

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN FILTRACIÓN POR MEMBRANA
PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS BACTERIANOS EN MELÓN, *Cucumis
melo* (L., 1753) Y CHILE JALAPEÑO, *Capsicum annum* (L., 1753).

Por

Q.B.P. LAURA ESTHER TIJERINA RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con acentuación en MICROBIOLOGÍA

Julio, 2014

"Validación de un método basado en filtración por membrana para la detección de patógenos bacterianos en melón, *Cucumis melo* (L., 1753) y chile jalapeño, *Capsicum annuum* (L., 1753)".

Comité de Tesis

Dr. José Santos García Alvarado
Director de Tesis

Dr. Eduardo Sánchez García
Secretario

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de este proyecto, al Doctor José Santos García Alvarado por la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos (LABGEM) en conjunto con la Doctora Norma Laura Heredia Rojas, y al resto de mi Comité de Tesis, el Dr. Eduardo Sánchez García, Dra. Licet Villarreal Treviño y Dra. Luisa Y. Solís Soto.

A mis compañeros de LABGEM que me apoyaron y ayudaron en diferentes momentos de mi proyecto con su orientación primero que nada a Fabiola Venegas, a Cindy Caballero Prado, Diego Francisco Benítez Chao, Jorge Dávila y Alejandra Huerta Treviño.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIAS

Este proyecto y la obtención del grado de Maestría, se lo dedico completamente a Dios y a mi Madre, Esther Rodríguez Lorenzo, quien me ha enseñado a luchar por todo lo que quiero, y a perseguir mis sueños, quien siempre me ha alentado a mejorar y a nunca desistir, es mi mayor ejemplo de perseverancia, gracias Madre por ser parte de uno más de mis éxitos, cada triunfo que alcanzo es un triunfo tuyo pues Dios nos ha permitido compartir momentos de alegría, tristeza y frustración en cada uno de los caminos a una nueva meta que me he propuesto, y por todo el tiempo que me has dedicado siendo mi mejor amiga y la mejor Madre.

Así como a mi tía y madrina, la cual se nos adelantó en el camino, Laura Rodríguez, a la cual siempre admiré por su gran fortaleza, y por ser una gran profesionista la cual desde que era niña me alentó a ser una mujer digna con altas aspiraciones de superación, sé que desde el cielo ella ve mis logros y está orgullosa de mí.

También se la dedico a los mejor amigos y compañeros de posgrado que pude tener, Ashanti Concepción Uscanga Palomeque, y José Alberto Aguilar Briseño a los cuales admiro y aprecio enormemente por su alto sentido de responsabilidad y por su gran inteligencia, gracias por ayudarme y apoyarme en la etapa más difícil que he tenido emocionalmente, por ser parte de las personas que me ayudaron a salir delante de tal tormento ya que gracias a eso pude continuar en este camino y realizar este sueño junto con ustedes.

Al amor de mi vida, Jorge Humberto Rague del Valle, por haber sido una inspiración y por haberme motivado todos los días con palabras de aliento y escuchar sobre cada uno de mis experimentos, mis momentos de éxito y de derrota.

INDICE

	Sección	Página
Portada		i
Hoja de Firmas		ii
Agradecimientos		iii
Dedicatorias		iv
Índice		v
Índice de Tablas		viii
Índice de Figuras		ix
Lista de símbolos y abreviaturas		x
Resumen		xi
Abstract		xiii
1 Introducción		1
2 Definición del problema y justificación		3
3 Antecedentes		4
3.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos		5
3.2 Hortalizas		6
3.3 Brotes		7
3.4 Métodos de detección de patógenos		7
3.5 Validación		12
4 Hipótesis		16
5 Objetivo general		18
6 Objetivos particulares		21
7 Material y método		24
8 Resultados		34
8.1 Análisis de detección de enteropatógenos en melón		35
8.2 Análisis de cuantificación mediante el número más probable en melón		36
8.3 Validación del método de filtración por membrana en melón		39
8.4 Análisis de detección de enteropatógenos en chile jalapeño		43
8.5 Análisis de cuantificación mediante el número más probable en chile jalapeño		46
8.6 Validación del método de filtración por membrana en chile jalapeño		49
9 Discusión		53

10 Conclusión	59
11 Bibliografía	61
12 Resumen biográfico	67

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título
1	Combinaciones de cepas utilizadas
2	Medios de cultivo utilizados para detección y cuantificación de enteropatógenos.
3	Determinación de parámetros para la validación de acuerdo a ISO 16140:2003
4	Análisis de Presencia/Ausencia de Patógenos en melón
5	Resultados de Cuantificación en melón por los métodos de Filtración por membrana (FPM), stomacher y esponja.
6	Análisis de Varianza ANOVA de un factor y DMS Fisher en melón por los métodos de FPM, stomacher y esponja.
7	Análisis de Presencia/Ausencia de Patógenos en chile jalapeño por los métodos de FPM, stomacher y esponja.
8	Resultados de Cuantificación en chile jalapeño por los métodos de FPM, stomacher y esponja.
9	Análisis de Varianza ANOVA de un factor y DMS Fisher en chile jalapeño por los métodos de FPM, stomacher y esponja.
10	Resultados globales de Eficacia, Sensibilidad y Especificidad Relativa del método de FPM comparado con el método de homogeneización por Stomacher y la técnica de esponja en melón (rosa) y chile jalapeño (verde).

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título
1	Procedimiento de armado de filtros
2	Porcentaje de resultados positivos en el análisis de Presencia/Ausencia en melón por los métodos de FPM, stomacher y esponja.
3	Porcentajes de Eficacia (AC), Sensibilidad (SE) y Especificidad Relativa (SP) según ISO16140:2003, del método de FPM comparado con stomacher y esponja para cada patógeno en melón.
4	Porcentaje de resultados positivos en el análisis de Presencia/Ausencia en chile jalapeño por los métodos FPM, stomacher y esponja.
5	Porcentajes de Eficacia (AC), Sensibilidad (SE) y Especificidad Relativa (SP) según ISO16140:2003, del método de FPM comparado con stomacher y esponja para cada patógeno en chile jalapeño.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
AC	Eficacia relativa
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
BAM	Bacteriological Analysis Manual
BPA	Buenas prácticas de Agricultura
BPM	Buenas prácticas de Manufactura
CDC	Center for Disease Control
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DMS	Diferencia mínima significativa
EEUU	Estados Unidos
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FPM	Filtración por membrana
g	Gramos
h	Horas
ICC	Infusión cerebro corazón
Log	Logaritmo
min	Minutos
ml	Mililitros
NA	Concordancia negativa
ND	Desviación negativa
nm	Nanómetros
NMP	Número más probable
OMS	Organización Mundial de la Salud
oz	Onzas

PA	Concordancia positiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Desviación positiva
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SE	Sensibilidad relativa
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SP	Especificidad relativa
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina shiga
TSB	Caldo soya tripticaseína
UFC	Unidades formadoras de colonias
XLD	Agar xilosa lisina desoxicolato
µl	Microlitros

RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) afectan aproximadamente a 48 millones de personas anualmente en los Estados Unidos, y según la OMS los siete principales patógenos bacterianos que pueden encontrarse en los alimentos incluyen a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp, *Clostridium perfringens* *Staphylococcus aureus* y *Shigella* sp. Los microorganismos capaces de provocar enfermedades humanas pueden encontrarse en productos agrícolas crudos, en ocasiones formando parte de la microflora de las frutas y hortalizas, como contaminantes provenientes del suelo, el polvo y el entorno; en otros casos, se introducen a través de malas prácticas de producción. El melón ocupa el séptimo lugar en importancia mundial en producción y el octavo lugar entre las hortalizas que se cultivan en México, destacando por su alto contenido en agua, altos niveles de proteínas y fibra, así como de vitamina C y antioxidantes los cuales se ha descrito que previenen el cáncer y enfermedades cardiovasculares. El melón se desarrolla directamente sobre la superficie de la tierra, por lo que existe un alto riesgo que su superficie sea contaminada por patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli* o *Listeria* spp. en cualquier momento de su producción. Entre los cultivos hortícolas, el cultivo de chile es el más importante a escala nacional, debido a que es uno de los principales ingredientes de la cocina tradicional. Son comúnmente consumidos crudos, tanto en México como en otros países y se relaciona también con algunos efectos medicinales. Los métodos para la detección de patógenos en productos crudos desempeñan un papel importante en la mitigación de brotes, proporcionando datos sobre la presencia del microorganismo en alimentos contaminados. En este estudio se comparó la eficiencia y sensibilidad de un sistema de filtración por membrana (FPM) y el sistema de esponja con un método tradicional (Stomacher) para la concentración y búsqueda de patógenos bacterianos en melón y chile jalapeño. Los resultados mostraron que el método de FPM es igual o mejor que el método de esponja y stomacher para la detección de *S. entérica*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. El límite de detección fue de 2 log CFU para *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* O157:H7 en chile jalapeño, y en el caso de melón, 2 log CFU para *E. coli* O157:H7 y 4 log CFU para *Salmonella* y *Listeria*. En todos los casos, con una sensibilidad, especificidad y eficacia relativa mayor a 98%. El método de FPM puede ser considerado como una buena opción para la detección de bacterias patogénicas en este tipo de producto.

ABSTRACT

Foodborne diseases affect around 48 million people annually only in the United States. According to WHO, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes*, are among the major pathogens that can be found as contaminants of fresh produce. Cantaloupe and jalapeño pepper, are produce commonly eaten raw, which have differences on surface and growth conditions on field, can made them representative of other vegetables. To reduce risks of contaminations, search for more efficient methods for detection of these pathogens in those products are an actual necessity. For this reason, a Membrane Filtration Method (MFM) was utilized for concentration and search of *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. Jalapeño peppers and cantaloupes were inoculated with tree levels of inoculum (10^2 , 10^4 and 10^6 CFU), and processed by rubbing sponge, homogenization by stomacher and the MFM. In all cases sensibility, the specificity and the relative accuracy was compared between them. To determine the detection limit, quantification of the recuperation levels was analyzed by the Most Probable Number (MPN) technique, and the results obtained were analyzed by the Kruskal Wallis test, one way-ANOVA, and the Fisher test. Results showed that MFM is equal or better for the detection of *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 and *L. mono* on cantaloupe and jalapeño pepper when compared with rubbing sponge and homogenization by stomacher. The limit of detection was 2 log for *Salmonella*, *L. mono* and *E. coli* O157:H7 on jalapeño pepper, and in the case of cantaloupe, the detection limit was 2 log for *E. coli* O157:H7, and 4 log CFU for *Salmonella* and *L. mono*. In all cases, the sensibility, specificity and relative accuracy was more than 98%. The MFM method could be a good option for detection of pathogenic bacteria with this kind of produce.

1.- INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el consumo de frutas y vegetales se ha incrementado y con ello las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs). Éstas, se denominan a aquellas enfermedades que se adquieren por medio del consumo de alimentos contaminados con agentes biológicos, entre otros. La causa más común son las infecciones e intoxicaciones, las cuales constituyen un problema de salud pública y se reconoce cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud de la población, ya sea por la frecuencia con la que ocurren o bien por el impacto que pueden causar, afectando a una persona o a grupos de ellas.

Durante el 2008, la CDC registró 1034 brotes de ETAs en EEUU, de los cuales las principales causas fueron frutas (24%) y verduras (23%). Esto pudiera ser debido en parte al aumento en las posibilidades de contaminación a los que los frutos están expuestos por el contacto con el agua y con el medio ambiente en general (CDC, 2008)

La calidad microbiológica de productos hortofrutícolas puede verse mermada en diferentes pasos del proceso de producción, pudiendo darse contaminación durante la precosecha, cosecha, empaque y distribución de la misma, debido a diversos factores como pudieran ser entre otros, el uso de agua contaminada para el riego, malas prácticas higiénicas de los manipuladores o bien los animales que pudieran contaminar el producto.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los siete principales patógenos bacterianos que pueden encontrarse en los alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp. (Rivas M. et. al., 2008). Para la identificación de estos patógenos en diversos productos, existen métodos basados en técnicas inmunológicas, moleculares y microbiológicas, sin embargo algunos de ellos son costosos e ineficientes.

Actualmente los principales métodos que se utilizan para muestreo e identificación de patógenos incluyen el de absorción por esponja y el método de stomacher además se ha reportado el sistema de filtración por membrana.

La validación de métodos microbiológicos alternativos es un proceso el cual tiene como

principal objetivo confirmar y documentar la confiabilidad de los resultados obtenidos. Con esta se determinan las posibles variaciones que se presentan entre diferentes números de ensayos y de esta manera disminuir posibilidades de error dentro del método, generando un alto grado de confianza en los resultados finales arrojados por el sistema validado.

Basados en estas premisas el presente trabajo tuvo como finalidad validar un método de filtración por membrana para la detección de patógenos importantes como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en melón y chile jalapeño.

2.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La demanda de frutas y hortalizas se ha incrementado generando que la comercialización de productos hortofrutícolas esté dirigida a los que sean manejados y/o conservados por tecnologías de mínimo procesamiento y de aceptable calidad microbiológica. Sin embargo, los problemas a la salud de los consumidores se han incrementado por la proliferación de microorganismos.

El control y prevención de las ETAs es un desafío actual en todo el mundo, especialmente debido a que no se conoce su real incidencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que, dependiendo del país, entre el 15% y el 70% de los casos de diarrea en menores de cinco años de edad se deben al consumo de alimentos contaminados.

Una probable causa del desconocimiento real de la incidencia de microorganismos patógenos es el uso de procedimientos o técnicas de muestreo e identificación no apropiados o con baja sensibilidad, por lo que es importante el desarrollo de un control analítico adecuado de los alimentos con estandarización de los métodos de análisis.

Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo plantear y validar un modelo alternativo para la detección de ciertas bacterias patógenas presentes en la superficie de chile jalapeño y melón a fin de establecer alternativas para una detección más rápida y eficaz de los patógenos en comparación con los métodos tradicionales que se utilizan actualmente.

3.- ANTECEDENTES

3.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) como el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos o no biológicos en cantidades tales que afecten a la salud del consumidor en forma aguda o crónica.

Según la OMS, los siete principales patógenos bacterianos que pueden encontrarse en los alimentos incluyen: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *Shigella* sp., *L. monocytogenes* y *Campylobacter* sp. (Rivas M. *et. al.*, 2008).

Se estima que las ETAs afectan aproximadamente a 48 millones de personas anualmente en los Estados Unidos, provocando gran cantidad de enfermedades de las cuales 9.4 millones son causadas por patógenos conocidos (Scallan *et. al.*, 2011). El reporte de brotes de ETAs más reciente publicado por el Center for Disease Control (CDC), en Enero del 2013, menciona que *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 productora de toxina Shiga (STEC), *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *Shigella* así como Norovirus son los principales patógenos causantes de brotes en los últimos dos años.

