

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Identificación de Escherichia coli O157:H7 en  
verduras y frutas congeladas para exportación

**Informe Final de Tesis**

Presentada por

Nelly Beatriz Castañeda Rosales

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, febrero del 2000.

DL  
06  
T(2039)

## JUNTA DIRECTIVA

### FACULTAD DE CC.QQ. Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

## Acto que dedico

A mis Padres, Dr. Manuel Vicente Castañeda Aguirre y Nelly Rosales de Castañeda, en quienes deposito mi triunfo profesional como una mínima recompensa a sus constantes esfuerzos, su confianza y amor.

A mi hermano, José Manuel Castañeda Rosales, testigo de mis desvelos y apoyo en los tiempos difíciles.

A mis padrinos de graduación, Dr. Manuel Vicente Castañeda Aguirre y Dr. Armando Cordón y Cordón quienes me enseñaron que la humildad es la cualidad que identifica a los profesionales sabios que saben llegar alto. Esto es algo que ni en los libros ni en las aulas de la Facultad se aprende.

Y, a cada uno de los presentes en este acto, quienes de una u otra forma influyeron para que mi graduación como Química Bióloga fuese un hecho.

## INDICE

	Página
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCION .....	5
3. ANTECEDENTES	
<u>Escherichia coli O157:H7</u>	
3.1 Generalidades .....	6
3.2 Epidemiología .....	7
3.3 Patogénesis .....	11
3.4 Vías de transmisión .....	13
3.5 Métodos de detección .....	14
Frutas y vegetales congelados	
3.6 Proceso del congelado .....	15
3.7 Efectos del congelado sobre las enterobacterias .....	18
4. JUSTIFICACION .....	21
5. OBJETIVOS	
5.1 Generales .....	22
5.2 Específicos .....	22
6. HIPOTESIS .....	23
7. MATERIALES Y METODOS	
7.1 Materiales .....	24
7.2 Método .....	26
7.3 Diseño estadístico .....	28
8. RESULTADOS .....	30
9. DISCUSION DE RESULTADOS .....	31
10. CONCLUSIONES .....	34
11. RECOMENDACIONES .....	35
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	37
13. ANEXOS .....	41

## 1. RESUMEN

La E. coli O157:H7 es un serotipo perteneciente al género *Escherichiae*. Este se clasifica entre el grupo de las E. coli enterohemorrágicas, por lo que es capaz de causar enfermedad en el humano debido a la producción y síntesis de grandes cantidades de toxinas, principalmente de Verotoxina. Las vías de transmisión más comunes para esta bacteria son el agua, los productos cárnicos y lácteos, así como las frutas y verduras crudas mal lavadas o bien, lavadas con agua contaminada. Aunque se han desarrollado métodos para la eliminación de las bacterias de los alimentos, entre ellos la congelación, se ha descubierto que ocasionalmente la E. coli O157:H7 puede sobrevivir a este proceso.

La enfermedad aguda causada por esta bacteria se denomina colitis hemorrágica y se caracteriza por dolor abdominal, vómitos ocasionales y diarrea, la cual inicialmente es acuosa para tornarse luego sanguinolenta, con leve fiebre o sin ella. Existen individuos que sólo presentan diarrea acuosa o son asintomáticos. Algunos de los afectados, fundamentalmente los niños menores de 5 años y los ancianos, desarrollan el síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por fallo renal y anemia. En los ancianos, la afección de síndrome urémico hemolítico puede favorecer la aparición de púrpura trombocitopénica trombótica.

Entre las características de la E. coli O157:H7 se encuentra su capacidad de sobrevivir y crecer en vegetales para ensalada almacenados a 12°C y a 21°C por más de 14 días siendo mayor su tiempo de supervivencia a temperaturas de refrigeración ( entre 0°C y 4°C ) que a temperatura ambiente. Esta razón motivó a proponer la hipótesis de que al menos una muestra de las frutas y verduras congeladas para exportación que se procesaran dentro de una planta congeladora nacional durante el bimestre marzo-abril, estaría contaminada con Escherichia coli O157:H7.

