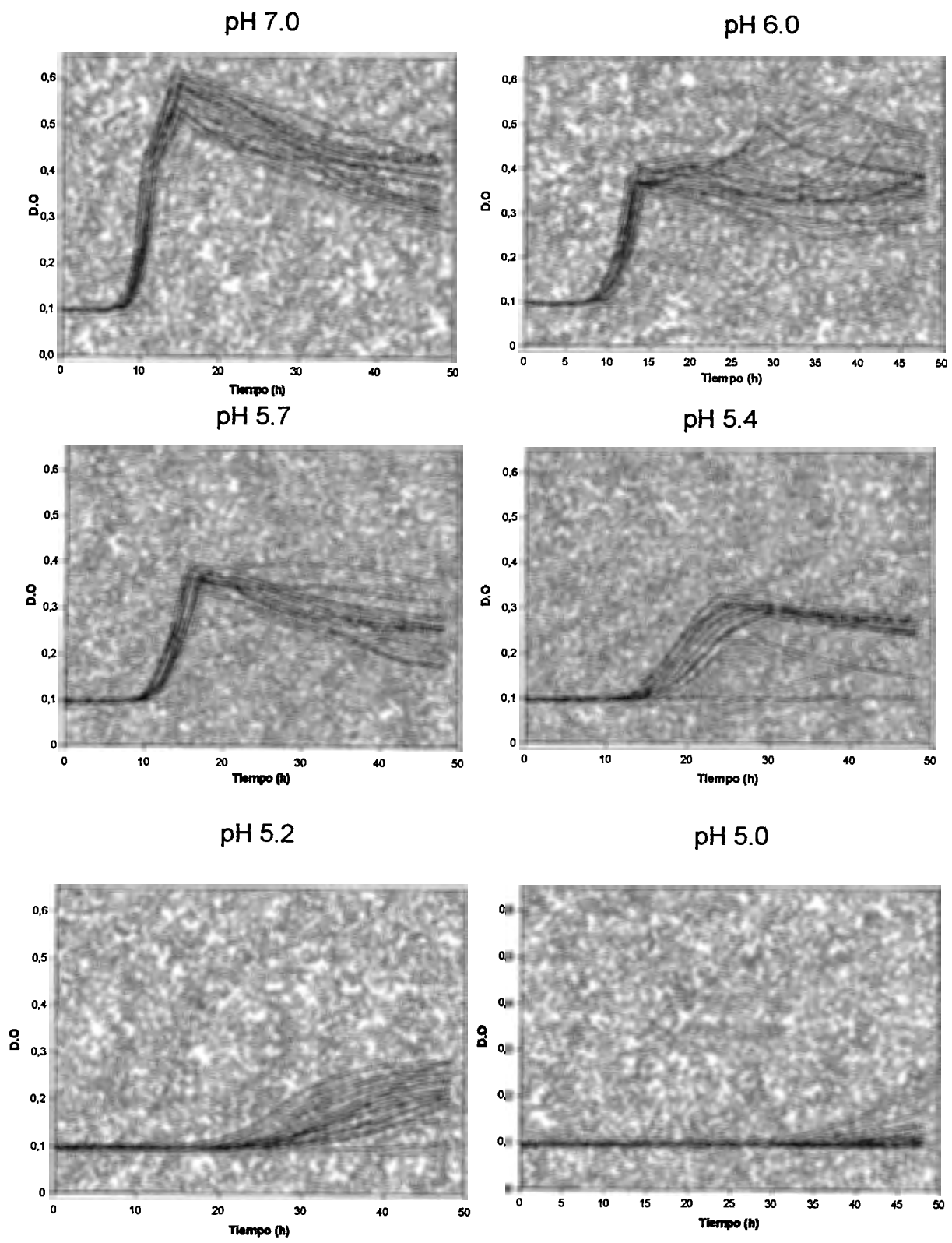


**Figura 36.** Análisis de varianza de las pendientes de *L. monocytogenes* a 35°C en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0.

Sin embargo, hay que recordar que la dosis mínima infectante de *L. monocytogenes* se acepta como baja y la multiplicación del germen podría no ser necesaria para que constituya un riesgo a la salud.

Por otra parte Hill y col., (1995) encontraron que la sobrevivencia de *L. monocytogenes* a pH 3.5 se incrementa de manera notable cuando la bacteria se expone previamente a pH 5 por 90 minutos. Esta observación tiene importancia en la evaluación del riesgo; ya que una cepa *L. monocytogenes* proveniente de guacamole con pH 5 tendría mayor probabilidad de sobrevivir a su paso por el estómago que una cepa proveniente de guacamole con pH neutro. Estos mismos autores consignan que la tolerancia a niveles bajos de pH de una cepa mutante de *L. monocytogenes* se asociaba a un incremento en la virulencia (Hill y col., 1995). Valores bajos de pH (5.2 y 5.0), si bien inhiben el desarrollo del patógeno, pueden favorecer la adaptación a condiciones ácidas y de manera concurrente incrementar su virulencia. Adicionalmente, la adaptación al ácido incrementa la tolerancia al estrés térmico y osmótico, al cristal violeta y al etanol (O'Driscoll y col., 1996). Para el caso particular del guacamole, el incremento en la tolerancia al estrés térmico tiene una repercusión limitada; sin embargo, lo común es que en los lugares donde se expende guacamole prevalecen condiciones que favorecen la contaminación cruzada a través de los utensilios, y el guacamole puede ser fuente de contaminación a otros alimentos que requieren que se mantengan o se sirvan calientes. Así, una cepa tolerante al estrés térmico podría sobrevivir por un tiempo más prolongado que una cepa no adaptada.

A pH 7.0 las cepas de *L. monocytogenes* siguen un patrón muy similar de comportamiento. Cuando se parte de niveles de pH inferiores se observan diferencias cada vez más acentuadas en su respuesta, de manera que a pH 5.2 la dispersión es máxima (Figura 37). Este señalamiento ya ha sido reportado en algunos estudios. Por ejemplo, Begot y col. (1997) encontraron un comportamiento variable de 66 cepas de *L. monocytogenes* según las condiciones de pH, temperatura y actividad de agua. Observaron la máxima variabilidad en los niveles de actividad de agua y temperatura más bajos



**Figura 37.** Comportamiento de 26 cepas de *L. monocytogenes* a 35°C en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0.