Salmonella

Los miembros del género *Salmonella* spp. son bacilos cortos en forma de bastón, flagelados, Gram negativos (Harvey *et. al.*, 2008). Son bacterias mesófilas con temperaturas óptimas para el crecimiento de 35-43°C. La tasa de crecimiento se reduce sustancialmente a menos de 15°C, mientras que el crecimiento de la mayoría de las serovariedades se suspende a menos de 7°C. Son anaerobios facultativos, capaces de sobrevivir temporalmente en ambientes bajos de oxígeno (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

Actualmente éste género está formado por tres especies *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*, esta clasificación fue aprobada en el 2005. *S. enterica* se divide en seis subespecies, *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Lin-Hui Su *et. al.*, 2007). Todas las cepas de importancia clínica se agrupan en ésta especie, y se encuentra formada por aproximadamente 2,500 serovariedades, entre los cuales se encuentran *S. enterica* serovar. Typhimurium y *S. enterica* serovar. Typhi. La mayoría

de las especies de *Salmonella* no fermentan lactosa y producen ácido y gas durante la fermentación de la glucosa, así como ácido sulfhídrico a partir de aminoácidos que contienen azufre (Harvey *et. al.* 2008).

Fuentes y tipos de contaminación

Salmonella spp. se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, abunda en materia fecal, alcantarillado y aguas residuales contaminadas y en consecuencia pueden contaminar el suelo y los cultivos con los que entran en contacto. Los sedimentos pueden contener un elevado número de estos microorganismos y, si se utilizan para fines agrícolas, difundirán la bacteria. Una vez introducido este microorganismo en el medio ambiente, es capaz de permanecer viable durante meses (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

El género de *Salmonella* spp. se asocia naturalmente con los cuerpos de todos los animales. Ha sido aislada de muchos mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces e insectos. La comida es la principal fuente de contaminación para los seres humanos, especialmente los alimentos de origen animal y así como a contaminación por aguas residuales (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

Patogenia

Salmonella spp. invade las células epiteliales del intestino delgado. La enfermedad puede permanecer localizada o convertirse en sistémica, a veces con focos diseminados. El microorganismo es un parásito intracelular facultativo que sobrevive en el interior de las células fagocitarias (Harvey *et. al.*, 2008).

Importancia clínica

Las infecciones por *Salmonella* pueden causar tanto enfermedades intestinales como extraintestinales, entre las que se encuentran la gastroenteritis y fiebre entérica también llamada fiebre tifoidea.

La gastroenteritis (salmonelosis no tifoidea), es producida principalmente por las serovariedades Enteritidis y Typhimurium. Se caracteriza por náuseas, vómitos y diarrea (normalmente no sanguinolenta), que aparecen generalmente a las 48 horas de haber ingerido alimentos o agua contaminada, en donde la fiebre y los calambres abdominales son comunes. En pacientes no comprometidos, la enfermedad dura un tiempo limitado que puede ir de 48 a 72 horas (Harvey *et. al.*, 2008).

La fiebre entérica (tifoidea) es una enfermedad sistémica grave, e incluso potencialmente mortal, que se caracteriza por fiebre y, con frecuencia, síntomas abdominales. La serovariedad Typhi es su principal causante. Los síntomas no específicos son escalofríos, sudoración, cefalea, anorexia, debilidad, dolor de garganta, tos, mialgia, diarrea o bien estreñimiento. Aproximadamente el 30% de los pacientes desarrolla una suave erupción maculopapular en el tronco. El período de incubación varía entre 5 y 21 días. Si no se trata, la mortalidad alcanza casi el 15%. Entre las complicaciones cabe citar hemorragias intestinales y, raramente, infecciones localizadas y endocarditis. Un pequeño porcentaje de pacientes se convierte en portadores crónicos (Harvey *et. al.*, 2008).

La bacteriemia prolongada se asocia a menudo con infecciones vasculares causadas por *Salmonella*, que se desarrollan cuando la bacteria forma placas ateromatosas. También puede causar infecciones abdominales (a menudo del tracto hepatobiliar y el bazo), osteomielitis, artritis séptica y, raramente, infecciones en otros tejidos u órganos (Harvey *et. al.*, 2008).

Escherichia coli

E. coli es un bacilo entérico Gram negativo, habitante común del tracto intestinal de mamíferos, el cuál puede actuar como patógeno tanto fuera como dentro del tracto gastrointestinal. Es anaerobio facultativo, presentan fimbrias o pilis, que son de gran importancia para adherirse a las superficies mucosas del hospedero, y distintas cepas de esta especie pueden ser móviles o inmóviles. Son capaces de fermentar glucosa y la mayoría de las cepas fermentan la lactosa, produciendo ácido y gas. Las diferencias en el grado de virulencia de distintas cepas de *E. coli* son resultado de plásmidos individuales y del repertorio de probacteriófagos integrados a cada uno (Harvey *et. al.*, 2008).

La identificación de las cepas se basa en diferencias entre tres antígenos estructurales: O, H y K. Los antígenos O se encuentran en la fracción polisacárida de los lipopolisacáridos y son termoestables. Los antígenos H se asocian con los flagelos. Los antígenos K se asocian, generalmente con la cápsula y con menor frecuencia, con las fimbrias. Entre los especímenes de *E. coli* existen diversos antígenos O, H y K, que son distintos serológicamente; cada serovariedad específica se asocia con una enfermedad determinada. Se han identificado al menos seis tipos de enfermedades intestinales que difieren en el mecanismo de patogenicidad, y son producidas por grupos diferentes de cepas de *E. coli*: enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y enterohemorrágica

(EHEC) dentro de la cual se encuentra la productora de Shiga toxina (STEC) (Croxen M.A et. al., 2010).

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), se adhieren a las células del intestino grueso, donde producen verotoxina(s) o toxinas de tipo disentérico, que causa una colitis hemorrágica sin invasión de la mucosa ni inflamación. El serotipo O157:H7 es responsable de brotes de diarrea sanguinolenta y también es asociada al síndrome urémico hemolítico (HUS) (Harvey *et. al.* 2008).

Fuentes y tipos de contaminación

El reservorio principal de *E. coli* O157:H7 se cree que es el tracto gastrointestinal bovino. Por lo tanto, la contaminación de los alimentos asociados con las heces es un factor de riesgo significativo. La contaminación y la supervivencia del microorganismo en fuentes naturales de agua, las convierten en fuentes potenciales en la distribución de la infección, particularmente si el agua no tratada es consumida directamente, o utilizada para riego de los cultivos (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

Listeria monocytogenes

Las cepas del género *Listeria* se caracterizan por ser cocobacilos que tienden a formar cadenas cortas de 3-5 células. Es una bacteria ácido-tolerante, halotolerante y criotolerante (Madigan, M.T., *et. al.*, 2004).

Una característica de particular interés de *L. monocytogenes* es su temperatura mínima para el crecimiento que es de 4.4°C, mientras que la óptima es de 30-37°C. Es un microorganismo anaerobio facultativo, capaz de crecer o sobrevivir en bajas concentraciones de oxígeno (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

Las formas más comunes de infección por *L. monocytogenes* son la septicemia y la meningitis. Con menor frecuencia causan lesiones de tipo focales granulomatosas en la piel. Las mujeres embarazadas, sobretodo en el tercer trimestre, pueden padecer una enfermedad leve parecida a la gripe. Ésta, como la colonización vaginal asintomática, puede transmitirse al recién nacido o al feto e inducir aborto. Las personas inmunodeprimidas, especialmente si tienen defectos de la inmunidad celular, son susceptibles de padecer infecciones generalizadas de carácter grave (Harvey *et. al.*, 2008).

Fuentes y tipos de contaminación

El microorganismo *L. monocytogenes* se considera ubicuo en el medio ambiente, al ser aislados de suelo, heces, aguas residuales, ensilaje, estiércol, agua, barro, paja, alimentos para animales, polvo, aves, animales y el hombre. También es asociado con material vegetal, incluidos arbustos, hierbas silvestres, maíz, cereales y vegetales en estado de descomposición. Dado que *L. monocytogenes* se produce ampliamente en el suelo y en el ambiente agrícola general, está presente de forma natural en muchos vegetales. La contaminación de estos puede ocurrir a través de prácticas agrícolas, tales como el riego con agua contaminada o la fertilización con estiércol contaminado (Francis, G. A. *et. al.*, 1999).

3.2 HORTALIZAS

El reconocimiento de la importancia del consumo habitual de frutas y vegetales y el notable incremento en la disponibilidad, en cualquier época del año, ha contribuido en un aumento considerable en su consumo en los últimos veinte años (Zepp, 1998), generando que la comercialización de estos productos esté dirigida principalmente a aquellos que sean manejados y/o conservados por tecnologías de mínimo procesamiento y de aceptable inocuidad microbiológica.

Los microorganismos capaces de provocar enfermedades humanas pueden encontrarse en productos agrícolas crudos, en ocasiones formando parte de la microflora de las frutas y hortalizas como contaminantes provenientes del suelo, el polvo y el entorno. En otros casos, se introducen en los alimentos a través de malas prácticas de producción agrícola y manipulación, como la aplicación de abono sin tratar, el uso de agua de riego contaminada o prácticas higiénicas deficientes del personal en contacto con el producto (Hernández-Brenes *et. al.*, 2002).

En los Estados Unidos, The Food and Drug Administration (FDA), publicó en 1998 la “*Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos para las Frutas y Hortalizas Frescas*”, cuyo propósito principal era proporcionar un marco para la identificación e implementación de prácticas que pudieran reducir el riesgo de contaminación microbiano a través de las etapas de producción, empaque y transporte, basado tanto en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) como en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Johnston *et. al.*, 2005). Las anteriores son un conjunto de

principios, normas y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de alimentos, orientadas a cuidar la salud humana, proteger al medio ambiente y mejorar las condiciones de los trabajadores. Estas normas deben ser cumplidas por los productores y empacadores para poder exportar productos agrícolas.

El gobierno de México en conjunto con la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y la SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) establecieron de igual manera los lineamientos de BPA y BPM, para reducir los riesgos de contaminación en productos agrícolas, incluyendo melón y chile jalapeño, tratando de puntualizar y explicar aspectos que se deben de tener muy presentes para el buen manejo del producto.

Las BPA consideran las actividades de campo, preparación del cultivo, cosecha y transporte al empaque; mientras que las BPM consideran las actividades de empaque, desde la recepción del producto hasta su envío a los mercados (Lineamientos BPA y BPM SENASICA, 2005).

Melón

El melón es una fruta originaria de África y Asia. Es clasificada dentro de los cultivos cíclicos y ocupa el séptimo lugar en importancia mundial en cuanto a producción y superficie cultivada y cuarto lugar en rendimientos. En México se cultivan 13 variedades de melón, entre las que destacan las de tipo Cantaloupe (chino, rugoso o reticulado) y Honey Dew (melón amarillo o gota de miel). El melón destaca principalmente por su alto contenido en agua (90%) y su escaso valor calórico, por lo que es un alimento ideal para evitar la obesidad o incluso para adelgazar, es rico en carbohidratos así como altos niveles de proteínas y fibra. Destaca su contenido en vitamina C, ya que 100 gramos de melón nos proporcionan más de la mitad de la vitamina C recomendada al día. Además de ser una buena fuente de β -carotenos, antioxidantes que previenen contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2010).

El melón ha sido identificado como un vehículo para patógenos como *Salmonella* en EEUU y Canadá y ha resultado el agente etiológico de más de 800 casos entre 1990 y el 2000. Estudios recientes de la FDA en producto nacional, reportaron un 2.4% de incidencia de *Salmonella* y 0.6% de *Shigella* en 115 muestras de melón. En el 2001 y 2002, fueron reportados numerosos casos y dos muertes en los EEUU y Canadá por

salmonelosis asociados al consumo de melones procedentes de México contaminados con *S. enterica* serovar Poona (Espinoza A. *et. al.*, 2011).

El melón se desarrolla a ras de suelo en contacto con tierra, por lo que existe un alto riesgo de que su superficie sea contaminada por patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli* o *Listeria* spp. Estudios de diferentes métodos de lavado y sanitización de melón han demostrado una parcial efectividad en la reducción de la población microbiana, debido a la forma característica de red que posee la corteza y en donde los patógenos pueden fijarse en sitios inaccesibles a los instrumentos de lavado, también se le atribuye a daños en la integridad de su corteza que permitan la infiltración del microorganismo y la formación de biopelículas (Annous B. *et al.*, 2004).

El melón ocupa el octavo lugar en importancia entre las hortalizas que se cultivan en México y el tercer lugar entre la familia de las cucurbitáceas en cuanto a la superficie cosechada. Esta fruta ha sido un producto muy importante, tanto por ser generador de divisas para el país, como por ser una gran fuente de empleo y de ingreso para los productores mexicanos. En el ámbito nacional, se cosechan 26,586 hectáreas de melón, con una producción de 553,449 toneladas y un rendimiento promedio de 20.82 ton/ha (SENASICA, 2010).

Durante 1995 a 2005, México exportó 1,747 miles de toneladas de melón. De 2001 a 2005, se exportó a los Estados Unidos el 71%, mientras que el 28% se canalizó a Japón y el 1% restante a Canadá y España. El comportamiento de las exportaciones tuvo una tasa media anual de crecimiento de menos del 10% en el periodo de referencia, dejándose de exportar 95 millones de toneladas en 2005 (Espinoza A. *et. al.*, 2011).

El principal socio comercial de México es Estados Unidos, país al que se dirige el 94% de las exportaciones mexicanas de melón. Como se mencionó previamente la demanda del melón de los estadounidenses era del 71% por lo que ha llevado una tendencia a la baja a partir de 2002, ya que este país cerró sus fronteras para ésta hortaliza debido a problemas fitosanitarios. En Octubre de ese año la FDA argumentó haber detectado *Salmonella* spp. en melones Cantaloupe procedentes del estado de Guerrero, los cuales provocaron 18 hospitalizaciones. En noviembre del 2002 se publicó la norma mexicana emergente para la producción y el empaque de melón NOM-EM-038-FITO-2002, en donde se establecieron requisitos para la aplicación y certificación de BPA y BPM. En consecuencia, se autorizó que sólo cinco empresas pudieran exportar melón a Estados

Unidos bajo estrictas medidas de higiene (Espinoza A. *et. al.*, 2011).

En Octubre de 2005 se abrió nuevamente la frontera a empresas que obtuvieron la certificación de SENASICA y se sometieron a un programa de verificación realizada por SAGARPA. Para tal efecto, se expidió una certificación por parte del SENASICA que consiste básicamente en lineamientos de buenas prácticas, avalada por la FDA. Además de contar con pruebas de laboratorio de Estados Unidos que comprueben que el producto se encuentra libre de *Salmonella* spp. u otro patógeno (Espinoza A. *et. al.*, ; 2011).

Chile Jalapeño

Entre los cultivos hortícolas, el cultivo de chile es el más importante a escala nacional, ello se debe a que desde tiempos prehispánicos es uno de los ingredientes de la cocina tradicional. Son comúnmente consumidos crudos, por ejemplo en ensaladas verdes o salsas, tanto en México como en otros países. Lo que estimula el sentido del gusto es la capsaicina, químico cien veces más picante que la pimienta y que estimula la liberación de neurotransmisores e incentiva los puntos receptores de dolor de la lengua y el paladar. El cerebro responde con endorfinas que incrementan el metabolismo liberando más saliva y sudor. El chile se relaciona también con algunos efectos medicinales: aumenta el número de calorías quemadas durante la digestión, reduce los niveles de colesterol, es un anticoagulante y se le asocia con cualidades antioxidantes. Tradicionalmente se usa como infusión para el asma, la tos, el resfriado; como analgésico en casos de artritis, como antiinflamatorio; incluso tiene propiedades para combatir el cáncer de próstata (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2010).