Entre los meses citados se analizaron 223 muestras, de las cuales 57 fueron de brócoli (25.56%), 22 de mora (9.87%), 21 de fresa (9.42%), 22 de frambuesa (9.87%), 28 de piña (12.55%) y 73 de melón (32.73%). El resultado final es que del total de muestras, el 78.02% fueron bioquímicamente confirmadas como E. coli positivo, correspondiendo 0% a la identificación de E. coli O157:H7 a través del método de fermentación del sorbitol

propuesto en el Manual de Procedimientos Analíticos de la FDA (BAM por sus siglas en inglés); tampoco se encontró ninguna relación entre los recuentos de coliformes elevados y la presencia de E. coli como indicador de contaminación fecal para el presente estudio. Para la identificación adecuada de esta bacteria, se utilizaron cepas ATCC como control. Por ello se puede concluir que ninguna de las producciones exportadas por la congeladora nacional durante el tiempo en que se ejecutó esta investigación estaba contaminada por E. coli O157:H7.

## 2. INTRODUCCION

A través de estudios se ha reconocido que algunas cepas de E. coli son las responsables de causar en el ser humano ciertos trastornos gastrointestinales como lo es la diarrea al consumir agua o alimentos contaminados ( 1 ).

La E. coli O157:H7 es un serotipo perteneciente al género *Escherichiae*. Este se clasifica entre el grupo de las E. coli enterohemorrágicas, por lo que es capaz de causar enfermedad en el humano debido a la producción y síntesis de grandes cantidades de toxinas, principalmente de verotoxina, que es una toxina con propiedades análogas a la toxina de Shiga, la cual es producida por algunas cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Es por ello que esta bacteria tiene la capacidad de llegar a desarrollar severas complicaciones en el organismo, tales como la colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemorrágico o la púrpura trombocitopénica, debido a que su dosis infectiva puede ser muy baja ( 2 ).

Las vías de transmisión más comunes para E. coli O157:H7 son: el agua, los productos cárnicos y lácteos, así como las frutas y verduras crudas mal lavadas o bien, lavadas con agua contaminada. Aunque se han desarrollado métodos para la eliminación de las bacterias de los alimentos, entre ellos la congelación, se ha descubierto que, ocasionalmente, la E. coli O157:H7 puede sobrevivir a este proceso. También se han realizado estudios en donde se ha observado que el pH bajo de los alimentos puede influir en contrarrestar el crecimiento de este tipo de bacterias ( 3/7 ).

En Guatemala no hay estudios específicos respecto a este tema, así que el presente tiene como finalidad identificar la presencia o ausencia de esta bacteria en muestras de frutas y verduras cortadas y congeladas para exportación, utilizando el método oficial para el aislamiento de E. coli O157:H7 en alimentos, publicado en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos ( BAM por sus siglas en inglés ), de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América ( US FDA, por sus siglas en inglés ), esto con el propósito de obtener resultados confiables que le den validez a la investigación, tanto desde el punto de vista comercial como microbiológico ( 8 ).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Generalidades

La Escherichia coli O157:H7 se ha convertido en la actualidad, en uno de los tipos de bacteria enteropatógena de mayor preocupación en la industria alimenticia, debido a que se le ha catalogado como uno de los principales agentes causales de epidemias por contaminación de alimentos, provocando en el humano, severos trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos. La gravedad de las infecciones causadas por este serotipo ha dado lugar para que países industrializados regulen estrictamente sus normas de seguridad para el control de calidad de los alimentos ( 1 ).