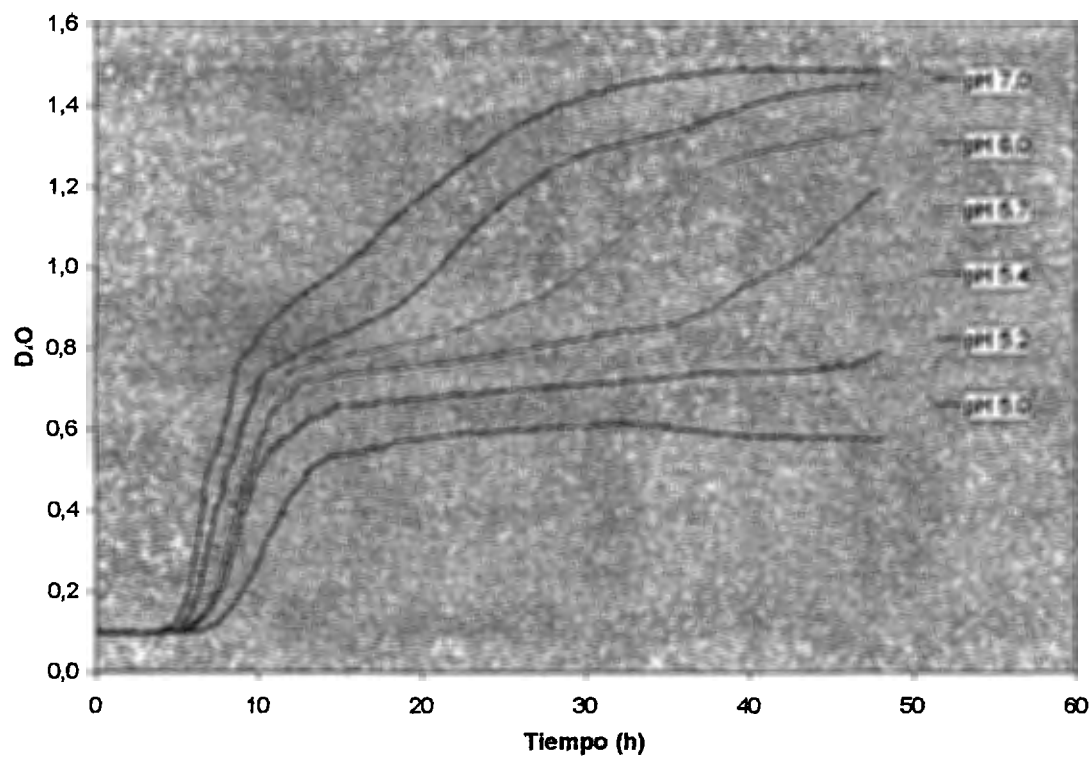
estudiados (0.96 y 10°C). Basándose en el tiempo de generación y en la duración de la fase lag agruparon las cepas en 5 tipos, y encontraron cierta relación entre el tipo de cepa y la fuente de la cual provenían. En nuestro trabajo las cepas provenían del mismo alimento y la mayor variabilidad también se presentó en las condiciones menos favorables para el desarrollo de *L. monocytogenes*.

El comportamiento promedio de las 25 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole fue semejante al de *L. monocytogenes* Scott A a niveles de pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4 y 5.2. A pH 5.0, 15 de las 25 cepas no desarrollaron dentro de las 48 h, al igual que *L. monocytogenes* Scott A. Las 10 cepas restantes mostraron un ligero incremento al final de la incubación.

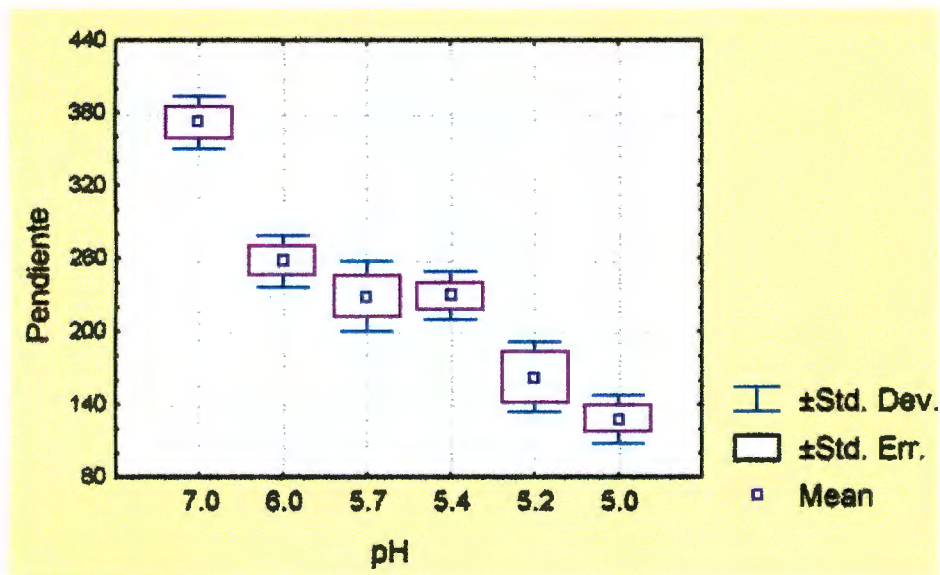
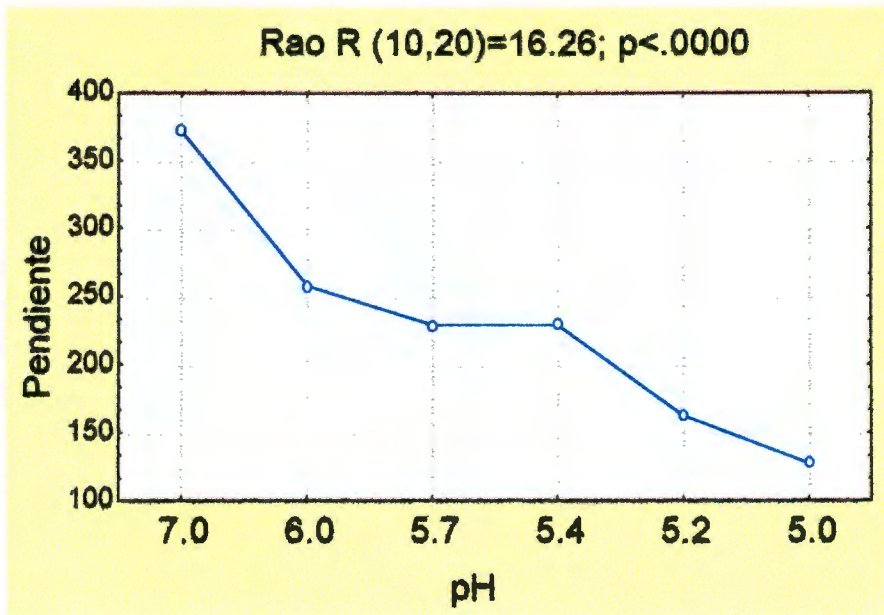
### 5.5.2 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp fue capaz de desarrollar activamente en todos los niveles de pH estudiados (Figura 38). A diferencia de lo observado con *L. monocytogenes*, el tiempo de detección fue similar en todos los niveles de pH; la diferencia más grande fue de 2.25 h y se presentó entre los valores de pH 7.0 y 5.0. La pendiente de la fase logarítmica de *Salmonella* se redujo al disminuir el pH, pero de manera menos acentuada que en el estudio con *L. monocytogenes*. Este efecto se validó estadísticamente (Figuras 39). La pendiente a pH 7.0 es claramente diferente a las obtenidas en el resto de las condiciones y a valores de pH 6.0, 5.7 y 5.4 no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Los niveles de pH más frecuentes del guacamole comercial se encontraron entre 7.0 y 5.5 (Figura 40), condiciones que permiten un desarrollo activo del patógeno.