Además de ser una de las hortalizas de mayor consumo en la población mexicana, el cultivo es importante por el valor que aporta a la producción agrícola de las regiones involucradas, debido a que genera ingresos competitivos para los productores y porque la cosecha abarca alrededor de 150 días (jornales) por hectárea en zonas de riego, fomentando la creación de empleos que es reflejo de un impacto social positivo; el cual trasciende las fronteras de México (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2010).

La producción de chile a escala mundial se localiza principalmente en China, México, Turquía, España, Estados Unidos, Nigeria e Indonesia. En los últimos 10 años, esa

producción, se ha incrementado gradualmente a nivel mundial (SAGARPA, 2002).

En el 2009, la producción en México se ubicó en 1.99 millones de toneladas, volumen menor en 65 mil 701 toneladas a la del 2008. Aproximadamente la tercera parte de la producción nacional es de chile jalapeño. En diez años (2000-2009) la tasa de crecimiento promedio anual del volumen exportado fue de 14.6%. De acuerdo con cifras mundiales de comercio de la Food and Agriculture Organization (FAO), México es el principal exportador de chile verde y sexto lugar en ventas de chile seco al extranjero. El ingreso del país por concepto de exportaciones fue de 720 millones de dólares en 2009, el volumen triplicó al del año 2000. En el 2009, el producto nacional fue adquirido por 52 países de los cinco continentes. Estados Unidos compró 98.3%, por el cual pagó 705 millones de dólares. El Reino Unido, Canadá y Alemania representan en conjunto un punto porcentual de las compras, con volúmenes entre 2,100 y 2,600 toneladas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2010).

3.3 BROTES

Durante el 2009-2010, se reportaron 1527 brotes de ETAs (675 en el 2009 y 852 en el 2010) en los Estados Unidos, de los cuales se presentaron 29,444 enfermos, 1,184 hospitalizaciones y 23 defunciones, 790 casos fueron confirmados para un único agente etiológico, donde norovirus fue el mayormente reportado (42%) siendo *Salmonella* spp. la segunda (30%), de los cuáles *S. enteritidis* fue el mayor responsable. *E. coli* del grupo STEC fue responsable de 58 casos confirmados, de los cuales 53 fueron causados por el serogrupo O157. De los brotes relacionados con hospitalización, la principal causa se atribuyó a *Salmonella* spp. (49%), seguida por STEC (16%) y Norovirus (9%). Los brotes causados por *Listeria* spp., tuvieron la mayor proporción de personas hospitalizadas (82%), seguida por *Clostridium botulinum* (67%). De 23 muertes, 22 fueron atribuidas a etiología bacteriana, 9 a *L. monocytogenes*, 5 a *Salmonella* spp., 4 a *E. coli* O157 STEC, 3 a *C. perfringens* y 1 a *Shigella sonnei* (CDC, 2013).

Específicamente para frutas y hortalizas, un gran número de patógenos bacterianos se han visto implicados en brotes de ETAs asociados a estos productos frescos (Beuchat, 1998). En los últimos años (2009-2012) se reportaron brotes por contaminación de frutas y vegetales, por ejemplo, de espinacas y lechuga romana, con *E. coli* O157:H7, mango, melón, papaya, tomate y chile con *Salmonella enterica* serovar Braenderup, *S. enterica*

serovar. Typhimurium, *S. enterica* serovar. Newport, *S. enterica* serovar Agona y *S. enterica* serovar Montevideo. Así como brotes por contaminación de melón con *L. monocytogenes* (CDC, 2011).

Específicamente en melón, en Agosto del 2012 se reportó un brote de 261 personas infectadas con cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Newport, en 24 estados de EEUU, donde 94 personas se hospitalizaron y en el estado de Kentucky se reportaron 3 muertes. Investigación por parte de las autoridades de salud indicó que la causa de este brote eran melones originarios de Chamberlain Farms Produce, de Ownesville, Indiana (CDC, 2012).

Por otro lado, en Junio del 2011 un total de 20 personas se infectaron con la cepa *S. enterica* serovar. Panama en los estados de Arizona (1), California (2), Colorado (1), Maryland (1), Montana (1), Nevada (1), Oregon (6), Pennsylvania (1), Utah (1) y Washington (5). Los pacientes tenían un rango de edad de 1-68 años, con una mediana de 13 años y 65% de ellos eran hombres. Aunque 3 personas fueron hospitalizadas no se reportaron defunciones. En este caso el producto responsable de estos brotes fue melón procedente de Guatemala (CDC, 2011).

En el caso de *L. monocytogenes*, en el 2011, melones contaminados procedentes de Colorado, EEUU provocaron el brote con mayor número de defunciones en aproximadamente 90 años por este microorganismo. Este fue el tercer brote de listeriosis reportado en EEUU y el primero causado por melón. La mayoría de los pacientes informó haber consumido melón un mes antes que la enfermedad comenzara. Las cuatro cepas de *L. monocytogenes* responsables del brote fueron aisladas de las muestras de melón procedentes de Jensen Farms (CDC, 2011).

Estudios llevados a cabo en Washington, D.C. durante un brote multiestatal de infección por *Salmonella enterica* serovar. Saintpaul en el 2008 revelaron asociaciones entre la enfermedad y el consumo de chiles jalapeños y tomates. La cepa del brote se aisló de una muestra de jalapeño obtenido de un importador de productos agrícolas en Texas que recibió chiles jalapeños de una planta de empaque en Nuevo León, México. Las investigaciones de rastreo de los jalapeños implicados condujeron a las granjas de Tamaulipas y Nuevo León, México (Castro-Rosas J. *et. al.*, 2011).

3.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS

Los métodos para la detección de patógenos en productos crudos pueden desempeñar un papel importante en la mitigación de brotes como los anteriores, proporcionando datos sobre la presencia del microorganismo en alimentos contaminados (Bisha B. *et al.*, 2008).

Existen diversos métodos de identificación de patógenos en la industria alimentaria, basados en técnicas inmunológicas, moleculares y microbiológicas, sin embargo, algunos de ellos son costosos, e inaccesibles.

Para la detección de microorganismos indicadores, tales como coliformes totales y coliformes fecales se ha empleado el método de filtración por membrana, el cual es un método altamente reproducible, puede usarse para analizar volúmenes de muestra relativamente grandes obteniéndose resultados en menor tiempo (Páez, 2008, Heredia, *et al.*, 2014).

Filtración por membrana

En el caso del proceso de filtración por membrana en agua, la muestra se hace filtrar al vacío a través de una membrana, de modo que las bacterias quedan retenidas en ella. La membrana se coloca en un medio de cultivo específico según lo que se desea determinar en la muestra, por ejemplo, coliformes totales, coliformes fecales o microorganismos mesofílicos (Páez, 2008). Sin embargo, en cuanto a las características de la membrana utilizada, ésta debe tener un diámetro de poro que permita una completa retención de las bacterias. Se debe tener en cuenta que las membranas estén libres de químicos susceptibles de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano; y que posean una velocidad de filtración satisfactoria (Heredia, *et al.*, 2014).

El método de filtración por membrana es un método ágil y económico. La lectura de resultados se puede realizar en un menor tiempo (24 horas) en comparación los métodos tradicionales, además se pueden hacer enjuagues de las hortalizas en campo, eliminando el transporte de estos al laboratorio. Se ha reportado que este tipo de filtración se dificulta en muestras de aguas muy turbias o con abundante carga bacteriana, sin embargo este inconveniente es posible remediarlo, haciendo diluciones de la muestra o haciendo inóculos muy pequeños de acuerdo con el tipo de muestra a analizar (Páez, 2008, Heredia, *et al.*, 2014).

Homogeneización

El análisis microbiológico de alimentos sólidos o semi-sólidos, dependen de una adecuada dilución y homogeneización de la muestra. Diversos métodos de homogeneización han sido utilizados para la preparación de muestras de alimentos, de las cuales los métodos de licuado y homogeneización mediante “Stomacher” (digestor) han sido ampliamente aceptados. En un inicio el método de licuado era el método estándar hasta que el método de Stomacher fuera introducido en 1972, y desde entonces ha ganado aceptación debido a su desempeño y facilidad de uso. Ambos métodos son muy similares, están basados en diluir la muestra en proporción 1:10 en una solución amortiguadora y mezclar utilizando una licuadora (8000 rpm) durante 2 minutos, o durante 30 a 60 segundos en Stomacher. Dickson en 1990, evaluó el efecto de ambas técnicas de homogeneización para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de muestras de carne y concluyó que no existe una diferencia significativa ($P \leq 0.10$) entre la técnica de licuadora y Stomacher.

En el 2003, Seo *et al.*, realizaron un estudio en el que se inocularon huevos con *Salmonella enteritidis*, sometiéndose a diferentes métodos de homogeneización, de tipo mecánico, (con Stomacher y licuadora), y manuales (agitación y masajeo). El objetivo de éste estudio fue evaluar si estos métodos afectaban la recuperación del microorganismo en huevos crudos. Los resultados mostraron que las muestras mezcladas con los métodos manuales tuvieron poblaciones significativamente mayores a las 24 y 48 horas de incubación, en comparación con las muestras mezcladas mecánicamente; las muestras que presentaron menor número de recuperación fueron las que se sometieron a la técnica con licuadora.

En el 2012, G. Kisluk *et al.* evaluaron diferentes métodos de homogeneización para desprender células de *S. Typhimurium* de hojas de perejil inoculadas artificialmente, con el fin de determinar su eficiencia para cuantificar; las técnicas evaluadas fueron homogeneización manual, mortero, centrifugación, vórtex, stomacher y sonicador, seguido de cultivo en placa, obteniendo un porcentaje de recuperación menor a 1% al inocular 3.5-6.5 log UFC/g, menores niveles de inóculo fueron indetectables por la mayoría de las técnicas.

Esponja

Otro método para la recuperación de microorganismos en alimentos, es el método (no destructivo) de esponja. La cuál se basa en humedecer una esponja estéril en solución

amortiguadora, y retirando el excedente de solución, frotar firmemente aproximadamente 10 veces en dirección horizontal, y 10 veces en dirección vertical un área previamente delimitada de aproximadamente 100cm² de la superficie de la muestra.

Trenton Seager *et al.*, realizaron un estudio en el 2010, en el que utilizaron este método para análisis de canales de cerdo, con el fin de determinar la proporción de microorganismos que pudieran ser recuperados. La proporción de bacterias recuperadas varió entre 11.1 y 97.4%. Entre el 26.2 y 28.6% de las esponjas fueron capaces de recuperar el 50% de la población microbiana la cual era inicialmente de 100,000 unidades formadoras de colonias (UFC). Esta variabilidad fue atribuida a diversos factores, entre los cuales destacan, la técnica del operador debido a que el vigor con el que es frotada la superficie afecta en el número de bacterias que eran recuperadas, la cantidad de grasa que se encuentre en la superficie del alimento ocasionando que los poros de la esponja se ocluyan, así como la capacidad que la propia esponja posee para retener bacterias. Aunque, los resultados indicaron que el método de esponja es conveniente pero variable para la recuperación de bacterias, sigue siendo un método valioso para la evaluación de la higiene de los canales de cerdo.

Löfström *et al.* en el mismo año, evaluaron la misma técnica, también en canales de cerdo, sin embargo su objetivo fue cuantificar *Salmonella enterica* y fue precedido de análisis molecular por la técnica de PCR, permitiendo la detección desde 4.4×10^2 a 2.2×10^7 UFC por esponja, usando PCR tiempo real, demostrando que con el uso de las esponjas, la técnica de PCR podría prescindir la homogeneización de la muestra, simplificando el método de cuantificación independiente de cultivo considerablemente.

3.5 VALIDACIÓN

La validación de un método es el estudio comparativo entre el método alternativo que se quiere proponer y el método de referencia. Se busca el grado de correspondencia que hay entre el resultado obtenido con el método de referencia y la respuesta obtenida con el método alternativo en muestras idénticas. El método alternativo debe demostrar que ofrece resultados comparables, o mejores, que los obtenidos con el método de referencia. El método alternativo se podrá usar si ofrece resultados equivalentes al de referencia. (Martínez, I., 2011)

Los métodos de análisis utilizados en la validación microbiológica integral de un

producto alimentario o en la elaboración de las normas de higiene en muestras tipo, deben poseer al menos cinco atributos: facilidad, rapidez, reproducibilidad, garantía intrínseca de ausencia de errores y automatización o cierto grado de mecanización (Álvarez *et. al*, 1999).

La norma ISO 16140:2003 define sensibilidad relativa como la capacidad del método alternativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia. Por lo tanto, una alta eficacia diagnóstica significaría la capacidad de detectar de manera precisa el microorganismo diana en la matriz biológica sin que existan interferencias con componentes no-diana. Dicha normativa, además, define eficacia relativa como el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo en muestras idénticas. El método alternativo presenta una desviación positiva si da un resultado positivo cuando el método de referencia da un resultado negativo, y presenta una desviación negativa si da un resultado negativo cuando el método de referencia da un resultado positivo. Una desviación positiva se convierte en un resultado falso positivo cuando se demuestra que el resultado negativo es el verdadero, y una desviación negativa se considera como un verdadero positivo cuando se demuestra que el resultado verdadero es el positivo. Una desviación negativa se convierte en un resultado falso negativo cuando se demuestra que el resultado positivo es el verdadero.

Según la norma ISO 16140:2003, el estudio comparativo de un método cualitativo (estudio que se ha realizado en este trabajo de tesis) consta de distintas partes. Por un lado hay que calcular la eficacia relativa, la especificidad relativa y la sensibilidad relativa del método que se va a validar.

En un estudio realizado en el año 2006, Alfaro *et al*. demostraron, por medio de análisis estadístico tipo descriptivo, que las técnicas de filtración por membrana y sustrato definido de Readycult 100 (Merck), empleadas para la detección de coliformes totales y *E. coli* en aguas crudas, tratadas y potables en el acueducto de Zipaquirá, Colombia fueron realmente eficaces y arrojaron resultados confiables. Asimismo, se concluyó que el método de filtración por membrana, empleando tres tipos de microorganismos, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, fue más sensible que el sustrato definido Readycult, ya que se estableció que el límite de cuantificación para la técnica de filtración por membrana fue de 1 UFC/100 ml en tanto que para el sustrato definido fue

de 22 UFC/100 ml (Alfaro *et. al.*, 2006).

Páez Sanabria en el 2008 realizó la validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *E. coli* en aguas para consumo humano analizadas en el Laboratorio de Salud Pública del Huila, Bogotá, comprobando que mediante este se pueden obtener resultados reproducibles y confiables.

Elles *et al.*, 2010, validaron la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método de filtración por membrana, a partir de la evaluación de la precisión y la incertidumbre, demostrando que el método de filtración por membrana fue eficiente y adecuado para utilizarlo en el laboratorio de control de calidad de Aguas de Cartagena Colombia S.A E.S.P.

En base a todo lo anterior, en el presente trabajo se pretendió comparar la eficiencia y sensibilidad de un sistema de filtración por membrana con métodos tradicionales utilizados actualmente como el método de homogeneización por stomacher y la técnica de esponja para la concentración y búsqueda de patógenos bacterianos en melón y chile jalapeño.

4.- HIPÓTESIS

El sistema de filtración por membrana para la búsqueda de *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, y *Escherichia coli* O157:H7 en chile jalapeño y melón es igual de efectivo que el método tradicional (homogeneización por stomacher) y el uso de esponja.