La E. coli se diferencia de los otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, debido a sus reacciones bioquímicas y serológicas, especialmente su reacción ácida y producción de gas a partir de glucosa y lactosa; formación de indol, reducción de nitratos, reacción positiva al rojo de metilo, además la negatividad a Voges-Proskauer, urea y citrato. Los serotipos que también han sido asociados a epidemias por envenenamiento alimenticio incluyen O26 B<sub>6</sub>, O55 B<sub>5</sub>, O86 B<sub>7</sub>, O111 B<sub>4</sub> y O124 B<sub>17</sub>. La dosis infectiva que se ha determinado en humanos que se han prestado como voluntarios es de  $1.7 \times 10^9$  como mínimo, bajas dosis infecciosas ( de 2 a 2,000 células ) han sido asociadas con brotes. La E. coli O157:H7 puede permanecer viable en heces de bovino por más de 70 días, dependiendo principalmente de la dosis infectiva y de la temperatura a la que se encuentre, constituyendo por ello una de las más importantes fuentes de contaminación para la materia prima en lo referente a productos alimenticios ( 9 ).

E. coli crece perfectamente entre un amplio rango de temperaturas, que van desde 20°C a los 40°C, con un mínimo crecimiento a 10°C y un crecimiento óptimo en los 37°C (10/11).

El rango de pH para su crecimiento es de 4 a 8.5, siendo el rango de pH óptimo entre 7 y 7.5. Esta cepa crecerá en presencia de un 5 por ciento de sal a 37°C pero un 10 por ciento de la misma sería inhibitorio para su desarrollo. Es relativamente sensible a destruirse

cuando se le somete a deshidratación o congelamiento, aunque algunas cepas son bastante tolerantes a estos fenómenos ( 9 ).

Esta bacteria posee características fenotípicas que la hacen distinguirse de las otras variedades bacterianas que constituyen su familia, éstas son la producción de toxinas, factores de adherencia, hemolisinas, serotipos, biotipos y tipos resistentes a los antibióticos ( 12 ).

### 3.2 Epidemiología

La Escherichia coli. es un habitante común del intestino de todos los animales, incluyendo el hombre. Normalmente esta bacteria tiene la útil función en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de peligrosas bacterias y contribuir a la síntesis de un apreciable volumen de vitaminas. Una minoría de cepas de E. coli son capaces de causar enfermedad humana a través de diferentes mecanismos. El serotipo O157:H7 es una rara variedad de E. coli que produce grandes cantidades de una o más potentes toxinas que causan severos daños a la mucosa intestinal.

La enfermedad aguda causada por esta bacteria se denomina colitis hemorrágica. Las infecciones de colitis hemorrágica no son muy comunes, pero esto quizás no refleje su verdadera frecuencia. Probablemente aquellas personas que presentan síntomas inequívocos (diarreas profusas con sangre) buscan atención médica, mientras que los casos menos severos, que pueden ser más numerosos, conforman un subregistro de pacientes asintomáticos. Todas las poblaciones son susceptibles de contraer la colitis hemorrágica, pero los mayores brotes han ocurrido en escuelas y hospitales ( 13 ).

La enfermedad se caracteriza por dolor abdominal y diarrea, la cual inicialmente es acuosa para tornarse luego sanguinolenta. Ocasionalmente ocurren vómitos. No se presenta fiebre o es muy baja. Algunos individuos sólo presentan diarrea acuosa o no presentan síntomas. Los síntomas iniciales generalmente ocurren a los dos días siguientes de haber ingerido los alimentos contaminados, aunque se han reportado también entre los tres y cinco días. La intensidad de los síntomas aumenta durante las primeras 24-48 horas y duran de cuatro a diez días ( 14 ).

Algunos de los afectados, fundamentalmente los niños menores de 5 años y los ancianos, desarrollan el síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por fallo renal y anemia. Entre el 2% y el 5% de los afectados por colitis hemorrágica pueden desarrollar esta complicación. En los Estados Unidos, el SUH es la causa principal de daño renal en los niños, y la mayoría de los casos de SUH son causados por la E. coli O157:H7.