Las cepas nativas de guacamole desarrollaron en la fase logarítmica a una velocidad similar que *S. typhimurium* en todos los niveles de pH, pero la duración de esta fase fue mayor en las cepas nativas en todos los casos (Figura 41). Comparando los valores de la pendiente de la fase logarítmica y de densidad óptica máxima que presentaron *L. monocytogenes* y *Salmonella* se puede apreciar la dinamicidad y capacidad de adaptación de *Salmonella* (Tabla 23). La densidad óptica máxima alcanzada por *Salmonella* a pH 5.0 es mayor que la producida por *L. monocytogenes* a pH 7.0.



**Figura 38.** Comportamiento de *Salmonella* spp en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0 a 35°C.



**Figura 39.** Media, desviación estándar y error estándar del valor de las pendientes de la fase logarítmica del comportamiento de *Salmonella* spp en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0.

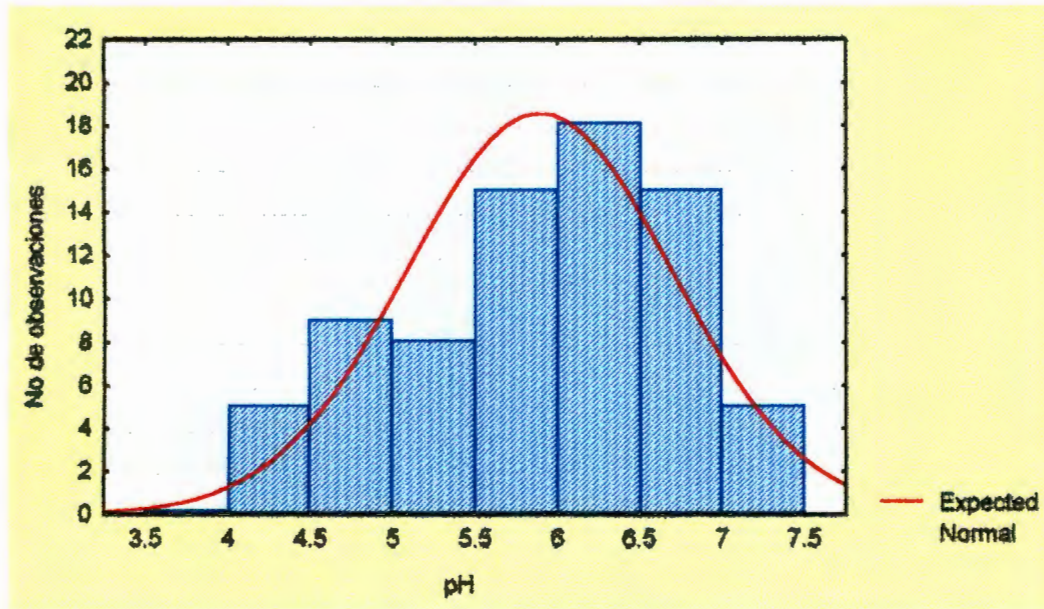
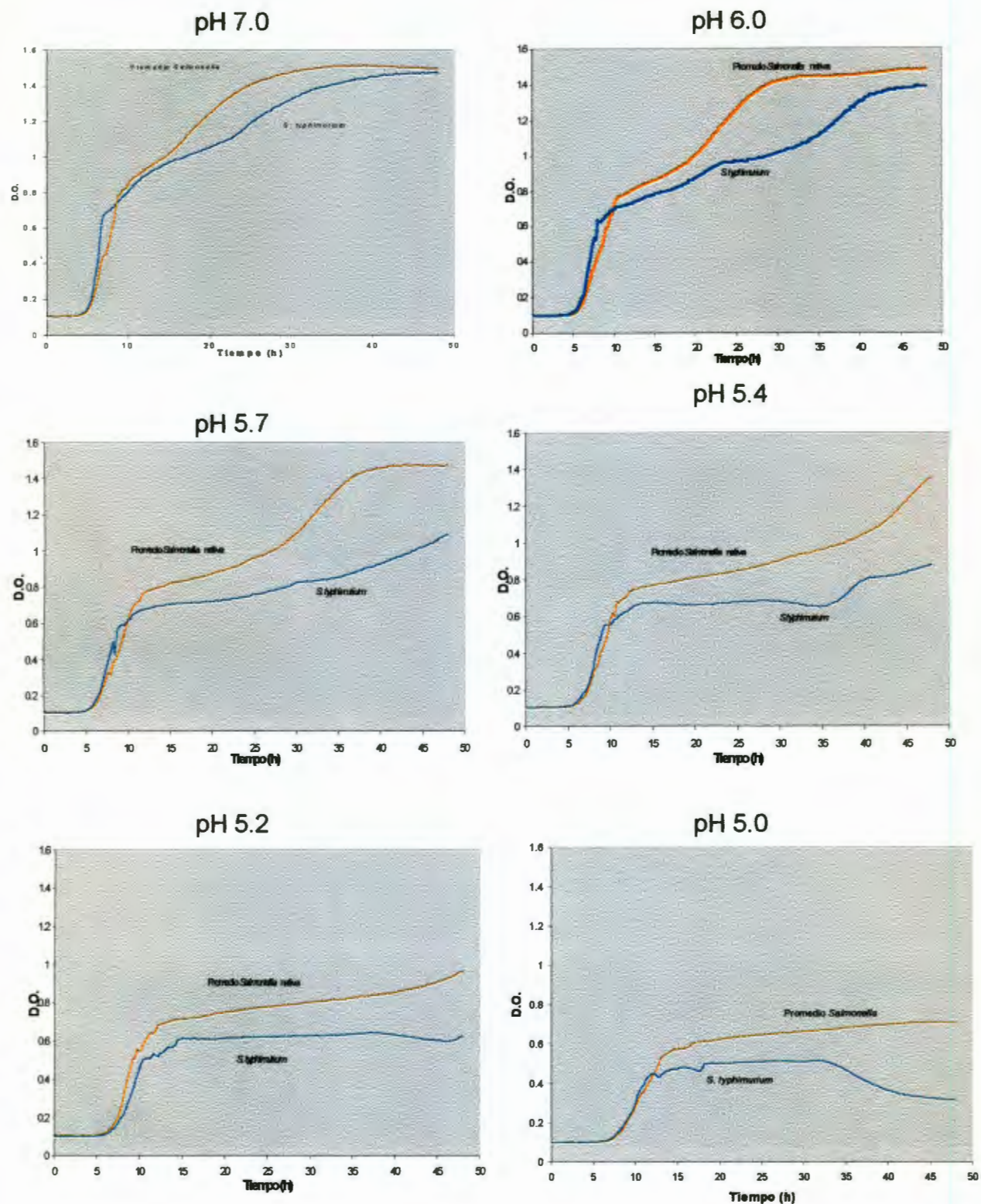