5.- OBJETIVO GENERAL

Validación del método de filtración por membrana para la concentración y búsqueda de *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes* y *Escherichia. coli* O157:H7 en productos vegetales como chile jalapeño y melón.

6.- OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del sistema de filtración por membrana.
2. Comparar la eficiencia del sistema de filtración por membrana con los sistemas utilizados actualmente (tradicional por homogeneización con stomacher y esponja).
3. Validar el método de filtración por membrana para la búsqueda de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en chile jalapeño y melón.

7.- MATERIAL Y MÉTODO

En este trabajo se realizó la detección y recuento de los enteropatógenos *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria* en muestras de melón y chile jalapeño mediante diferentes técnicas: tradicional (homogeneización por stomacher), esponja y el método de filtración.

Obtención de muestras

Las muestras de melón Cantaloupe y chile jalapeño fueron obtenidas de supermercados del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Las frutas eran obtenidas sin presentar daño visible y fueron transportadas en refrigeración y se utilizaron durante las siguientes 24h de haber sido obtenidas.

Lavado del producto

Para su lavado, las muestras de melón y chile jalapeño fueron sumergidas en etanol 95%, y se agitaron suavemente por 60s, posteriormente fueron lavadas con hipoclorito de sodio a 200ppm agitando por 60s, se procedió a realizar 3 ciclos de lavado con agua estéril y finalmente se secaron sobre un papel estéril enseguida del mechero en un cuarto a temperatura ambiente durante 60 min.

Activación de las cepas bacterianas

Las cepas que se utilizaron fueron las siguientes y se realizaron cocteles de cada género:

- *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028
- *Salmonella enterica* serovariedad Typhi ATCC 19430
- *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 y 43895
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- *Listeria innocua* ATCC 33090

Los cultivos fueron almacenados en refrigeración a 4°C en tubos con agar inclinado de infusión cerebro corazón (ICC, Bioxon).

Las cepas se activaron cada 3 meses en tubos con 10 ml de Caldo Soya Trypticasa (TSB, Bioxon) seguidos de una incubación a 37°C durante 18 h. Para obtener cultivos activados, se tomó una alícuota de 2 ml de la cepa y se inocularon en 200 ml de TSB y se incubaban a 37°C durante 24h para *Salmonella* y *E. coli*, y a 30°C durante 48 h para *Listeria*.

Ajuste de la concentración bacteriana y realización de cocteles

Se centrifugaron las cepas del mismo género, a 3500 rpm/20 min a temperatura ambiente, se decantaron y se resuspendieron en 10 ml con solución salina fisiológica estéril (0.85% v/v), se realizó un coctel tomando 5 ml de cada cepa en un tubo estéril mismo que se homogeneizó en vórtex. Se determinó la densidad celular del coctel mediante su absorbancia (0.220-0.300) a 600 nm (10^8 UFC/ml), y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 1 log UFC/ml. Para corroborar la densidad celular, se realizaron conteos en placa en medios selectivos y en agar para métodos estándar. Los cocteles realizados fueron dependientes de género, y en la siguiente tabla se muestran las especies que incluyeron cada uno de ellos.

Tabla 1.- Cocteles

Cepa	Coctel		
	1	2	3
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	X		
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430	X		
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894		X	
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895		X	
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114			X
<i>L. innocua</i> ATCC 33090			X

DETERMINACIÓN DE ENTEROPATÓGENOS EN PRODUCTOS VEGETALES

INOCULACIÓN DE LOS PRODUCTOS VEGETALES

a) Melón.

Se utilizaron tres niveles de inóculo inicial: alto, medio y bajo correspondiente a 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC/100 μ l respectivamente. Para el caso del método de stomacher y el método de esponja, a partir del melón previamente descontaminado, se cortaron rebanadas de la superficie de 5 x 10 cm (50cm²), los cuales no excedieron de 0.5 cm de espesor. Se inocularon 100 μ l de cada uno de los niveles de inóculo (tratamientos) distribuyéndolos en 10 puntos en forma homogénea del corte. Se analizó también una rebanada la cual no fue inoculada a fin de verificar el correcto lavado del melón. Para el método de filtración por membrana, se inocularon melones completos, de la misma manera que lo descrito anteriormente. Posteriormente se dejó reposar el producto a temperatura ambiente durante 30 min, para permitir la adhesión de los microorganismos inoculados.

b) Chile.

En una bolsa estéril (Nasco-Whirl Pack) se colocaron 9 ml de los diferentes cocteles y se agregaron 3 chiles jalapeños (de 25 g aproximadamente cada uno), previamente lavados y fueron masajeados manualmente por 30s. Se dejaron reposar durante 30min a temperatura ambiente, para permitir la adherencia de los microorganismos a la superficie, posteriormente se sacaron de la bolsa, se transfirieron a una bolsa vacía estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min.

DETERMINACIÓN DE PRESENCIA/AUSENCIA DE ENTEROPATÓGENOS EN MUESTRAS VEGETALES

Procesamiento de la muestra.

A) Método tradicional (homogeneización por stomacher)

Se utilizaron las rebanadas de melón y las 3 piezas de chile jalapeño que fueron inoculados con los diferentes cocteles. En el caso del melón, se pesaron las rebanadas y se agregó el volumen de caldo de enriquecimiento (Tabla 2) necesario para obtener una dilución 1:10, en tanto que los chiles se colocaron en una bolsa de 18oz con 300 ml de caldo de enriquecimiento, posteriormente se homogeneizó durante 2 min utilizando un stomacher (digestor, 400 Circulator, Seward) y se incubó cada bolsa a 37°C durante 24h para *Salmonella* y *E. coli*, en tanto que para *Listeria* fue por 48h.

B) Método de esponja

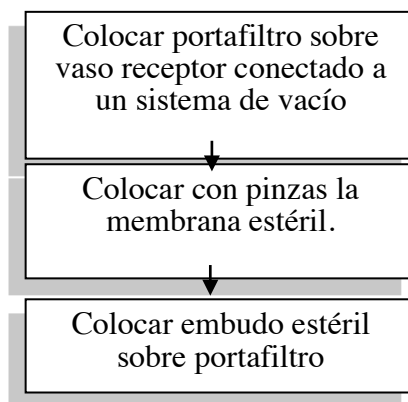
Se utilizó una esponja estéril (3.8 x 7.6 cm) previamente sumergida en 25 ml de agua peptonada al 0.1%. Después de quitar el exceso de agua de la esponja exprimiéndola con guantes estériles, se frotó la rebanada del melón o la superficie de los 3 chiles jalapeños para después sumergirla nuevamente en la bolsa con el agua peptonada. A partir de esta solución se tomaron 10 ml los cuales fueron transferidos a una bolsa con caldo de enriquecimiento específico para cada coctel de cepas (Tabla 2). Se homogeneizó manualmente la bolsa con la esponja y el caldo por 30 s y se incubaron tal como se especificó en el punto anterior.

C) Método de filtración

Los melones completos que estaban inoculados fueron enjuagados con 500 ml de agua peptonada al 0.1%. Para el caso del chile jalapeño, se tomaron los 3 chiles y se colocaron en una bolsa con 300 ml de agua peptonada estéril. En ambos casos se masajearon manualmente por espacio de 30 s a temperatura ambiente.

Diferentes cantidades de estos enjuagues se hicieron pasar por el sistema de filtración por membrana, tal y como se especifica en el diagrama siguiente.

Figura 1. Procedimiento de armado de filtros



El procedimiento consistió en colocar la membrana estéril de nitrocelulosa de 0.45 μm de diámetro de poro, estando cerrado el vacío. Posteriormente se agregaron sobre la membrana 20 ml de agua peptonada estéril y sobre esta se agregaron diferentes volúmenes de muestra 10 ml, 1ml y 0.1ml, esparciendo la muestra homogéneamente, se abrió la válvula y se aplicó vacío para realizar la filtración. Una vez terminado, la membrana se retiró del portafiltro con ayuda de pinzas estériles y se colocó en una bolsa

estéril de 18oz con 90 ml de caldo de enriquecimiento específico para los diferentes cocteles, y se incubó en las condiciones especificadas anteriormente.

Determinación de la presencia de los patógenos en las muestras.

Detección de *Salmonella*

Después de haber transcurrido el tiempo de incubación del caldo de enriquecimiento, para el caso de los métodos de referencia, homogeneización por stomacher y esponja, se tomó una alícuota de 100 μ l de muestra y se transfirió a un tubo con 10ml de medio de enriquecimiento secundario Rappaport Vassidialis (Difco) y se incubó durante 24h a 42° (en el caso del método de FPM, se omitió el enriquecimiento secundario). Para el aislamiento se tomó una alícuota y se estrió sobre placas con agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (Bioxon). Las placas se incubaron a 37°C durante 24h, tiempo después del cual se buscaron las colonias típicas (color rojo-anaranjadas con ennegrecimiento en el centro).

Detección de *Listeria monocytogenes*

Se tomó una alícuota del caldo de enriquecimiento para *Listeria* y se estrió en placas con agar Oxford (Difco) y se incubaron a 30°C durante 24-48h. Se consideró positiva a la placa con colonias negras con un halo claro alrededor.

Detección de *Escherichia coli* O157:H7.

Después de haber transcurrido el tiempo de incubación en el caldo de enriquecimiento, se estrió una alícuota sobre placas con agar McConkey Sorbitol (Difco) y se incubaron a 37°C durante 24h. Se consideró como positiva la placa con colonias transparentes.

CUANTIFICACIÓN DE ENTEROPATÓGENOS MEDIANTE NÚMERO MÁS PROBABLE

Con el fin de cuantificar los microorganismos recuperados por cada uno de los métodos se realizó la técnica de Número Más Probable (NMP) tal y como se describe a continuación.

Se realizaron tres diluciones primarias de las muestras vegetales (la solución obtenida del enjuague de esponja, homogeneización por stomacher y de filtración por membrana.

Para la cuantificación se realizó un sistema de NMP que consiste en 3 series de 3 tubos cada uno con caldo de enriquecimiento específico para cada coctel en donde se agregó 1 ml de cada una de las tres diluciones decimales previamente realizados. Las series de tubos se incubaron a 37°C de 18-24 h. Transcurrido este tiempo, en el caso de *Salmonella* se llevó a cabo un enriquecimiento adicional, transfiriendo 0.1ml de ellos a tubos con caldo de enriquecimiento secundario (Tabla 2) en el caso del método de homogeneización por stomacher y esponja, e incubando a 42°C por 24 h. Posteriormente, se tomó una alícuota y fue sembrada sobre la superficie de medio selectivo para el aislamiento de cada coctel (Tabla 2). Se consideraron positivos aquellos tubos que hayan presentado crecimiento sobre la superficie del agar cuyas características morfológicas fueron típicas para la cepa inoculada. El número aproximado de microorganismos se determinó comparándolo con la tabla de NMP obtenida del Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM) y en el caso de aquellas series que contenían una menor cantidad de muestra que la mencionada en las tablas, se utilizó la fórmula de aproximación de Thomas, 1992 sugerida por el BAM:

$$\text{MPN/g} = (\sum g_j) / (\sum t_j m_j \sum (t_j - g_j) m_j)^{1/2}$$

$\sum g_j$: número de tubos positivos

$\sum t_j m_j$: gramos de muestra en todos los tubos

$\sum (t_j - g_j) m_j$: gramos de muestra en tubos negativos

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para la detección y cuantificación de enteropatógenos.

	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Pre-enriquecimiento	Caldo de Preenriquecimiento Universal	Caldo de enriquecimiento para <i>Listeria</i>	Caldo Lauril Triptosa
Enriquecimiento Secundario	Caldo de Tetracionato	NA	NA
Medios Selectivos (agar)	XLD	Oxford	MacConkey Sorbitol
Interpretación de colonias en el agar	Colonias rojo-anaranjadas con ennegrecimiento en el centro.	Colonias negras con un halo claro	Colonias transparentes

*NA: No Aplica.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Se calcularon los parámetros eficacia, especificidad y sensibilidad relativa, de acuerdo a la normativa ISO16140:2003 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos”

Se sometieron los resultados obtenidos con filtración por membrana (método alternativo) con los obtenidos con el método de stomacher (método de referencia) y con la técnica de esponja (método de referencia) por separado, al siguiente análisis para calcular la concordancia positiva (PA), concordancia negativa (NA), desviación positiva (PD) y desviación negativa (ND), y así determinar la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa.

Tabla 3.- Tabla de resultados para validación de acuerdo a ISO 16140:2003

	Método de referencia positivo (R+)	Método de referencia negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	Concordancia positiva (PA) (A+/R+)	Desviación positiva (PD) (R-/A+)
Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (ND) (A-/R+)	Concordancia negativa (NA) (A-/R-)

Eficacia relativa: $AC = (PA + NA)/N \times 100\%$

Especificidad relativa: $SP = NA/N. \times 100\%$

Sensibilidad relativa: $SE = PA/N_+ \times 100\%$

Dónde:

N es el número total de muestras (NA+PA+PD+ND);

N. es el número total de resultados negativos con el método de referencia (NA+PD);

N₊ es el número total de resultados positivos con el método de referencia (PA + ND).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS versión 20, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente un análisis ANOVA de un factor con comparación múltiple por la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher, con un nivel de significancia de 0.05.

8.- RESULTADOS

8.1 ANÁLISIS DE DETECCIÓN EN MELÓN

Cuando se realizaron los ensayos de filtración por membrana para detección de *Salmonella* con un nivel de inóculo inicial de 10^6 UFC se pudo detectar a este microorganismo en el 100% de los casos en todos los volúmenes que se filtraron (10 ml, 1 ml y 0.1 ml), estos mismos resultados se obtuvieron con las técnicas tradicionales probadas (homogeneización por stomacher y esponja). Cuando el inóculo fue de 10^4 UFC se detectó a la bacteria en el 100% de los casos cuando se filtraron 10 ml y 1ml, sin embargo, solo se pudo detectar al microorganismo en el 40% de los casos cuando se filtró 0.1 ml. Cuando las muestras se procesaron por homogeneización por stomacher y esponja se detectó a *Salmonella* en el 100% de los casos. Cuando la cantidad de microorganismos inoculada fue 10^2 UFC encontramos que con la homogeneización por stomacher pudo detectarse a *Salmonella* en el 60% de los casos, en tanto que se detectó en el 20% de las muestras cuando se procesaron por esponja y con filtración por membrana (10 ml). Cuando se filtraron volúmenes menores (1 ml o 0.1 ml) no se detectó a *Salmonella* en ninguno de los casos .

Tabla 4.- Análisis de Presencia/Ausencia de Patógenos en Melón

Método/Nivel inóculo	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli</i> O157:H7		
	Numero de muestras positivas/ número de muestras totales								
	10^6	10^4	10^2	10^6	10^4	10^2	10^6	10^4	10^2
Filtración 10ml	10/10	10/10	2/10	6/6	6/6	4/10	6/6	6/6	8/8
Filtración 1ml	10/10	10/10	0/10	6/6	6/6	1/10	6/6	6/6	8/8
Filtración 0.1ml	10/10	4/10	0/10	6/6	6/6	1/10	6/6	6/6	8/8
Stomacher	10/10	10/10	6/10	6/6	6/6	6/10	6/6	6/6	6/8
Esponja	10/10	10/10	2/10	6/6	6/6	2/10	6/6	6/6	6/8

Resultados expresados en número de resultados positivos entre número de repeticiones totales por patógeno (Salmonella, Listeria y E. coli O157:H7) en tres niveles de inóculo inicial para cada método en melón. Nivel de Inóculo inicial: alto 6 logUFC, medio 4 log UFC y bajo 2 log UFC totales por corte o unidad dependiendo del caso.