En los ancianos, la afección de síndrome urémico hemolítico más otras dos entidades, fiebre y síntomas neurológicos, pueden favorecer la aparición de la púrpura trombocitopénica trombótica. Esta enfermedad tiene una tasa de letalidad en los ancianos del 50%. El síndrome urémico hemolítico es una condición de riesgo para la vida que usualmente se trata en una unidad de cuidados intensivos. A menudo se requieren transfusiones de sangre y diálisis. Con cuidados intensivos el SUH tiene una tasa de letalidad del 3%-5% (13/14).

Las personas que sólo tuvieron diarrea usualmente se recuperan completamente, pero alrededor de un tercio de las personas afectadas con el SUH presentan problemas renales varios años después y unos pocos requieren diálisis por largos períodos. Otro 8% presentan otras complicaciones de por vida tales como alta presión sanguínea, ceguera y parálisis (14).

Los alimentos que han sido asociados a la infección son hamburguesas de carne crudas o poco cocinadas las cuales han estado implicadas en casi todos los brotes documentados y en los casos esporádicos. La leche cruda así como sus derivados también han estado involucrados en casos de la enfermedad. Alimentos como vegetales y frutas mal lavadas, yogurt, mayonesa y agua no potable podrían ser también fuente de infección. El primer caso en que se implicó a este serotipo se dio en 1982, cuando se le aisló a partir de muestras de carne contaminada. En el mismo año se reportó un brote epidémico en una casa cuna en Ontario, Canadá. En 1984, una guardería en Nebraska se vio afectada por esta cepa, cuando los niños consumieron alimentos contaminados. En 1986, se reportaron casos epidémicos en una guardería y en una comunidad en Alberta, Canadá. Entre 1985 y 1987, se reportaron casos de contaminación alimenticia, principalmente de jamones de cerdo, pavo y sandwiches de queso, en Ontario y en Londres. Una fuerte alarma se desencadenó en Utah, Estados Unidos, en 1987 por los mismos motivos, así como que en

1988, una escuela secundaria en Minnessota, Estados Unidos, fue afectada por este microorganismo ( 1 ).

La leche entera fue primeramente reconocida como un vehículo de transmisión de E. coli O157:H7 en 1986. Dos niños de distintas familias en Wisconsin, Estados Unidos, desarrollaron colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico después de beber leche cruda que provenía de granjas productoras de lácteos. Después del reconocimiento de la E. coli O157:H7 como un agente causal de colitis hemorrágica, el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta ( CDC por sus siglas en Inglés ) inició un sistema de vigilancia nacional, un tanto informal, el cual identificaría casos esporádicos de la enfermedad en Estados Unidos. Durante 20 meses de vigilancia, 103 casos clínicamente compatibles con la colitis hemorrágica fueron reportados en 28 estados del país. De éstos 103 casos, 28 (36 porciento) fueron positivos para E. coli O157:H7. Washington fue el primer estado que reportó infecciones intestinales causadas por esta bacteria durante el tiempo que duró la vigilancia, siendo 93 los casos comprobados, con una incidencia anual de 2.1 casos por 100,000. El rango de más alta severidad se presentó en niños menores de 5 años, pero los casos reportados se dieron en personas entre los 11 meses a 78 años de edad ( 15 ).

Un estudio realizado en King County, Washington, encontró que la incidencia anual de infecciones por E. coli O157:H7 en niños menores de 15 años fue de 0.69 casos por 100,000 entre 1971 y 1975, y de 1.74 casos por 100,000 entre 1981 y 1986 ( 1/15 ).

Investigadores de la Clínica Mayo encontraron en Minnesota, Estados Unidos que la incidencia del síndrome urémico hemolítico causado por E. coli O157:H7 entre los niños menores de 18 años se incrementó desde 0.5 casos por 100,000 en 1979 a 2.0 casos por 100,000 en 1988. Otro estudio indicó que el sexo femenino tiene un significativo riesgo mayor a desarrollar anemia hemolítica después de una infección causada por E. coli O157:H7 que el sexo masculino, pues se cree que la mujer tiende a desarrollar una destrucción eritrocítica mayor que el hombre ( 15/16 ).