Figura 40. Distribución de los valores del pH de guacamole comercial.



**Figura 41.** Comportamiento promedio de dos cepas de *Salmonella* aisladas de guacamole y *S. typhimurium* en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0 a 35°C.

**Tabla 23.** Densidad óptica máxima alcanzada y pendiente de la fase logarítmica de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp en CST a pH 7.0, 6.0, 5.7, 5.4, 5.2 y 5.0 a 35°C.

Densidad óptica máxima	Microorganismo	pH					
		7.0	6.0	5.7	5.4	5.2	5.0
	<i>L. monocytogenes</i>	0.542	0.394	0.340	0.268	0.218	0.120
	Salmonella	1.496	1.444	1.336	1.187	0.798	0.639
Pendiente	<i>L. monocytogenes</i>	170.6	92.8	58.6	21.7	6.8	1.7
	Salmonella	371	256	228	228	162	127

*Salmonella*, al igual que *L. monocytogenes*, es capaz de incrementar su tolerancia a niveles de pH bajos cuando se induce la adaptación a estas condiciones (Foster y Hall, 1990). También se ha observado que la adaptación al ácido genera tolerancia a otros factores como calor, concentración de sal, un sistema de lactoperoxidasa, cristal violeta y polimixina B (Leyer y Johnson, 1993).

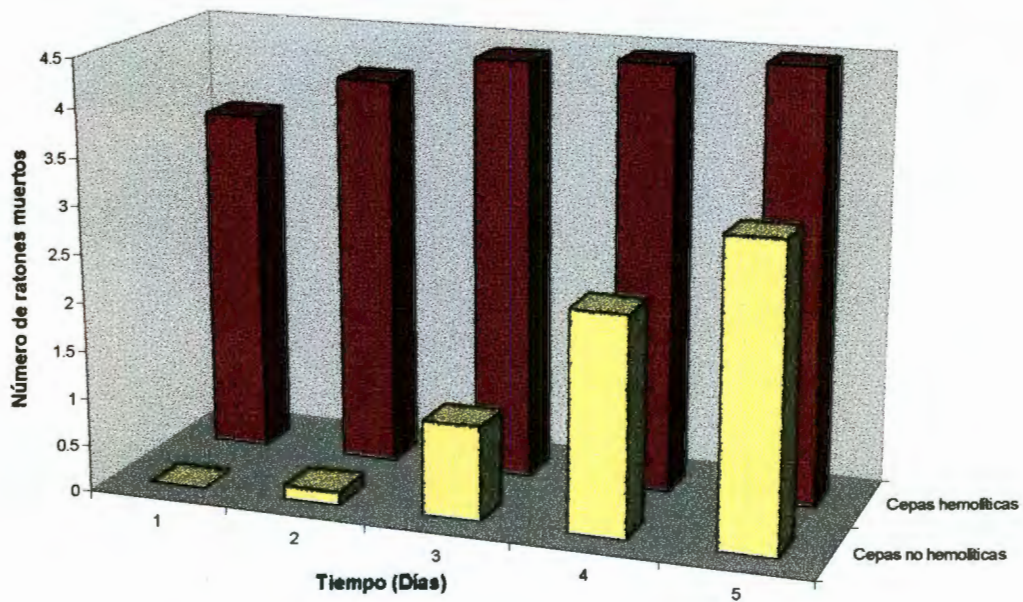
### **5.5 Patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole.**

Bajo las condiciones de la prueba de patogenicidad utilizada en este trabajo, las cepas de *L. monocytogenes* no patógenas son incapaces de matar al ratón, mientras que las cepas patógenas matan a los ratones dentro de los 5 días de la prueba. Las 16 cepas hemolíticas ensayadas mataron al menos 3 de los 5 ratones desde las 24 h de la inoculación, y al final de los 5 días 13 cepas mataron a los 5 ratones. Las cepas no hemolíticas también fueron letales para los ratones, pero requirieron más tiempo para hacerlo que las cepas hemolíticas, y el número de animales muertos fue menor (Figura 42).