Cuando analizamos la detección de *Listeria* en inóculos de 10^6 y 10^4 UFC, la bacteria pudo ser detectada en el 100% de los casos cuando se procesaron por todas las técnicas analizadas y todos los volúmenes filtrados. Sin embargo, cuando el inóculo fue de 10^2 UFC solo se pudo detectar al microorganismo en el 60% de los casos cuando se procesaron por homogeneización por stomacher y 20% por la técnica de esponja (Tabla 4, Figura 2b). Sin embargo, por el método de filtración se pudo detectar a *Listeria* en el 40% de los casos cuando el volumen filtrado fue de 10ml y 10% cuando se filtraron 1ml y 0.1ml (Tabla 4, Figura 2b).

En el caso de *E. coli* O157:H7 en inóculo de 10^6 y 10^4 UFC se pudo detectar a la bacteria en el 100% de los casos (Tabla 4, Figura 2c) al procesar la muestra por todos los métodos probados; sin embargo, cuando se inoculó 10^2 UFC y se procesaron por el método de stomacher y de esponja, la bacteria se pudo detectar en el 75% de los casos, mientras que por el método de FPM se detectó en todos los casos (100%) al filtrar 10 ml, 1 ml y 0.1 ml (Tabla 4, Figura 2c).

8.2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

El análisis de cuantificación de los microorganismos patógenos presentes en las muestras se realizó mediante la técnica de Número Más Probable (NMP). En general, nuestros resultados mostraron una mejor recuperación a medida que los inóculos eran mayores (Tabla 5). En los ensayos en los que se obtuvieron variaciones importantes, se realizaron más repeticiones a fin de obtener una media representativa.

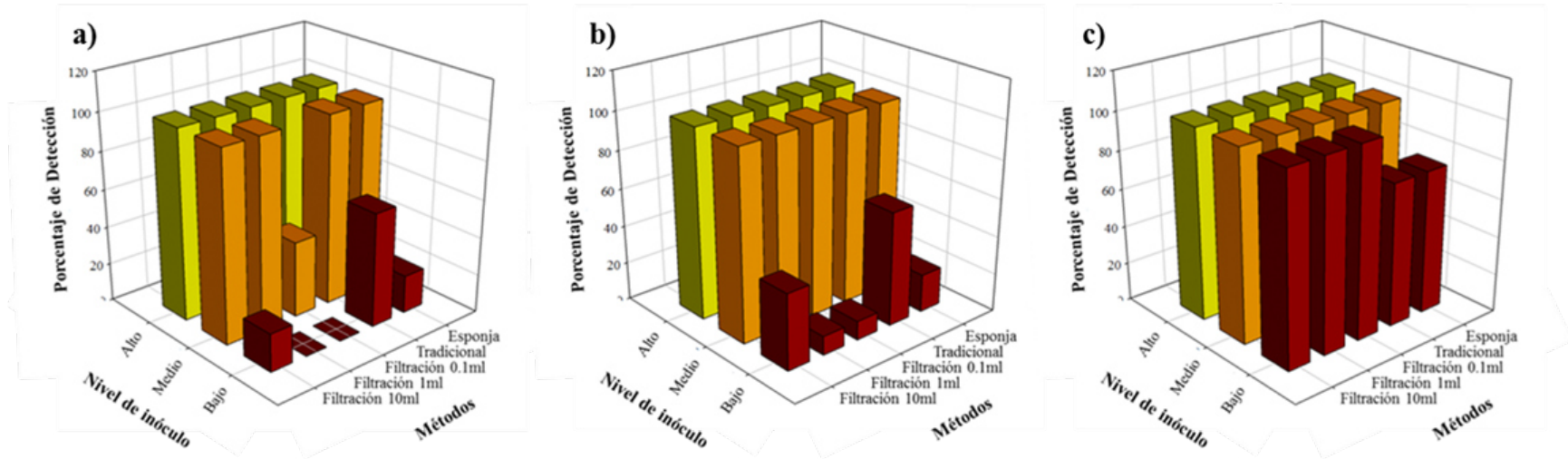


Figura 2.- Porcentaje de muestras positivas obtenidas al utilizar tres métodos para el proceso en el análisis de Presencia/Ausencia en melón. *Salmonella* (a), *Listeria* (b) y *E. coli* O157:H7 (c) en melón eje de las y, en el eje de las x se encuentran los métodos, en el eje de las z el nivel de inóculo inicial: alto (10⁶ UFC), medio (10⁴ UFC) y bajo (10² UFC).

Tabla 5. Cuantificación en melón por los métodos de Filtración por membrana (FPM), stomacher y esponja.

Método/ Nivel inóculo	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli</i> O157:H7		
	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁴	10 ²
Filtración 10ml	2.316	1.267	0.699	2.318	2.316	1.477	2.318	2.316	2.318
Filtración 10ml	2.316	1.146	0.462	2.318	1.146	0.462	2.318	1.146	2.318
Filtración 10ml	2.316	1.362	0.462	2.318	2.140	0.462	2.140	2.140	2.318
Filtración 10ml	2.316	2.316	0.462			0.462			2.318
Filtración 10ml	2.316	1.568	0.462			0.477			2.318
Filtración 1ml	2.818	1.763	0.863	2.641	1.881	0.462	2.818	1.881	2.641
Filtración 1ml	2.818	0.978	0.462	2.641	0.556	0.462	2.818	0.556	2.818
Filtración 1ml	2.818	1.447	0.462	2.641	2.109	0.462	2.641	2.109	2.818
Filtración 1ml	2.818	1.881	0.462			0.462			2.818
Filtración 1ml	2.818	2.279	0.462			0.462			2.818
Filtración 0.1ml	0.467	0.462	1.477	3.142	2.009	0.462	3.142	2.009	3.318
Filtración 0.1ml	0.444	0.462	0.462	3.142	0.462	0.462	3.318	0.462	3.142
Filtración 0.1ml	2.933	0.462	0.462	3.142	0.462	0.462	3.142	0.462	2.933
Filtración 0.1ml	2.933	2.265	0.462			0.462			2.933
Filtración 0.1ml	0.334	1.813	0.462			0.462			2.933
Tradicional	2.818	0.978	0.462	2.818	1.053	0.462	2.818	1.053	2.060
Tradicional	2.818	2.276	0.462	2.818	0.462	0.462	2.818	0.462	0.462
Tradicional	2.641	2.140	0.462	2.818	0.462	0.462	2.641	0.462	1.660
Tradicional	2.641	2.276	0.462			0.462			1.978
Tradicional	2.818	0.462	0.462			0.462			1.792
Esponja	2.818	0.462	0.462	2.818	1.297	0.462	2.818	1.297	2.280
Esponja	2.818	0.556	0.462	2.818	2.278	0.462	2.818	2.278	1.978
Esponja	2.433	0.477	0.462	2.818	2.279	0.556	2.641	2.279	0.462
Esponja	2.433	1.188	0.462			0.462			1.660
Esponja	2.818	0.462	0.462			0.462			1.660

Para determinar que los niveles de detección fueran comparables entre los métodos de homogeneización, esponja y FPM (0.1, 1 y 10ml) se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos. Los resultados mostraron que los valores no tuvieron una distribución normal, por lo cual se realizó el análisis no paramétrico Kruskal Wallis para todos los casos y un ANOVA de un factor para analizar si había diferencias entre las varianzas de los métodos (En la Tabla 5 se muestran los valores de NMP/g en logaritmo, obtenidas de los ensayos por concentración de inóculo y por el método analizado). Posteriormente se realizó el análisis de Diferencia Mínima Significativa de Fisher (DMS Fisher) para realizar una comparación entre los métodos que en el análisis de ANOVA presentaron

diferencia significativa con el fin de determinar que tratamiento (método) es el que mostraba diferencia significativa (<0.05) comparado con los demás métodos.

Tabla 6.- Análisis de Varianza ANOVA de un factor y DMS Fisher

Inóculo	Volumen	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli O157:H7</i>		
		Filtración	Tradicional	Esponja	Filtración	Tradicional	Esponja	Filtración	Tradicional	Esponja
Alto	10	2.316a	2.747a	2.664a	2.318a	2.818b	2.818b	2.259a	2.759b	2.759b
	1	2.818a	2.747a	2.664a	2.641a	2.818a	2.818a	2.759a	2.759a	2.759a
	0.1	1.422a	2.747a	2.664a	3.142a	2.818a	2.818a	3.2b	2.759a	2.759a
Medio	10	1.532b	1.628b	0.63a	1.867b	0.659a	1.951b	1.867a	0.659a	1.951a
	1	1.670b	1.628b	0.63a	1.515a	0.659a	1.951a	1.515a	0.659a	1.951a
	0.1	1.093a	1.628a	0.63a	0.978a	0.659a	1.951a	0.978a	0.659a	1.951a
Bajo	10	0.51a	0.462a	0.462a	0.668a	0.462a	0.481a	2.318a	1.59a	1.608a
	1	0.543a	0.462a	0.462a	0.462a	0.462a	0.481a	2.782b	1.59a	1.608a
	0.1	0.665a	0.462a	0.462a	0.462a	0.462a	0.481a	3.052b	1.59a	1.608a

Diferentes letras muestran diferencias significativas $p < 0.05$ entre los diferentes métodos por nivel de inóculo.

En el caso de *Salmonella*, cuando se inocularon 10^6 UFC, el FPM (10ml, 1ml y 0.1ml) no mostró diferencia significativa con el método de homogeneización con stomacher y la técnica de esponja, así como tampoco hubo diferencia entre estos últimos, resultando que todos fueron capaces de recuperar de manera semejante a los microorganismos analizados. Para los ensayos con inóculo medio (10^4 UFC), el FPM (10ml y 1ml) fue estadísticamente semejante al método de homogeneización con stomacher, sin embargo la técnica de esponja tuvo diferencia con el método de homogeneización con stomacher y el FPM (10ml y 1ml) recuperando una menor cantidad de NMP/g. Cuando se utilizó el FPM (0.1ml), se obtuvieron resultado estadísticamente similares a los otros dos métodos analizados

Para *Listeria*, cuando se inocularon los melones con 10^6 UFC y se procesó por el FPM (10 ml) se obtuvo una menor recuperación ($P < 0.05$) que con los otros métodos probados. Esta diferencia no fue observada cuando los volúmenes de filtración fueron menores (1ml y 0.1ml), a pesar de que al haber mayor volumen de filtración, debería de haber mayor contenido de bacterias, esta diferencia se observa principalmente al haber contaminación de 10^6 UFC, con el método de NMP, debido a que esta técnica no es recomendada para cuantificar altas concentraciones de bacterias debido a que puede haber una subestimación de los valores reales, por lo tanto es más efectivo filtrando menor volumen, las cuales tendrán menores concentraciones bacterianas.

Cuando el inóculo fue de 10^4 UFC se observó el mismo comportamiento del FPM (1 m y 0.1 ml) que cuando el inóculo era mayor, sin embargo, cuando el volumen filtrado fue

de 10 ml los resultados fueron semejantes ($P < 0.05$) con los obtenidos por el métodos de esponja en tanto que el método de homogeneización con stomacher presentó un menor grado de recuperación. Cuando el inóculo fue de 10^2 UFC no se obtuvo diferencia significativa entre el método de FPM (10 ml, 1 ml y 0.1 ml) con los otros métodos analizados.

Cuando se analizó la recuperación de *E. coli* O157:H7 que se había inoculado a niveles de 10^6 UFC, el método FPM (10 ml) mostró una menor recuperación ($P < 0.05$) que las otras técnicas analizadas; sin embargo, cuando los volúmenes filtrados fueron menores (1 ml y 0.1 ml) no se observó diferencia con los otros métodos probados. Cuando el nivel de inóculo inicial fue 10^4 UFC no se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre los tres métodos probados y los diferentes volúmenes filtrados por el método de FPM; en tanto que con el inóculo bajo (10^2 UFC) el método de FPM fue semejante a los otros dos probados, solo si el volumen filtrado fue de 10 ml, en tanto que recuperó mayor número de microorganismos ($P < 0.05$) que los otros dos métodos analizados si los volúmenes filtrados fueron mejores (1 ml y 0.1 ml).

8.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FPM EN MELÓN

Cuando se realizó el análisis de los datos para determinar la validación del método de FPM, los porcentajes obtenidos mostraron la misma probabilidad de obtener ausencia/presencia entre todos los métodos analizados, lo cual se describe a detalle a continuación y se encuentran en la Tabla 10.

Salmonella

Filtración por membrana.- 10ml

Se determinaron los valores de eficacia (AC), especificidad (SP) y sensibilidad relativa (SE) del método de FPM comparándolo con los otros dos métodos analizados en forma independiente para cada uno, separando los niveles de inóculo y a su vez los volúmenes utilizados para FPM. En el caso de *Salmonella* el método de FPM en un volumen de 10 ml, mostró 99.01% de AC, SP y SE comparándolo con el método de homogeneización por stomacher y con el de esponja, para los tres niveles de inóculo utilizados en el estudio. Esto significa que con cualquier de las técnicas de procesamiento utilizadas en este trabajo se puede recuperar a este microorganismo (en más del 95%) cuando la muestra esté contaminada con niveles de 10^2 UFC o mayores.

Filtración por membrana.- 1ml

En el caso del método de FPM en un volumen de 1ml, se obtuvo 99.01% de AC, SP y

SE, comparado con el método de homogeneización por stomacher y con el de esponja, en el caso de muestras inoculadas con niveles de 10^6 y 10^4 UFC, sin embargo cuando utilizamos un inóculo de 10^2 UFC, obtenemos 0.99% en los tres parámetros, por lo tanto el método de FPM de 1ml es muy efectivo solo cuando las muestras están muy contaminadas con la bacteria (arriba de 10^4 UFC).

Filtración por membrana.-0.1 ml

Cuando utilizamos 0.1 ml y lo procesamos por el método de FPM se obtuvo 99.01% de AC, SP y SE cuando el inóculo era de 10^6 UFC. Estos mismos valores fueron encontrados con el método de homogeneización por stomacher y por el de esponja. Cuando el inóculo fue de 10^4 UFC los valores encontrados fueron del 40% en los tres parámetros y de 0.99% cuando el inóculo fue de 10^2 UFC. Es decir que el método de FPM es igual de efectivo que los otros dos métodos solo cuando las muestras están muy contaminadas (10^6 UFC).

Listeria

Filtración por membrana.- 10ml

El método de FPM (10 ml) obtuvo 98.36% de AC, SP y SE cuando el inóculo fue de 10^6 y 10^4 UFC, siendo semejante con los otros métodos probados, sin embargo, para inóculo bajo tiene 25% para los tres parámetros al compararlo con el método de stomacher, y 79, 40 y 95% para AC, SP y SE, respectivamente, al compararlo con la técnica de esponja. Por lo que el método de FPM de 10ml es aceptable para muestras con una contaminación mayor a 3 log UFC.