La primera epidemia por contaminación del agua con esta bacteria, se reportó en Missouri en 1989, en donde más de 240 personas se infectaron, 32 fueron hospitalizadas y 4 murieron. Un caso similar se reportó en Escocia en 1992, en donde la contaminación se presentó a través del agua no clorada de una piscina ( 1/17 ).

En 1991, Inglaterra reportó una epidemia provocada por esta cepa luego que 16 personas consumieron yogurt, 11 de ellos eran niños ( 18 ).

En EUA, al principio de 1993, el serotipo O157:H7 recibió una considerable atención después de un larga epidemia causada por envenenamiento alimenticio provocada por esta bacteria. Más de 700 personas en cuatro estados fueron infectadas al consumir alimentos mal cocinados y hamburguesas contaminadas que fueron servidas en un restaurante de comida rápida; 51 casos de estos desarrollaron síndrome urémico hemolítico y 4 terminaron en muerte. 15 casos epidémicos adicionales se reportaron en 1993 y veinte más en la primera mitad de 1994 en el mismo país ( 1 ).

En mayo del mismo año, Italia reportó una epidemia en donde 15 de los casos concluyeron en síndrome urémico hemolítico, causado por el serotipo O157, aparentemente luego que las personas consumieron croquetas de pollo ( 16 ).

En diciembre de 1994, Washington se vió seriamente afectado cuando lograron aislar esta cepa de muestras de salami refrigerado el cual fue consumido por varios habitantes de una comunidad central ( 15 ).

Otra gran epidemia se presentó en mayo de 1996 en la ciudad de Sakai, cercana a Osaka, Japón, en donde la E.coli O157:H7 causó más de 5000 casos y 6 muertes , al presentarse como contaminante de los alimentos escolares allí preparados ( 19 ).

En octubre de 1996, otro caso similar se reportó en tres estados de la Columbia Británica, Canadá, cuando se encontraron 66 personas enfermas luego de consumir jugo de manzana fresco, sin pasteurizar y de las cuales resultó un niño fallecido por fallo renal a consecuencia de la infección por E. coli O157:H7 ( 20/21 ).

En Escocia, a mediados de Noviembre de 1996 comenzó el mayor brote de intoxicación por esta bacteria en el Reino Unido. Las fuentes del brote fueron frambres y bistec contaminados de una carnicería de la localidad de Wishaw, Lanarkshire, en Escocia. Hasta enero de 1997 se habían confirmado 256 afectados y 16 fallecidos.

Desde el 20 de mayo hasta el 3 de junio de 1997 el número de casos de infección por Escherichia coli O157 asociados a un brote ocurrido en el Hospital Falkirk and District Royal Infirmary, se había elevado a 31. De ellos, 16 eran pacientes del pabellón geriátrico, 11 eran del equipo médico y 4 personas de la comunidad que tenían vínculos con la unidad.

Este hospital había atendido el año anterior a los afectados por la epidemia ocurrida en Lanarkshire, Escocia. Los pacientes del hospital afectados por brote oscilaban en un rango de edad de 75 a 95 años, pero ninguno en condiciones críticas. Se confirmó que la cepa del brote era la E. coli fago 8. Esta es una cepa inusual en Escocia, acumulando sólo el 3% de los aislamientos realizados por el Laboratorio de Referencia desde 1993. La fuente del brote no se logró identificar ( 13 ).

En EUA, la epidemia que se desató en 1993, fue motivo para que se promoviera una revisión más detallada del Programa de Seguridad de Alimentos, culminando en las reformas dadas a conocer en 1996 como las "Reglas Finales para la Reducción de Patógenos y los Sistemas para el Análisis de Control en Puntos Críticos (HACCP, por sus siglas en Inglés)". El concepto de HACCP se originó para darle seguridad a los alimentos que se utilizarían en el programa espacial para el consumo de los astronautas en sus misiones. Este requiere que, durante el procesamiento de los alimentos, se identifiquen los denominados "Puntos Críticos de Control" en donde el riesgo, como la contaminación microbiana, pueda ocurrir. Establece controles para prevenir o reducir este riesgo y, a la vez, para lograr mantener buenos récords ( 1/20/22 ).