Si se restringe el tiempo de observación de 5 a 3 días para evaluar los resultados, ninguna cepa no hemolítica se consideraría patógena, mientras que todas las cepas hemolíticas lo serían. Se confirma así el papel de la producción de hemolisina en la patogenicidad de *L. monocytogenes* (Mckellar, 1994).

Kongshavn (1986) encontró que la resistencia a la infección por *Listeria* variaba con la cepa del ratón. En nuestro caso, es posible que los ratones utilizados presentaran una susceptibilidad mayor a la infección por este microorganismo que los usados en otros trabajos.

Seis de las 7 cepas no hemolíticas que presentaron capacidad para infectar y matar al menos 2 de los 5 ratones inoculados, resultaron hemolíticas después de ser aislados de los ratones. Una vez en el huésped las células podrían haberse visto forzadas a producir la hemolisina para sobrevivir, o alguna célula de las inoculadas si tenía la capacidad para producir esta proteína, evadió el sistema inmune del ratón, desarrolló y causó la infección



**Figura 42.** Media acumulada de ratones muertos durante cinco días por cepas de *L. monocytogenes* aislada de guacamole.



El almacenamiento en refrigeración de 6 cepas previo a la preparación del inóculo no causó cambios marcados en su patogenicidad, cuando se compararon con las mismas cepas almacenadas a temperatura ambiente (Tabla 24). Las cepas almacenadas a temperatura ambiente no se resembraron durante su almacenamiento, mientras que las que se conservaron en refrigeración se subcultivaron aproximadamente cada dos meses. Este hecho, aunado a la variabilidad propia de los seres vivos, puede ser la causa de las diferencias que se observan en la Tabla 24. Czuprynski y col. (1989) encontraron que la virulencia de *L. monocytogenes* se incrementaba cuando se hacía crecer a 4°C; sin embargo este efecto se observó cuando se probó la patogenicidad en ratón por vía intravenosa, pero no ocurrió cuando la vía de administración fue gástrica.

En el presente trabajo se encontró que el almacenamiento a bajas temperaturas no parece afectar la capacidad de *L. monocytogenes* para causar enfermedad.

El mecanismo de patogenicidad de *L. monocytogenes* es complejo, y requiere de otros factores adicionales a la hemolisina (Hof y Rocourt, 1992). Aunque la capacidad hemolítica no es criterio suficiente para considerar una cepa patógena, se observó una fuerte relación con la patogenicidad de las cepas.

La incidencia de *L. monocytogenes* en el guacamole y la alta proporción de cepas patógenas encontradas, hacen de este alimento un vehículo muy probable de listeriosis.

Tabla 24. Patogenicidad al ratón de 6 cepas de *L. monocytogenes* almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración previo a la preparación del inóculo.

Cepa	Dia	Temperatura ambiente					Refrigeración				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
30*	0	0	0	0	3	3 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
34	5	5	5	5	5	5	3	3	5	5	5
55	3	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5
60	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4
66	4	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4

\* Cepa no hemolítica.

<sup>1</sup> Ratones muertos acumulados en cinco días.



1. Las técnicas de la USDA y la FDA presentan una sensibilidad similar en la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de pulpa de aguacate; La técnica de la USDA mostró mayor especificidad.
2. El preenriquecimiento es una etapa necesaria para la recuperación de *Salmonella* a partir de pulpa de aguacate. El uso del enriquecimiento directo puede conducir a falsos negativos.
3. La pulpa de aguacate es un sustrato propicio para el desarrollo de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*. Los tres primeros microorganismos se multiplican activamente en pulpa de aguacate a 22°C, llegando a niveles cercanos a 9 log<sub>10</sub> UFC/g después de 48 h de incubación. El desarrollo de *S. aureus* es más precario: en el mismo período y temperatura alcanzó sólo cerca de 6 log<sub>10</sub> UFC/g de pulpa de aguacate.
4. El guacamole comercial mostró una amplia variabilidad en el contenido de microorganismos indicadores, con una tendencia a presentar niveles elevados independientemente del sitio de muestreo. La positividad a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, y *Salmonella* spp fue de 60.0, 16.6, 6.7- 1.3%, respectivamente.
5. La mayor positividad a *E. coli* (71%) y la proporción más grande de muestras con el nivel más alto de contaminación (21%) fue el guacamole obtenido de mercado.
6. Las 16 cepas hemolíticas de *L. monocytogenes* aisladas de guacamole resultaron patógenas para el ratón.

7. Bajos niveles de pH (hasta de 5.0) en el guacamole y su almacenamiento en refrigeración pueden disminuir el riesgo por *Salmonella* y *L. monocytogenes*, pero no cancelarlo
8. El consumo de guacamole no está exento de riesgos a la salud, es un posible vehículo de patógenos como, *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

## 7. Referencias bibliográficas

Abdul-Raouf U.M, Beuchat L. R, y Ammar M. S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli*O157:H7 on salad vegetables. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1999-2006).

Altekruse S.F., Cohen M.L., and Swerdlow D.L. 1997. Emerging foodborne diseases. Emerging infection diseases. 3 N°3(1-12).

Archer D.L y Kvenberg J.E. 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal diseases in United States. J.Food Prot. 48 (887-894).

Armstrong, G. L. Hollingsworth, J. y Morris J. G. Jr. 1996. Emerging Foodborne Pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidem. Reviews. 18 (29-50).

Arumugaswamy, R.K., Rusul, G., Abdul-Hamid, S.N., y Cheah, C.T. 1995. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. Food Microbiol. 12 (3-8).

Bailey, J.S., Cox, N.A. y Johnston, R.W. 1988. Improved selective procedures for detection of salmonellae from poultry and sausage products. J. Food Prot. 51(391).

Bean N H and Griffin P M . 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles, and trends. J. Food Prot. 53 (804-817)

Bean N.H , Goulding J S, Daniels M T, y Angulo FJ. 1997. Surveillance for foodborne diseases outbreaks- United States 1988-1992. J. Food Prot. 60 (1265-1286)

Begot, C., Lebert, I., y Lebert, A. 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiol. 14 (403-412).