Filtración por membrana.- 1ml

El método de FPM (1 ml) mostró un 98.36% de AC, SP y SE con inóculos de 10^6 y 10^4 UFC, lo cual fue semejante a los otros métodos utilizados en este trabajo, para el inóculo de 10^2 UFC, el método de FPM tiene 9.09% en los tres parámetros con el método de stomacher y 18, 9 y 83% de AC, SP y SE respectivamente, con la técnica de esponja.

Filtración por membrana.- 0.1ml

Cuando se utilizó este volumen mediante el método de FPM se obtuvo 98.36% de AC, SP y SE, con inóculos de 10^6 y 10^4 UFC. Cuando el inóculo analizado fue 10^2 UFC se encontró solamente el 9.09% de AC, SP y SE con el método de homogeneización por stomacher y del 25, 9.09 y 83.33% de AC, SP y SE con la técnica de esponja.

***E. coli* O157:H7**

Filtración por membrana.- 10, 1 y 0.1ml

En el caso de *E. coli* O157:H7, el método de FPM obtuvo la misma AC, SP y SE para los tres volúmenes filtrados (10, 1 y 0.1 ml), que fue 98.36% en los tres parámetros para inóculos de 10^6 y 10^4 UFC y 98.77% en el caso de inóculo de 10^2 UFC/ml.

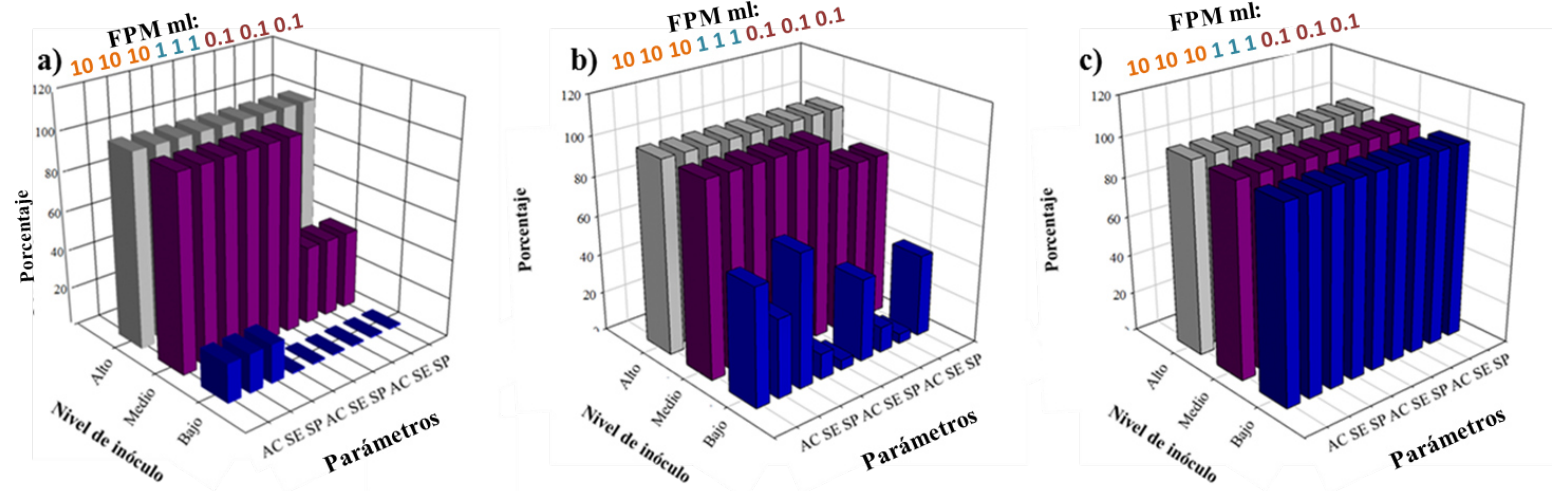


Figura 3.- Porcentajes de Eficacia (AC), Sensibilidad (SE) y Especificidad Relativa (SP) según ISO16140:2003, del método de filtración por membrana (10, 1 y 0.1ml de izquierda a derecha) comparado con método de homogeneización por stomacher y esponja para cada patógeno en melón. *Salmonella* (a), *Listeria* (b) y *E. coli* O157:H7 (c) en melón eje de las y, en el eje de las x se encuentran los métodos, en el eje de las z el nivel de inóculo inicial: alto (10⁶ UFC), medio (10⁴ UFC) y bajo (10² UFC).

8.4 ANÁLISIS DE DETECCIÓN EN CHILE JALAPEÑO

En el caso de chile jalapeño, los análisis de detección de *Salmonella* a un inóculo de 10^6 UFC por el método FPM arrojaron el 100% de detección del microorganismo en los tres volúmenes analizados. Esto también se observó al procesar las muestras por los otros dos métodos. Cuando el inóculo fue de 10^4 UFC se obtuvo el 100% de detección al procesarlo con el método de FPM cuando el volumen de filtrado fue de 10 ml y 1 ml, y donde se obtuvo el 33.3% de detección cuando el volumen filtrado fue de 0.1 ml. En tanto que cuando el inóculo fue de 10^2 UFC, sólo fue posible detectar en todos los casos a la bacteria por el método FPM cuando el volumen filtrado fue de 10 ml. Esto mismo se obtuvo con los otros métodos analizados.

Tabla 7.- Análisis de Presencia/Ausencia de Patógenos en chile jalapeño.

Método/Nivel inóculo	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli</i> O157:H7		
	Número de muestras positivas / Número de muestras totales								
	10^6	10^4	10^2	10^6	10^4	10^2	10^6	10^4	10^2
Filtración 10ml	8/8	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Filtración 1ml	8/8	6/6	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Filtración 0.1ml	8/8	2/6	0/6	6/6	6/6	2/6	6/6	6/6	6/6
Stomacher	8/8	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Esponja	8/8	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

Resultados expresados en número de resultados positivos entre número de repeticiones totales por patógeno (Salmonella, Listeria y E. coli O157:H7) en tres niveles de inóculo para cada método en chile jalapeño. Nivel de Inóculo inicial: alto 6 log UFC, medio 4 log UFC y bajo 2 log UFC totales por corte o unidad dependiendo del caso.

Para *Listeria* tanto a niveles de inóculo de 10^6 y 10^4 UFC, se detectó al microorganismo en todos los volúmenes analizados por el método FPM así como con los métodos de homogeneización con stomacher y esponja. Sin embargo, cuando el inóculo fue de 10^2 UFC, solo se detectó a *Listeria* en todas las muestras cuando se utilizaron volúmenes de 10 y 1 ml por el método de FPM, con el método de homogeneización con stomacher y esponja, y solo en el 33.3% de los casos cuando el volumen filtrado fue de 0.1 ml.

En el caso de *E. coli* O157:H7, el método de FPM fue capaz de detectar al microorganismo en el 100% de las muestras en todos los niveles de inóculo. Esto mismo se encontró con los métodos de homogenización con stomacher y esponja.

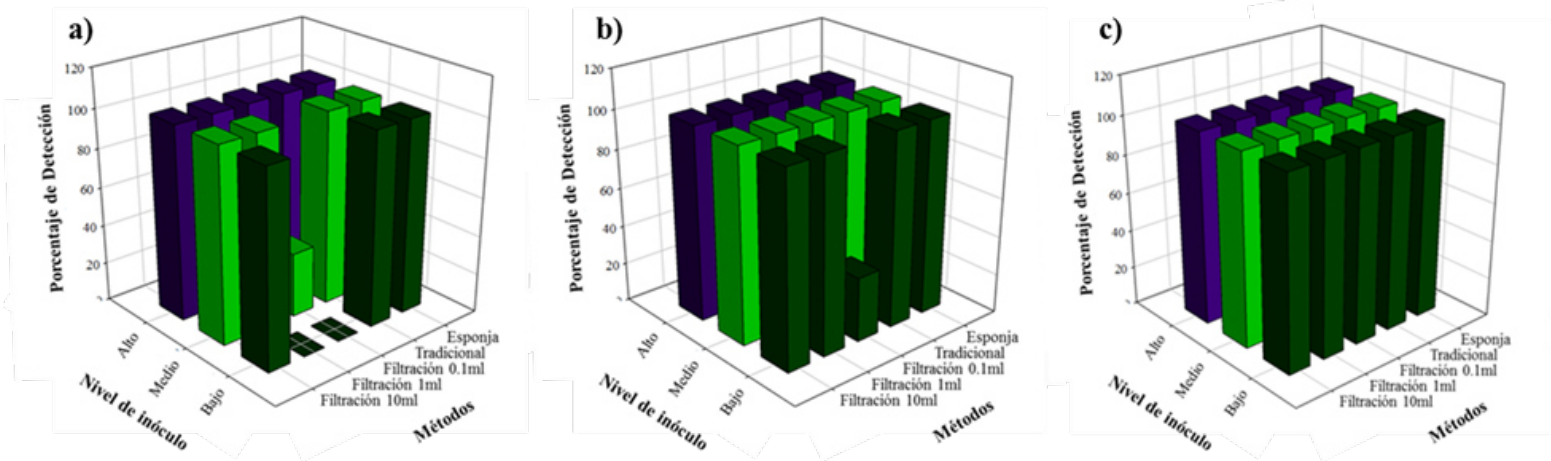


Figura 4.- Porcentaje de resultados positivos en el análisis de Presencia/Ausencia en Chile jalapeño. *Salmonella* (a), *Listeria* (b) y *E. coli* O157:H7 (c) en Chile jalapeño. En el eje de las y, en el eje de las x se encuentran los métodos, en el eje de las z el nivel de inóculo inicial: alto (10^6 UFC), medio (10^4 UFC) y bajo (10^2 UFC).

8.5 ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN POR LA TÉCNICA NÚMERO MÁS PROBABLE EN CHILE JALAPEÑO

En el análisis de cuantificación al someterlo a la prueba ANOVA se determinó que para el caso de *Salmonella*, no existía diferencia significativa entre el método de FPM (1 y 0.1ml) y los métodos de homogeneización por stomacher y esponja con un inóculo de 10^6 UFC. Esto mismo se obtuvo con un inóculo de 10^4 UFC cuando el volumen filtrado fue de 1 y 10 ml, y con inóculo de 10^2 UFC con el método de FPM (10, 1 y 0.1 ml) con los métodos stomacher y esponja.

Sin embargo el análisis de comparación de medias DMS Fisher, determinó que para el inóculo de 10^6 UFC, hubo diferencia significativa entre el método de FPM de 10 ml con la técnica de esponja, pero estas a su vez no mostraron diferencia significativa con el método de homogeneización por stomacher. Para el nivel de inóculo inicial de 10^4 UFC el método de FPM con 0.1ml mostró diferencia significativa con los otros dos métodos analizados siendo método de FPM con 0.1 ml el que tiene una menor recuperación. Para el inóculo de 10^2 UFC, no existió diferencia significativa entre el método de FPM (10, 1 y 0.1 ml) con los métodos de homogeneización por stomacher y esponja.

Tabla 8.-Resultados de análisis de cuantificación en chile jalapeño, expresado en logaritmo de NMP/g.

Método/ Nivel inóculo	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli</i> O157:H7		
	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁶	10 ⁴	10 ²
Filtración 10ml	2.318	2.140	1.158	2.318	2.318	1.380	2.318	1.957	1.933
Filtración 10ml	2.318	1.778	0.954	2.318	2.318	1.255	2.318	1.041	1.933
Filtración 10ml	2.318	2.143	1.158	2.318	2.318	1.778	2.318	2.158	1.933
Filtración 10ml	2.318								
Filtración 1ml	2.641	1.881	0.863	2.818	2.818	1.447	2.818	1.660	1.660
Filtración 1ml	2.641	1.857	1.456	2.641	2.433	0.556	2.818	2.433	2.433
Filtración 1ml	2.433	1.857	0.863	2.818	2.641	0.978	2.818	1.881	1.881
Filtración 1ml	2.818								
Filtración 0.1ml	2.562	1.477	0.462	3.318	2.380	0.462	2.933	2.933	1.957
Filtración 0.1ml	2.562	1.477	0.462	3.142	2.778	1.041	2.933	2.933	1.041
Filtración 0.1ml	2.380	1.055	0.462	3.318	2.477	0.462	2.933	2.933	2.158
Filtración 0.1ml	3.142								
Tradicional	2.433	1.881	1.170	2.818	2.818	0.978	2.818	2.433	0.863
Tradicional	2.641	1.881	0.462	2.818	2.818	1.663	2.818	2.818	1.297
Tradicional	2.279	2.279	1.170	2.818	2.641	1.176	2.818	2.641	0.978
Tradicional	2.818								
Esponja	2.818	2.433	0.978	2.818	2.818	1.322	2.818	2.641	0.978
Esponja	2.818	1.763	0.556	2.818	2.818	0.845	2.818	2.278	0.531
Esponja	2.641	1.763	0.556	2.818	2.433	1.881	2.818	2.433	0.978
Esponja	2.818								

Tabla 9.- Análisis de Varianza ANOVA de un factor, DMS Fisher, en la tabla se presentan las medias de NMP/g obtenida después de FPM, método tradicional (stomacher) y esponja.

Inóculo	Volumen	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>			<i>E. coli</i> O157:H7		
		Filtración	Tradicional	Esponja	Filtración	Tradicional	Esponja	Filtración	Tradicional	Esponja
Alto	10	2.318a	2.543ab	2.77b	2.318a	2.818b	2.818b	2.318a	2.818b	2.818b
	1	2.633a	2.543a	2.774a	2.759a	2.818a	2.818a	2.818a	2.818a	2.818a
	0.1	2.662a	2.543a	2.774a	3.259b	2.818a	2.818a	2.933b	2.818a	2.818a
Medio	10	2.020a	2.013a	1.986a	2.318a	2.751b	2.69b	1.719a	2.63b	2.451ab
	1	1.865a	2.013a	1.986	2.631a	2.751a	2.69a	1.991a	2.63a	2.451a
	0.1	1.336a	2.013b	1.986b	2.545a	2.751a	2.69a	2.933b	2.63ab	2.451a
Bajo	10	1.09a	0.934a	0.697a	1.471a	1.272a	1.349a	1.933b	1.046a	0.829a
	1	1.061a	0.934a	0.697a	0.994a	1.272a	1.349a	1.991b	1.046a	0.829a
	0.1	0.462a	0.934a	0.697a	0.655a	1.272a	1.349a	1.719a	1.046a	0.829a

Diferentes letras muestran diferencias significativas $p < 0.05$ entre los diferentes métodos por nivel de inóculo.

En el caso de *Listeria*, cuando el inóculo fue de 10^6 y 10^4 UFC, no se encontró diferencia ($P < 0.05$) entre el método FPM (al utilizar un volumen de 1ml, para inóculo alto y 1 y 0.1 para inóculo medio) con los métodos de homogeneización por stomacher y esponja, en tanto que cuando utilizamos un inóculo de 10^2 UFC y se procesó la muestra por el método de FPM (10, 1 y 0.1 ml) no se obtuvo diferencia significativa con los métodos de homogeneización por stomacher y esponja. El análisis DMS Fisher, demostró que el método de FPM es el que menos recupera cuando se filtran volúmenes de 10 ml y el inóculo es de 10^6 UFC, en tanto que cuando el volumen filtrado es de 0.1 ml es el que obtiene una mayor recuperación al compararlo con los otros métodos analizados. Esta diferencia se observa principalmente al haber contaminación de 10^6 UFC, con el método de NMP, debido a que esta técnica no es recomendada para cuantificar altas concentraciones de bacterias debido a que puede haber una subestimación de los valores reales, por lo tanto es más efectivo filtrando menores cantidades las cuales tendrán menores concentraciones de bacteria.