En Guatemala se han realizado pocos estudios específicos clínicos e industriales para la identificación de este serotipo, considerando que el más relevante ha sido un trabajo de tesis elaborado en 1996, en el que se logró aislar E. coli O157:H7 de una muestra de fruta sin cáscara que fue expendida en una venta de comida callejera ( 23 ).

### 3.3 Patogénesis

El mecanismo por el cual la E. coli O157:H7 causa una infección aún no se encuentra bien definido, sin embargo, muchos factores han sido asociados con la virulencia del microorganismo. Uno de ellos es la producción de una o más verotoxinas. Estudios realizados en 1983 sobre este serotipo, reportan altos niveles de producción de citotoxina activa sobre las células Vero ( llamadas así por la línea celular obtenida del riñón del mono verde del Africa ). Además, revelan que la verotoxina de E. coli O157:H7 es inmunológicamente indistinguible de la Toxina de Shiga, producida por algunas cepas de

Shigella dysenteriae tipo I, y a la cual tiene igual actividad biológica así como idéntica enterotoxicidad. Otra verotoxina de E. coli O157:H7, la cual es antigénicamente distinta de la anteriormente descrita, es la neutralizable por antisuero contra la toxina de Shiga denominada SLT-I o VT-1; otra adicional a ella es la no neutralizable por el antisuero contra la toxina de Shiga la cual es llamada SLT-II o VT-2 ( 15/24 ).

El mecanismo de acción de la VT-1 y de la toxina de Shiga es que ambas bloquean la síntesis de proteínas por el Factor-1 inhibitorio de la elongación (EF-1) dependiente del aminoacil atando el t-ARN a las subunidades ribosomales 60S. Subsecuentemente, se determinó que la VT-2 tiene el mismo mecanismo de acción. Más adelante se confirmó que la VT-2 y la toxina de Shiga inactivan las subunidades ribosomales 60S partiendo del enlace N-glicosídico a la posición adenina-4324 del ARN ribosomal 28S ( 24 ).

La adhesión de E. coli O157:H7 a las células intestinales puede ser un aspecto importante del potencial patogénico del microorganismo. Los pacientes con una infección provocada por este serotipo pueden presentar un poco o nada de fiebre, lo cual sugiere que el organismo es no invasivo y no penetra al sistema circulatorio. Al llegar el organismo al tracto intestinal, el mismo elabora sus toxinas, las cuales son activas sobre el colon. La adherencia de esta bacteria al intestino se ve mediada por el plásmido 60-MDa. Una alta producción de VT por E. coli O157:H7 implica cambios histológicos y síntomas clínicos notorios; entre los cambios histológicos se puede citar el incremento de la apoptosis de la superficie epitelial del colon distal, un incremento en la actividad mitótica en las criptas, depleción de mucina y una moderada infiltración de neutrófilos en la lámina propia y epitelial ( 24 ).

### 3.4 Vías de transmisión

Desde que las infecciones causadas por E. coli O157:H7 empezaron a cobrar importancia, se tomaron como las principales vías de transmisión para la bacteria: el agua, los alimentos cárnicos ( principalmente carne de res y cerdo ), también los productos lácteos, tales como la leche cruda y la crema. En los últimos años se han agregado a esta lista los alimentos ácidos, las frutas, las verduras para ensalada y el yogurt, ya que se han visto implicadas como los vehículos de infección en recientes epidemias a nivel mundial.

Antes los alimentos con un pH menor a 4.6, generalmente se consideraban como de bajo riesgo en términos de seguridad alimenticia; ahora, en muchos casos reportados como epidémicos se ha observado que la E. coli O157:H7 persiste como patógeno en alimentos con un valor de pH bajo. Estudios han demostrado que esta cepa es capaz de tolerar condiciones ácidas, algunas de ellas persisten en medios con un pH tan bajo como 2.0 y en cidra de manzana, a una temperatura de 8°C, durante 10 o hasta 31 días ( 1/3 ).