Bergdoll, M. S. 1990(b). Staphylococcal food poisoning. In: Foodborne diseases. Doyle, M. P. y Cliver, D. O. (Eds.). Academic Press. San Diego, California.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1984. Williams&Wilkins (Ed). Baltimore, E.U.A. 1ª. Edition.

Besser, R.E., Lett, S.M., Todd J.W., Doyle, M.P., Barrettt, T.J. Wells, J.G., y Griffin, P.M. 1993. An outbreak of diarrhea and haemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA. 269 (2217- 2220).

Beuchat, L.R. y Ryu J. 1997. Produce handling and processing practices. Emerging Infectious Diseases.; 13-4.

Beuchat L. R y Doyle M. P. 1995. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in foods trated or suplemented with carrot juice. Food Microbiol. 12 (73-80).

Borczyk, A.A. Harnette, K.L. Lombos, M. y Lior, H. 1990. Lancet. 336 (946-947).

Bredie, W.L.P. y Boer, E. 1992. Evaluation of MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin. *Int. Food Microbiol.* 16 (197-208).

Broughall, J.M. y Brown, C. 1984. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three dimensional models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.* 1 (13-22).

Bryan, F.L. 1988. Risks associated with practices, procedures, and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J Food Prot.* 51 (663-673).

Bryan, F.L. y Hauschild, A.H. 1980. Estimate of cases of food and waterborne illness in Canada and the United States. *J. Food Prot.* 43 (435-440).

Bubert, A., Khöler, S., y Goebel, W. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (2625-2632).

Buchanan R.L. HACCP: A re-emerging approach to food safety.

Buchanan, R. L. y Bagi, L. K. 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int. J. Food Microbiol.* 23 (317-322).

Buchanan, R. L. y Doyle, M. P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Techn.* 51(69-76).

Buchanan, R. L. y Klawitter, L. A. 1992. The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 9 (185-196).

Carpenter, D.F. y Silverman, G.J. 1974. Staphylococcal enterotoxin B and nucleasa producción under controlled dissolved oxygen conditions. *Appl. Microbiol.* 28 (628-637).

Coia, J. E. 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Immunol. and Medical Microbiol.* 20 (1-9).

Conner, D.E. y Kotrola, J.S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (382-385).

Czuprynski, C.J., Brown, J.F. y Roll, J.T. 1989. Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *Microbiol. Pathog.* 7 (213-223).

Chart, H. Rowe, B. v d Kar N, y cols. Serological identification of *E. coli* O157 as cause of haemolytic uraemic syndrome in Netherlands. *Lancet.* (337-437).

D'Aoust, J-Y. 1997. *Salmonella* Species. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* Doyle, M.P., Beuchat, L.R, y Montville, T.J. (Eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

D'Aoust, J-Y. y Maishment, C. 1979. Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. *J. Food Protec.* 2 (153-157).



D'Aoust, J-Y., Sewell, A.M., y Warburton, D.W. 1992. A comparison of standard cultural methods for detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 16 (41-50).

Dallas, H.L. y Hitchins, A.D. 1993. Antagonism of bacterial competitors toward *Listeria monocytogenes* in enrichment culture. *J. Food Safety.* 13 (113-123).

Dowe M.J, Jackson E.D, Mori J.G, y Bell C.R. 1997. *Listeria monocytogenes* survival in soil and incidence in agricultural soils. *J. Food Prot.* 60 (1201-1207).

Doyle, M.P y Cliver D.O. 1990(a). *Salmonella*. In Foodborne diseases. Doyle, M. P. y Cliver, D. O. (Eds.). Academic Press. San Diego, California.

Doyle, M.P y Cliver D.O. 1990(c). *Escherichia coli*. In: Foodborne diseases. Doyle, M. P. y Cliver, D. O. (Eds.). Academic Press. San Diego, California.

Doyle, M.P. y Schoeni, J.L. 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (2394-2396).

Doyle, M.P., y Shoeni, J.L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (855-856).

Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J. y Zhao, S. 1997. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R, y Montville, T.J. (Eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Edel, W. y Kampelmacher, E.H. 1973. Comparative studie on the isolation pf "sub-lethally injured salmonellae in nine European laboratories. *Bull. Wld. Hlth. Org* 48 (167).

Escartín E.F. 1998. Riesgos microbianos relacionados con el consumo de alimentos. Más allá del síndrome diarreico. *Enfermedades infecciosas y Microbiología.* 18-3 (130-136).

Escartín, E.F. 1997. Identification and prevention of microbial risks in foods: The HACCP approach and priorities in México. *Environ. Healt.* November (40-42).

Escartín, E.F., Castillo A.A. y Saldaña L.J. 1989. Survival and growth of *Salmonella* and *Shigella* on sliced fresh fruit. *J. Food Prot.* 52 (471-472).

Escartín, E.F., Saldaña, L.J., y Rodriguez, G.O. 1993. Fate of *Salmonella* in Salpicón, a mexican cold shredded beef salad. *J. Food Prot.* 56 (197-200).

Farber, J.M. Coates, F. y Daley, E. 1992. Minimum water activity requeriments for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 15 (103-105).

Felsenfeld O. y Young V.M. 1945. The viability of *Salmonella* on artificially contaminated vegetables. *Poultry Science.* 24 (353-355).

Ferguson, R.D. y Shelef, L.A. (1990). Growth of *L. monocytogenes* in soymilk. *Food Microbiol.* 7 (49-52).

Fernández E.E. 1981. *Microbiología Sanitaria, Agua y Alimentos.* 1a Edición. Universidad de Guadalajara.

Flowers, R.S. D'Aoust, J-Y. Andrews, W.H. y Bailey, J.S. 1992. *Salmonella*. In: Compendium of methods for microbiological examination of foods. Indicator microorganisms and pathogens. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds.). American Public Health Association. Washington, D.C.

Foster, J.W., y Hall, H.K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 173 (6896-6902).

Gaillard, j.-L. Berche, P. Mounier, J. Richard, S. y Sansonetti, P. 1987. Penetration of *Listeria monocytogenes* into the host: A crucial step of the infectious process. Ann. Microbiol. 138 (259-264).