Cuando se analizó a *E. coli* O157:H7, se encontró una menor recuperación cuando se inocularon 10^6 UFC y se procesó la muestra por el método de FPM (10ml) sin embargo, cuando el volumen filtrado fue de 0.1 ml obtuvimos mayor recuperación ($P < 0.05$) en comparación con los métodos de homogeneización por stomacher y esponja, en tanto que cuando el volumen filtrado fue de 1 ml no se observó diferencia entre los tres métodos. Cuando el inóculo fue de 10^4 UFC el método de FPM varió de acuerdo al volumen filtrado (con 10 ml tuvo menor recuperación, 1ml no mostró diferencia, 0.1 ml mostró mayor recuperación) al compararlos con los otros dos métodos analizados, en

tanto que cuando el inóculo fue 10^2 UFC todos los volúmenes utilizados en los ensayos de FPM (10, 1 y 0.1 ml) fueron semejantes a los otros dos métodos probados. Una probable explicación de que el método de FPM de 0.1 ml obtenga una mayor recuperación, se debe a que no es equivalente a 0.1ml obtenidos de la bolsa de caldo de stomacher y esponja después de haber sido enriquecidos, y a que como se menciona anteriormente la técnica de NMP es más eficiente para muestras con menor contaminación, permitiendo una cuantificación más acertada y evitando la subestimación celular la cual fue dada en el caso de FPM de 10 y 1 ml.

8.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN CHILE JALAPEÑO

La validación del método de FPM se realizó de la misma forma anteriormente descrita, obteniendo lo siguiente y se encuentran en la Tabla 10.

Salmonella

Filtración por membrana.- 10ml En el caso de FPM de 10 ml, el método obtuvo 98.77, 98.36 y 98.36 % de AC, SP y SE respectivamente para inóculos de 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC, comparado con el método de homogeneización por stomacher y esponja.

Filtración por membrana.- 1ml

Con 1ml, el método de FPM mostró 98.77, 98.36 y 1.64 % de AC, SP y SE respectivamente para inóculos de 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC.

Filtración por membrana.- 0.1ml

El método de FPM de 0.1ml tiene al igual que los volúmenes anteriores 98.77% de AC, SP y SE, para un inóculo de 10^6 UFC, 33.33% para inóculo de 10^4 UFC y 1.64% para inóculo de 10^2 UFC.

Listeria

Filtración por membrana.- 10ml

Para el caso de *Listeria*, el método de FPM mostró un 98.56%, 98.36% y 97.30% de AC, SP y SE respectivamente, cuando el inóculo fue 10^6 UFC; en tanto que para los inóculos menores los valores fueron 98.36% de AC, SP y SE respectivamente.

Filtración por membrana.- 1 y 0.1ml

Con volúmenes de 1 y 0.1ml, el método de FPM mostró el 97.30% de AC, SP y SE cuando el inóculo fue de 10^6 UFC, en tanto que para un inóculo menor se encontró el 98.36% en los tres parámetros.

E. coli* O157:H7*Filtración por membrana (10, 1 y 0.1ml)**

En el caso de *E. coli* O157:H7 al procesarse por el método de FPM, la AC, SP y SE fue la misma sin importar el volumen filtrado y el nivel de inóculo inicial, mostrando 98.36% para los tres parámetros medidos en todos los niveles de inóculo inicial.

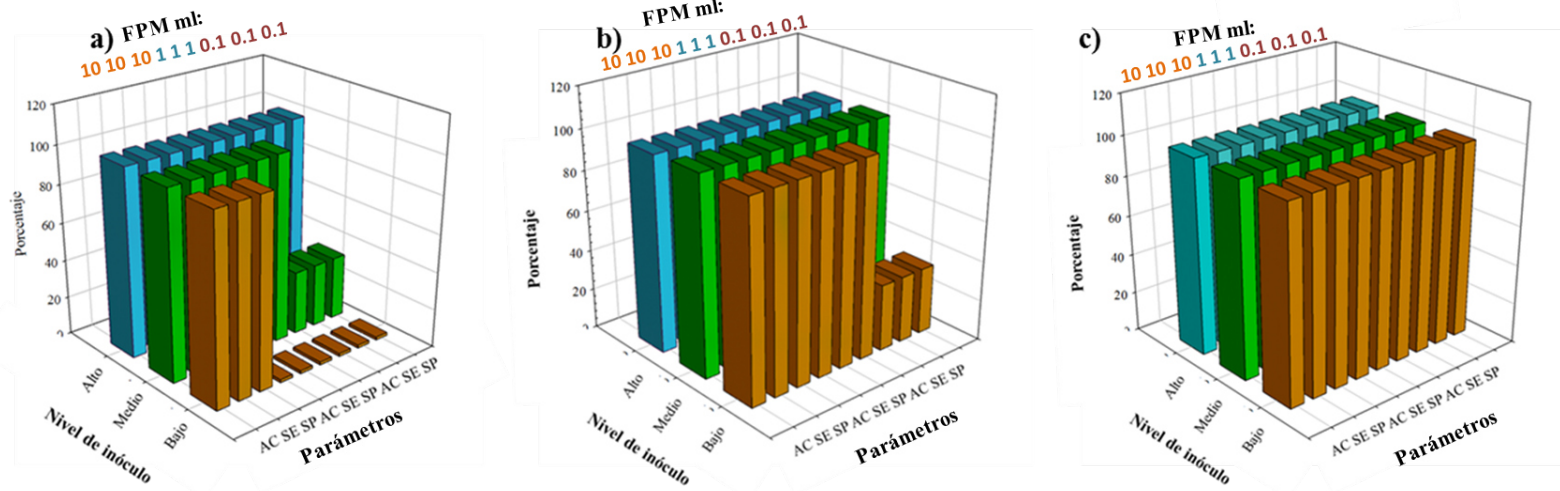


Figura 5.- Porcentajes de Eficacia (AC), Sensibilidad (SE) y Especificidad Relativa (SP) según ISO16140:2003, del método de filtración por membrana (10, 1 y 0.1ml de izquierda a derecha) comparado con método de stomacher y esponja para cada patógeno en chile jalapeño. *Salmonella* (a), *Listeria* (b) y *E. coli* O157:H7 (c) en chile jalapeño eje de las y, en el eje de las x se encuentran los métodos, en el eje de las z el nivel de inóculo inicial: alto (10⁶ UFC), medio (10⁴ UFC) y bajo (10² UFC).

Tabla 10.- Resultados globales de Eficacia, Sensibilidad y Especificidad Relativa del método de FPM comparado con el método de homogeneización por Stomacher y la técnica de esponja en melón (rosa) y chile jalapeño (verde).

II	MA	ml.	MR	Salmonella			Listeria			E. coli O157:H7		
				AC	SE	SP	AC	SE	SP	AC	SE	SP
10 ⁶	FPM	10	Stomacher	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁶	FPM	10	Esponja	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁶	FPM	1	Stomacher	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁶	FPM	1	Esponja	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁶	FPM	0.1	Stomacher	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁶	FPM	0.1	Esponja	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	10	Stomacher	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	10	Esponja	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	1	Stomacher	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	1	Esponja	99	99	99	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	0.1	Stomacher	40	40	40	98	98	98	98	98	98
10 ⁴	FPM	0.1	Esponja	40	40	40	98	98	98	98	98	98
10 ²	FPM	10	Stomacher	99	99	99	25	25	25	99	99	99
10 ²	FPM	10	Esponja	99	99	99	79	40	95	99	99	99
10 ²	FPM	1	Stomacher	1	1	1	9	9	9	99	99	99
10 ²	FPM	1	Esponja	1	1	1	18	9	83	99	99	99
10 ²	FPM	0.1	Stomacher	1	1	1	9	9	9	99	99	99
10 ²	FPM	0.1	Esponja	1	1	1	25	9	83	99	99	99
10 ⁶	FPM	10	Stomacher	98.77	98.77	98.77	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁶	FPM	10	Esponja	98.77	98.77	98.77	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁶	FPM	1	Stomacher	98.77	98.77	98.77	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁶	FPM	1	Esponja	98.77	98.77	98.77	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁶	FPM	0.1	Stomacher	98.77	98.77	98.77	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁶	FPM	0.1	Esponja	98.77	98.77	98.77	97.3	97.3	97.3	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	10	Stomacher	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	10	Esponja	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	1	Stomacher	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	1	Esponja	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	0.1	Stomacher	33.33	33.33	33.33	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ⁴	FPM	0.1	Esponja	33.33	33.33	33.33	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	10	Stomacher	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	10	Esponja	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	1	Stomacher	1.64	1.64	1.64	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	1	Esponja	1.64	1.64	1.64	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	0.1	Stomacher	1.64	1.64	1.64	33.33	33.33	33.33	98.36	98.36	98.36
10 ²	FPM	0.1	Esponja	1.64	1.64	1.64	33.33	33.33	33.33	98.36	98.36	98.36

Valores en forma de porcentaje, representando el grado de similitud de eficacia, sensibilidad y/o especificidad relativa del método alternativo en comparación con el método de referencia (Stomacher y/o esponja)

II: Nivel de inóculo inicial, MA: Método Alternativo, MR: Método de Referencia, AC: Eficacia Relativa, SE: Sensibilidad Relativa y SP: Especificidad Relativa.

9.- DISCUSIÓN

Los brotes atribuidos al consumo de productos vegetales tienen como principal agente causal a *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en donde se ha establecido que la contaminación del producto puede ocurrir a lo largo de la ruta del campo a la mesa, es por ello la necesidad de desarrollar nuevas metodologías de detección basadas en identificar rápidamente este patógeno en campo y en cualquier punto de la cadena de producción (M. K. Park *et al.* 2013).

Los productos vegetales tienen una gran diversidad de características físicas, incluyendo diferentes tipos de corteza, siendo algunos rugosos, otros con protuberancias, otros lisos, etc. En parte, debido a esto se presentan diferencias en la capacidad de los microorganismos de adherirse a la superficie de estos productos, y por lo tanto viéndose afectada la efectividad de las técnicas que existen actualmente para desprender y así poder detectar estas células.

Ya que el tipo de superficie que presentan el chile jalapeño y el melón es muy diferente, estos productos fueron elegidos para la validación del método de filtración por membrana, así como los brotes recientes de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria* en este tipo de productos; a diferencia del chile jalapeño, la superficie del melón no se consume, sin embargo es un producto con una superficie rugosa, con hendiduras en forma de red, la cual tiene sitios ideales para la adherencia de microorganismos, teniendo una mayor superficie de contacto y protegiendo a los patógenos al no permitir el contacto directo con algunos utensilios de lavado; al ser cortado el producto, el utensilio de corte puede ser capaz de transferirlos del exterior a la pulpa, así como también las malas prácticas de higiene por parte de los manipuladores son también una fuente de contaminación.

Park *et al.* (2013) encontraron que la morfología de la superficie del melón es diferente a la de otros vegetales, ya que su compleja forma de red le confiere una gran capacidad de adherencia a las bacterias; por lo que si el melón se encuentra almacenado a altas temperaturas (mayores a 37°C) algunos patógenos tales como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 que se pudieron encontrar presentes en concentraciones indetectables, pueden crecer y alcanzar niveles de riesgo para la salud humana (7 log UFC) incluso sin causar signos visuales de contaminación (M.D. Danyluk *et al.* 2010).

Dado que se considera que prácticamente todas las cepas de *Salmonella* son patógenas, los estándares internacionales para análisis de este microorganismo, incluyen solo la determinación de presencia o ausencia de esta bacteria en 20 o 25g de muestra, siendo esto suficiente en pruebas de rutina en la industria alimentaria para considerar aceptable o no el producto, sin embargo para fines de investigación es crucial no solo detectarla sino también cuantificar eficazmente sus niveles (Kisluk G. *et al.* 2012). Además encontrar técnicas más sensibles que las que existen actualmente será de gran utilidad.

Por otro lado, *L. monocytogenes* no es frecuentemente diagnosticada como causa de gastroenteritis y fiebre, en parte esto es debido a que este microorganismo no se busca por análisis de rutina, por lo tanto no siempre se diagnostica como la causa de abortos espontáneos (Scallan *et al.* 2011). Además se ha determinado que este microorganismo así como otros patógenos en matrices como productos vegetales no se encuentra distribuido de manera homogénea, dificultando su detección y dando falsos negativos mediante algunos métodos de procesamiento (Vitas AI. *et al.*, 2013).

Debido a lo anterior es que surgió la necesidad de desarrollar metodologías alternativas, que sean capaces de analizar grandes volúmenes de muestra, lo más económica y rápida posible, que permita la detección de niveles bajos de bacterias en frutas y vegetales (Kisluk G. *et al* 2012).

Al analizar los resultados de detección de *Salmonella* en melón, encontramos que con el método de FPM si se filtran volúmenes de 1 ml o mayores, es capaz de detectar siempre (100%) al patógeno si se encuentra en niveles de 10^4 UFC, o mayores; esto mismo se observó con *Listeria*, donde a pesar que podemos recuperar en el 40% de ocasiones inóculos de 10^2 UFC, si se procesan por el método de homogeneización por stomacher, la tasa de positivos solo es de 60%, mientras que por esponja es de tan solo el 20%; Cuando el patógeno a analizar fue *E. coli* O157:H7 fue detectada el 100% de las ocasiones a un nivel de inóculo inicial de 10^2 UFC por el método de FPM, siendo mejor que los métodos analizados.

Un resultado similar en el caso de detección de *Salmonella* y *Listeria* utilizando un método de filtración de agua y espinacas fue realizado por Brassard *et al.* (2011) en dónde compararon la capacidad de detección con un método molecular. En ese trabajo inocularon 2 Log UFC de *Salmonella* y lograron detectar al microorganismo en agua en 66.6% de ocasiones y 0% con el método molecular; mientras que en espinaca se detectó en el 33.3% de los casos con el método de filtración y 0% con el método molecular. En

el caso de *L. monocytogenes*, con el mismo inóculo detectaron con el método de filtración en agua el mismo porcentaje que con *Salmonella*, y en espinaca 66.6% y con el método molecular fue de 33.3%.

Un resultado similar obtuvo Sánchez *et al.* (2012), al evaluar un método de elución seguido de PCR para la recuperación de virus y bacterias en perejil, espinaca y una mezcla de lechuga y zanahoria, en donde concentraban la muestra en bolsas estériles con filtro, y obtuvieron un porcentaje de recuperación de 57.4%, 64.5% y 64.6% para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* respectivamente.

En nuestro estudio obtuvimos una menor recuperación cuando el inóculo fue 2 log UFC para *Salmonella* y *L. monocytogenes* comparado a lo reportado por Brassard *et al.* (2011), sin embargo al filtrar 10ml fueron mejores que lo obtenido con el método molecular. En el caso del estudio realizado por Sánchez *et al.* (año) el porcentaje de recuperación obtenido para *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* fue mejor para niveles de inóculo más bajos, y para el caso de *Salmonella* fue similar, sin embargo esta comparación no es del todo correcta, debido a que como se mencionó anteriormente la capacidad de adhesión de las bacterias dependen de las propiedades de superficie de la matriz, y el melón tiene una superficie muy diferente comparado a los vegetales utilizados en el estudio.