García-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G., y Amaro-López, M. 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. J. Food Safety. 16 (75-86).

Gellin, B.G. y Broome, C.V. 1989. Listeriosis. J. Of Am. Med. Assoc. 261 (1313-1320).

Gilmour, A. y Harvey, J. 1990. Staphylococci in milk and milk products. J. Of Appl. Bacteriol. Symposium suppl. (147S-166S).

Glass, K.A. y Doyle M.P. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol. 55 (1565-1569).

Greenwood, M.H., y Hooper, W.L. 1983. Chocolate bars contaminated with *Salmonella napoli*: an infectivity study. Br. Med. J. 286 (1394).

Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7. Other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uraemic syndrome. Epidemiol. Rev. 13(60-97).

Halpin-Dohnalek, M.I. y Marth, E.H. 1989. *Staphylococcus aureus*: Producción of extracellular compounds and behavior in Foods – A review. J. Food Prot. 52 (267-282).

Harvey, R.W.S y Price, T. H. 1977. Observations on pre-enrichment for isolation salmonellas from sewage polluted natural water using Muller-Kauffmann tetrathionate broth prepared with fresh and desiccated ox bile. J. Appl. Bacteriol. 43 (145).

Hill, C., O'Driscoll, B., y Booth, I. 1995. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 28 (245-254).

Hitchins, D.A. 1992. *Listeria monocytogenes*. En: Bacterial Analytical Manual. Food and Drug Administration (Ed). 7<sup>th</sup> Edition. AOAC international.

Ho J.L, Shands K.N, Friedland G, Eckind P, y Fraser D. W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch. Int.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 (185-190).

Hoffman, C.A., Wagner, D.E., y Tatini S. 1997. Comparative study of recovery of *Salmonella javiana* from Mozzarella cheese by two official analytical procedures. J. Food Protec. 12 (1493-1496).

IAMFES, 1987. Procedures to investigate foodborne illness. Committee on communicable diseases affecting man, food subcommittee (Eds.). International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians.

ICMSF. 1980. pH and acidity. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Eds.). Microbial Ecology of Foods. Vol. 1. Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press. New York. London. (92-111).

ICMSF. 1996(a). *Salmonellae*. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Eds.). Microorganisms in foods. Vol. 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Professional Press. New York. London. (217-263).

ICMSF. 1996(b). *Listeria monocytogenes*. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Eds.). Microorganisms in foods. Vol. 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Professional Press. New York. London. (141-182).

ICMSF. 1996(c). *Staphylococcus aureus*. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Eds.). Microorganisms in foods. Vol. 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Professional Press. First edition. New York. London. (299-333).

Iijima, Y. Matsumoto, M. Higuchi, K. Furuta, T. And Honda, T. 1997. Resistance to dryness of *E. coli* O157:H7 strains from Outbreak in Sakai city, Japan, 1996. Emerging Infection Diseases (letters). 14(2).

Jablonski, L.M., y Bohach, G.A. 1997. *Staphylococcus aureus*. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle, M.P., Beuchat, L.R, y Montville, T.J. (Eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Juntilla, J.R., Niemela, S.I. and Hirn, j. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-hemolytic *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 65 (321-327).

Kabara, J.J. 1993. Medium-Chain fatty acids and esters. In: Antimicrobials in foods, 2<sup>th</sup>Ed. Davidson, P. M. and Branen, A.L. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York, New York.

Kasrazadeh, M. y Genigeorgis, C. 1994. Potential growth and control of *Salmonella* in hispanic type soft cheese. Int. J. Food Microbiol. 22 (127-140).

Kongshavn, P.A.I. 1986. Genetic control of resistance to *Listeria* infection. Curr. Top. Microbiol. Immunolog. 124 (62-68).

Kvenberg, J.E. y Archer, D.L. 1987. Economic impact of colonization control of foodborne disease. J. Food Technol. 41 (77-80,89).

Lancette, G. A y Tatini, S.R. 1992. *Staphylococcus aureus*. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Vanderzant, C. and

Splittstoesser, D.F. (Ed.). American Public Health Association. Third edition. Washington, D.C.

Lawrance, L.M. y Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (4600-4604).

Leyer, G.J., y Johnson, E.A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1842-1847).

Linnan, M. J. y cols. 1988. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *N. Engl. J. medic.* 319 (823-828).

Lorber, B. 1990. Clinical listeriosis-implications for pathogenesis. In: Miller, J.A. Smith, J. L. y Somkuti, G.A. (Eds). *Topics in industrial microbiology; Vol2. Foodborne listeriosis.* Soc. Ind. Microbiol. Elsevier, Amsterdam pp. 41-49.

Lovett, J., Francis, D.W., y Hunt, J.M. 1987. *L. monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.* 50 (188-192).

MacDonald, T.T y Carter, P.B. 1980. Cell mediated immunity to intestinal infection. *Infect. Immun.* 28 (516-523).

MacGowan, A.P. Bowker, K. MCLauchlin, J. Bennett, P.M. y Reeves, D.S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. In shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21(325-334).

Mackey B.M. y Karridge A.L. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *Int. J. Food Microbiol.* 6 (57-65).

Marth, E.H. 1988. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. In:*Listeria monocytogenes: A foodborne pathogen.* Annual meeting of the Institute of Food Technologist 1987, Las Vegas Nev., June 16-19.

Mckellar, R.C 1994. Use of the CAMP test for identification of *listeria monocytogenes*. *App. Environ. Microbiol.* 60 (4219-4225).

Meng, J. Doyle, M.P. Zhao, T. y Zhao S. 1994. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Trends in Food Science & Technol.* 5 (179-184).

Miller, A.J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protec.* 55 (414-418).

Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews.* 11 (142-201).

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1991. *Listeria monocytogenes.* *Int. J. Food Microbiol.* 14 (185-246).

Notermans S. y Borgdorff M. 1997. A global perspective of foodborne disease.. *J. Food Prot.* 60-11 (1395-1399).

Notermans S. y Mead G.C. 1996. Incorporation of elements of quantitative risk analysis in the HACCP system. *Int. J. Food Microbiol.* 30 (157-173).

Notermans S., Gallhof G., Zwietering M.H., y Mead G.C. 1995. Identification of critical control points in HACCP system with a quantitative effect on the safety of food products. *Food Microbiol.* 12 (93-98)

Notermans S., Mead G.C. y Jouve J.L. 1996. Food products and consumer protection: a conceptual approach and a glossary of terms. *Int. J. Food Microbiol.* 30 (175-185).

O'Driscoll, B., Gahan, G.C. y Hill, C. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1693-1698).

Ojeda, A. Prado, J. M. Arellano, C. Borczyk, W. J. Lior, H. y Levina, M.M. 1995. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J. Clin. Microbiol.* 33 (2199-2210).

Palumbo, S. A. Call, J. E. Schultz, F. J. y Williams, A. C. 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 58 (352-356).

Papageorgiou, D.K. y Marth, E.H. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 y 22°C and whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *J. Food Prot.* 52 (625-630).

Pérez, J.L., Berrocal, C.I. y Berrocal, L. 1986. Evaluation of a commercial  $\beta$ -glucuronidase test for a rapid and economical identification of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 61 (541-545).

Petran, R.L. y Zotola, E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.* 54 (45-60).

Racz, P. Tennar, K. y MÉRÖ, E. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Invest.* 26 (694-700).

Rajkowski, K. T. y Marmer, B. S. 1995. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *J. Food Prot.* 58 (1307- 1313).

Roberts, T. 1988. Salmonellosis control: estimated economic costs. *Poultry science.* 67 (936-943).

Rocabado, Q.F. y Bermejo, M.S. (Ed). 1993. Diagnóstico sobre la situación de la protección de los alimentos en México. 1ª Edición. Organización Panamericana de la Salud. México, D.F.

Rocourt, J. y Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R, y Montville, T.J. (Eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Rodriguez, S.F. 1982. El aguacate. 1ª Ed. AGT editor S.A. México.

Ryser, E. T. Marth, E.H. (Eds). 1991. *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker Inc. New York, New York.

Saddik, M.F., El-Sherbeeney, M.R., y Bryan, F.L. 1985. Microbiological profiles of egyptian raw vegetables and salads. *J. Food Prot.* 48 (883-886).

Salunkhe, D.K. y Kadam, S.S.(Ed). 1995. Handbook of fruit science and technology. Marcel Dekker, INC. New York, New York.

Schaack, M.M. y Marth, E.H. 1988. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic acid lactic bacteria. *J. Food Prot.* 51 (607-614).

Scheusner, D.L. y Harmon, L.G. 1973. Growth and enterotoxin production by various strains of *Staphylococcus aureus* in selected foods. *J. Food Sci.* 38 (474-476).

Schlech, W. F. III, Lavigne, P. M., Bortolussi, R.A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., y Broome, C. V. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308 (203-206).

Schuchat A, Swaminathan, B., y Broome, C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiolo Rev.* 4 (169-183).

Sikes, A. 1989. Fate of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in certain low moisture military rations during procesing and storage. Presentation, Annual IFT Meeting Chicago, Illinois, June.

Simon, M., Tarragó, C. y Ferrer, M.D. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Bercelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 16 (153-156).

Sionskowski, P.J. y Shelef, L.A. 1990. Viability of *Listeria monocytogenes* strain Brie-1 in avian egg. *J. Food Prot.* 53 (15-17).

Sockett, P.N. 1991. The economic implications of human salmonella infection. *J. Appl. Bacteriol.* 71 (289-295).

Tauxe, V.R. 1997. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. *Emerging infection diseases.* 13-4.

Todd, E.C.D. 1984. Economic loss resulting from microbial contamination of food. (151-166). In Proceedings of the second national conference for food protection. U.S. Food and Drug Administration, Contract N° 223-84-2087. Washington, DC.

Todd, E.C.D. 1989. Preliminary estimates of cost of foodborne diseases in The United States. *J. Food Prot.* 52 (595-601).

Tood E. C. D. 1996. Worldwide survillance of foodborne disease: the need to improve. *J. Food Prot.* 59-1 (82-92).

Upton, M. 1995. Relationships between pathogen growth and the general microbiota on raw and processed meat and poultry. *J. Food Safety.* 15 (133-144).

Van Renterghem, F., Huysman, F., Rygole, R. y Verstraete W. 1991. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. J. Appl. Bacteriol. 71 (211-217).

Wachsmuth, I. K Sparling, P. H. Barrett, T. J. y Potter, M. E. 1997. Inmunol. and Medical Microbiol. 18 (233-239).

Walker, G.C. y Harmon, L.G. 1965. The growth and resistance of *Staphylococcus aureus* in milk and broth substrates. J. Food Sci. 30 (351-358).

Warburton, D.W. Farber, J.M. Powell, N.P. Tiwari, S.R. Plante, R. Babiuk, T. Laffey, P. Kauri, T. Mayers, P. Champagne, M-J. Hunt, T. LaCasse, P. Viet, K. Smando, R. y Coates, F. 1992. Comparisio of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 9 (127-145).

Warburton, D.W., Oggel, J., Bowen, B., Crawford, C., Durzi, S., Gibson, E., Foster, R., Fox, C., Gour, L., Krohn, G., McDonah, S., Mackenzie, J., Tood, E.C.D., Shaw, S., Tiwari, N.P., Trottier, Y., y Wheeler, B.D. 1994. A comparison study of modified 1-2 Test and HPB standard method in isolation of *Salmonella*. Food Microbiol. 11 (253-263).

Weis, J. y Seeliger, H.P.R. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30 (29-33).

WHO. 1997. Prevention and control of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) Infections: Report of a WHO consultation. Geneva.

Yotis, W. y Teodoro, R. 1957. The influence of temperature on the generation time of bacteria commonly found in milk. J. Dairy Res. 24 (27-31).

Zadik, P.M. Chapman, P.A. y Siddons, C.A. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. J. Med. Microbiol. 39 (155-158).

Zhuang, R.-Y., Beuchat, L.R. y Angulo F.J. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on raw tomatoes as affected by temperature and treatment with Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 61(2127-2131).

Zubiran, S. 1992. Tablas de uso práctico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México. Comisión Nacional de Alimentación. Instituto Nacional de la Nutrición.