Otro estudio evaluó la detección y cuantificación de niveles bajos de patógenos, entre ellos *S. Typhimurium* en perejil mediante técnicas tradicionales de homogeneización mecánica de muestra; obteniendo menos de 1% de recuperación al haber inoculado de 10^3 - 10^6 UFC/g (Kisluk G. *et al.*, 2012). En nuestro trabajo cuando procesamos la muestra por el método de FPM encontramos que al inocular 10^4 - 10^6 UFC logramos detectar 10 a 72% de las veces con el método de FPM, sin embargo solo se pudo detectar al microorganismos en el 0-20% de los casos con inóculos menores a 10^3 UFC. Cuando comparamos los valores recuperados en NMP, las medias de recuentos fueron mayores a 0.51 log NMP/g. Esto puede ser debido a que la cuantificación realizada en el estudio anterior fue por el método de recuento en placa, y reportes indican que la técnica de NMP es más eficiente para cuantificar niveles bajos de bacterias (100 UFC/g, o menores; BAM, 2010).

Kisluk *et al.* (2012) encontraron al buscar a *Salmonella* en muestras inoculadas con 2.5 log UFC/g de perejil y procesarlas mediante PCR, niveles de recuperación que iban del 20-30% y menos de 1% para los métodos microbiológicos tradicionales (homogeneización mecánica).

Cuando analizamos chile jalapeño obtuvimos resultados muy diferentes comparados con la matriz melón, encontrando 100% de recuperación de *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* O157:H7 al utilizar un volumen de filtración de 10 ml de muestra para *Salmonella* y 1 ml para *Listeria* y *E. coli* O157:H7. Estos mismos resultados se obtuvieron al procesar la muestra por los otros métodos. Fernandes (2014), evaluó la influencia de las características morfológicas de la superficie de dos matrices, mango y tomate, en donde demostró que existían diferencias entre estas, ya que al presentar mayor rugosidad la superficie del mango en comparación con la del tomate, se obtuvo una mayor superficie de contacto, y que a pesar de ser hidrofílica, mostró mayor capacidad de adsorber el patógeno, dificultando de esta manera que las células bacterianas se desprendieran de la muestra y pudieran ser detectadas mediante métodos tradicionales, incluso al encontrarse a niveles bajos.

Fernandes (2014) también demostró que la capacidad que tienen las bacterias para adherirse a superficies se puede incrementar al haber una superficie rugosa, ya que las depresiones y elevaciones aumentan el área de superficie durante la colonización y puede proteger a los microorganismos de cualquier fricción o impacto por utensilios de limpieza; sin embargo la capacidad de acumularse en estas depresiones depende del tamaño y dimensión celular, demostrando que existe una correlación lineal positiva entre la rugosidad absoluta y la tasa de adhesión de *E. coli* O157:H7 en la superficie de cuatro diferentes tipos de frutas.

Al comparar los niveles de detección en chile jalapeño encontrados con los obtenidos por estudios realizados por Brassard y Sánchez (2011), obtuvimos mejores resultados para los microorganismos analizados, al tener un 100% de recuperación con el método de FPM (10 ml).

En el caso de los parámetros de validación determinados según la normativa ISO 16140:2003, se recomienda tener resultados tanto positivos como negativos, por lo que en los casos donde no obtuvimos resultados negativos tomamos el valor de 0.01 donde el porcentaje máximo equivalente a 100 fue 99.01, este porcentaje expresó la similitud de eficacia, sensibilidad y especificidad relativa que mostró el método de FPM al compararlo con los otros métodos analizados en este estudio.

Cuando se realizó la cuantificación de los patógenos por medio de la técnica de NMP, en el caso del sistema de FMP al cuantificar *Salmonella* tanto en melón como chile

jalapeño, la muestra no fue sometida a un enriquecimiento secundario (Rappaport Vassidialis) a diferencia de los otros dos métodos utilizados, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los métodos analizados, por lo que al utilizar el sistema de FMP se pudo tener el resultado 24 horas antes que la homogeneización por stomacher , y el método de esponja. Cuando comparamos nuestros resultados con el estudio de Kisluk *et al.* (2012) no logran detectar a Salmonella en perejil al inocular 2 log UFC, lo cual también concordó con nuestros resultados, esto debido a que en otros estudios se sometieron las muestras a homogeneización mecánica, en ocasiones destructiva tales como licuefacción, o homogeneización peristáltica, ocasionando daño celular, y muerte, lo que con el método de FPM no sucede, debido a que las muestras no se destruyen y no son sometidas a estrés mecánico.

10.- CONCLUSIONES

1. El método de filtración por membrana permite la detección efectiva de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *E. coli* O157:H7 en melón y chile jalapeño en diferentes niveles de contaminación.
2. Para el caso del melón, el método de FPM (10 ml) permitió detectar en el 100% de los casos a *Salmonella* y *Listeria* con un nivel de inóculo inicial mínimo de 10^4 UFC al igual que los otros métodos, el 100% *E. coli* O157:H7 a diferencia de los otros métodos con un 75% con un mínimo de 10^2 UFC.
3. En el caso de chile jalapeño el método de FPM (10 ml) permitió la detección del 100% de los casos de *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* O157:H7 con una contaminación inicial mínima de 10^2 UFC, al igual que con los métodos de Stomacher y esponja.
4. La eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del método de FPM (≥ 1 ml) es mayor de 98% comparado con el método de Stomacher y esponja para la detección de *Salmonella* y *Listeria* en niveles de contaminación $\geq 10^4$ UFC en melón.
5. La eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del método de FPM (≥ 0.1 ml) es mayor de 98% comparado con los demás métodos para la detección de *E. coli* O157:H7 en niveles de contaminación $\geq 10^2$ UFC en melón.
6. La eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del método de FPM (10 ml) es mayor de 98% comparado con los demás métodos para la detección de *Salmonella* en niveles de contaminación $\geq 10^2$ UFC en chile jalapeño.
7. La eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del método de FPM (1ml) mayor de 98% comparado con los demás métodos para la detección de *Listeria* en niveles de contaminación $\geq 10^2$ UFC en chile jalapeño.
8. La eficacia, sensibilidad y especificidad relativa del método de FPM (1ml) mayor de 98% comparado con los demás métodos para la detección de *E. coli* O157:H7 en niveles de contaminación $\geq 10^2$ UFC en chile jalapeño.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alfaro G., Sandra C.; Maria Rojas-Sanchez X. 2006. Validación de los métodos de filtración por membrana y sustrato definido Readyult, para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas crudas, tratadas y potables en el acueducto de Zipaquira Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Microbiología Industrial. Bogota, D.C
2. Álvarez D.M., Gamazo D.M., Echarrri N., 1999. Nuevo método de captura de Salmonella: la filtración inmunomagnética. Laboratorio Municipal de Pamplona. Sección de Microbiología. Universidad de Navarra. Departamento de Microbiología.
3. Annous, B., Burke, A., Sites, J.E. 2004. Surface Pasteurization of Whole Fresh Cantaloupes Inoculated with *Salmonella* Poona or *Escherichia coli*. Journal of Food Protection. 67: 9, 1876–1885.
4. Bansal A., Jones TM., Shirin J., Danyluk MD., Harris LJ. 2010 Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Most-Probable-Number Determination of Salmonella Levels in Naturally Contaminated Raw Almonds Using Two Sample Preparation Methods. Department of Food Science and Technology, University of California.
5. Bisha B., Brehm-Stecher, B.F. 2008. Simple Adhesive-Tape-Based Sampling of Tomato Surfaces Combined with Rapid Fluorescence In Situ Hybridization for *Salmonella* Detection. Applied and Environmental Microbiology, 75:6, 1450–1455
6. Borowsky LM. Schmidt V., Cardoso M. 2007. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. Brazilian Journal of Microbiology. 38:544-546
7. Brady H.B. 2002. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: manual de formación para instructores. ITESM-Campus Monterrey, México
8. Castro-Rosas J., Gómez-Aldapa C, Acevedo-Sandoval O. A., González-Ramírez C. A., Villagómez-Ibarra J. R., Chavarría-Hernández N., Villarruel-López A., Torres-Vitela M. R. 2011. Frequency and behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on whole and sliced jalapeño and serrano Peppers. Journal of Food Protection. 74,6:874-881.
9. CDC. 2011. Deadly *Listeria* Outbreak Halted in Record Time. Disponible en: <http://www.cdc.gov/24-7/SavingLives/listeria/>

10. CDC. 2011. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms. Disponible en: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6039a5.htm?s_cid=mm6039a5_w
11. CDC. 2011. Multistate Outbreak of *Salmonella* Panama Infections Linked to Cantaloupe. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/panama0311/062311/index.html>
12. CDC. 2012. Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport Infections Linked to Cantaloupe. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/>
13. CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2008. September 9, 2011 / 60:1197-1202 Disponible en: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035a3_w
14. Croxen, M.A., Finlay B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews, Microbiology. Vol. 8.
15. Díaz-Sobac, R., Vernon-Carter, J. 1999 Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas Mínimamente Procesadas. Cienc. Tecnol. Aliment. 2:133-136
16. Edberg SC., Allen MJ., Smith DB. 1988. National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method. Applied and Environmental Microbiology. 54,6: 1595-1601.
17. Elles N., Elincer, Salcedo O., Mayra, Muñoz P., Mauricio, Mendoza A., Raúl. 2010. Validación De La Técnica De Recuento De Coliformes Totales y E. Coli Por El Método Filtración De Membrana En El Laboratorio De Control De Calidad De Aguas De Cartagena S.A E.S.P. Ciencia y Salud. 2:21-30
18. Espinoza A., José j., Lozada Cota, M., Leyva N., S. 2011. Posibilidades y restricciones para la exportación de melón Cantaloupe producido en el municipio de Mapimí, Dgo., México al mercado de EEUU. Food Protection Trends, International Association for Food Protection. 30: 336–339
19. Francis G.A.; Thomas C.; O’Beirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Review article. Int. J. Food Sci. Technol. 34: 1-22
20. Gamboa. 2009 Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates

- (*Lycopersicon esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. Universidad de Carabobo, Valencia y Facultad de Ingeniería de Alimentos, Canoabo, Universidad Simón Rodríguez. Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 59, 3.
21. George j. Jackson, Robert i. Merker, Ruth Bandler. 2001 Bacteriological Analytical Manual. Disponible en línea: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>
 22. Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, en el Caso de Frutas y Vegetales Frescos Direcciones para la Industria. 1998 U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Department of Health and Human Services (DHHS).
 23. Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D. 2008. Microbiología. 2a. Edición Lippincott Williams & Wilkins. Barcelona.
 24. Hernandez-Brenes. 2002. Safety Hazards in Fresh Produce – Biological, Chemical and Physical Improving the Safety and Quality of Fresh Fruits and Vegetables: A Training Manual for Trainers.
 25. James S. Dickson. 1990. Comparison of Homogenization by Blending or Stomaching on the Recovery of *Listeria monocytogenes* from Beef tissues. Journal Food Sci. 55,3: 655-657
 26. James w. Messer , Alfred P. Dufour. 1998 A Rapid, Specific Membrane Filtration Procedure for Enumeration of Enterococci in Recreational Water. Applied and Environmental Microbiology. 64,2: 678–680
 27. Jenkins M.B., Endal D.M., Fisher D.S. 2008. Most probable number methodology for quantifying dilute concentrations and fluxes of Salmonella in surface waters. Journal of Applied Microbiology. 104:1562–1568
 28. Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, R., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K , Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Malakar, P. K. 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. International Food Research Journal 17: 281-286
 29. Johnston L.M., Jaykus L.A., Moll D. 2005 A field study of the microbiological quality of fresh Produce Of Domestic and Mexican Origin. International Journal of Food Microbiology 112: 83–95
 30. K. H. Seo, R. E. Brackett, I. E. Valentin-Bon, P. S. Holt. 2003. Comparison of Homogenization Methods for Recovering *Salmonella enteritidis* from Eggs. Journal of Food Protection. 66,9:1666–1669

31. Lin-Hui Su, MS; Cheng-Hsun Chiu¹, MD, PhD. 2007 Salmonella: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*. 30, 3.
32. Madigan MT., Martinko JM., Parker J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10^a edición. Pearson Educación. Madrid.
33. Nguyen Y., Sperandio V. 2012. Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2, 90.
34. Paez Sanabria L.J. 2008. Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.
35. Pascual-Anderson MR., Calderon V., Pascual. 2000 Metodología Analítica Para alimentos y bebidas. Microbiología Alimentaria. 2a Edición. Días De Santos, S.A. Madrid, España.
36. Quílez MT. 2002 Incidencia y Comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Barcelona, España.
37. Ramírez-Mérida L.G., Morón de Salim A., Graterol AY., Gamboa O. 2009. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. Universidad de Carabobo, Valencia y Facultad de Ingeniería de Alimentos, Canoabo, Universidad Simón Rodríguez. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59, 3.
38. Rivas M., Leotta G., Chinen I. 2008. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Manual de Procedimientos. Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=TwcRc9zNKIk%3D&tabid=783&mid=1713&language=en-US>
39. Rodríguez C, Sánchez M, Ortega M, Zhurbenko R, Tsoraeva A, Díaz M. 2007. Validation of a membrane chemogenic and fluorogenic filtration method vsMPN method for *E. coli* in water samples. *Bioproducciones: desde el desarrollo tecnológico hasta la producción industrial*. Revista Biotecnología Habana.
40. Rodríguez S., Del C, Questa A.G., Guzmán C.G., Casóliba R.M., y Coronel M.B. 2006. Calidad microbiológica de vegetales mínimamente procesados. Experiencias en el noroeste argentino. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil.

41. Scallan E., Griffin PM., Angulo FJ., Tauxe RV., Hoekstra RM. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerging Infectious Diseases*. 17, 1. Disponible en: www.cdc.gov/eid
42. Seager TR., Tamplin ML., Lorimer M., Jenson I., Sumner J. 2010. How effective is sponge sampling for removing bacteria from beef carcasses? *Food Protection Trends*. 30, 6: 336–339
43. SENASICA, 2010. Información técnica de melón mexicano para exportación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Disponible en: www.senasica.gob.mx
44. SENASICA. 2005. Lineamientos de buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manejo en Los procesos de producción de frutas y hortalizas para consumo humano en Fresco. Disponible en: http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/melon/certificacion.pdf
45. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2010. Un panorama del cultivo del chile. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
46. Siller-Cepeda JH., Báez-Sañudo MA., Sañudo-Barajas A., Báez-Sañudo R. 2002 *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y SAGARPA.
47. Zepp G., Kucher F., Lucier G. 1998. Food safety and fresh fruits and vegetables: Is there a difference between imported and domestically produced products? *Vegetables and Specialties*, Economic Research Service. 274:23.

12.- RESUMEN BIOGRÁFICO

Laura Esther Tijerina Rodríguez
Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: "VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS BACTERIANOS EN MELÓN, *Cucumis melo* (L., 1753) Y CHILE JALAPEÑO, *Capsicum annuum* (L., 1753)".

Campo de estudio: Microbiología de Alimentos

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 17 de Enero de 1989, hija de Esther Rodríguez Lorenzo y J. Melchor Tijerina Menchaca.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo obtenido en el 2010.

Experiencia Profesional: Análisis de Aseguramiento de Calidad en empresas del giro alimenticio 2010-2012.