Otra vía de transmisión comprobada es la mayonesa o bien los aderezos utilizados para las ensaladas; aunque este serotipo no puede multiplicarse al pH de estos productos, si puede permanecer viable en ellos hasta por 55 días si se almacenan a una temperatura de 5°C ( 7 ).

La E. coli O157:H7 ha demostrado tener la capacidad de sobrevivir y crecer en vegetales para ensalada almacenados a 12°C y a 21°C por más de 14 días siendo mayor su tiempo de supervivencia a temperaturas de refrigeración ( entre 0°C y 4°C ) que a temperatura ambiente( 10 ).

El yogurt se ha visto implicado en casos de contaminación alimenticia por esta cepa debido a que se ha utilizado para su preparación leche que ya estaba contaminada, o bien, la contaminación pudo darse luego del proceso de pasteurización del mismo yogurt ( 18 ).

### 3.5 Métodos de detección

Conforme se avanza en la investigación de esta enterobacteria, se han descubierto varias técnicas útiles para la rápida detección de la misma, entre las cuales se encuentran los ensayos fluorométricos, utilizando 4-metillumbelliferyl-beta-D-glucoronido (MUG) como indicador, no hidrolización del MUG por E. coli O157:H7, fermentación del sorbitol, utilización de un medio compuesto por triptona, sorbitol, cloruro de sodio, sales biliares, MUG y púrpura de bromocresol, identificación de verotoxina positiva para E. coli O157:H7, filtración en membrana hidrofóbica cuadrículada combinada con un procedimiento inmunoblot, utilización de membranas hidrofóbicas cuadrículadas combinado con anticuerpos monoclonales de E. coli O157:H7, ensayo rápido de aglutinación con látex, ELISA para detección del antígeno O157 de E. coli., detección de un anticuerpo monoclonal (Mab) 4E8C12 específico para E. coli enterohemorrágica del serotipo O157:H7, pruebas con oligonucleótidos sintéticos para genes estructurales de VT1 y VT2, pruebas de DNA para detectar SLT de E. coli O157:H7, procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ( PCR ), uso de polinucleótidos no radioactivos marcados y pruebas con DNA oligonucleótido para detectar VTEC ( 15/25 ).

Muchas de estas pruebas no se utilizan como un procedimiento de elección inmediato para la detección de E. coli O157:H7 en alimentos, pero sí han servido como base para el desarrollo de pruebas que sí son utilizadas actualmente para la evaluación microbiológica de muestras alimenticias ( 26-29/31 ).

### Frutas y vegetales congelados

Muchas hortalizas pueden ser congeladas y sembrarse muy de cerca a un producto fresco sobre la mesa del consumidor, ya que la retención de la calidad es el principal objetivo de la congelación. La materia prima es básica para la calidad y el carácter de las hortalizas congeladas. Los productos recogidos en el campo en temporada, dan una garantía de que estos serán de buena calidad, por ejemplo, en Guatemala, el brócoli tiene su pico

máximo de producción durante los meses entre julio y septiembre, el melón se da mayormente entre enero y marzo, la piña puede ser cosechada durante todo el año; las fresas, moras y frambuesas se dan principalmente durante los meses entre marzo y mayo así como entre septiembre y noviembre.

El lugar donde se cosecha, la selección de la variedad de las hortalizas y frutas, las prácticas de cultivo, la madurez y el tiempo exacto para el corte, tienen un efecto específico sobre la retención de la frescura del producto ( 32 ).

La presencia de bacterias patógenas en frutas frescas y vegetales cultivados específicamente para ser congelados, puede evidenciarse desde el campo, durante la cosecha, durante la manipulación post cosecha, en el proceso en sí de los productos o bien en el almacenamiento del producto terminado. Fuentes de contaminación conocidas en todos estos puntos son las heces, irrigación con agua ( principalmente la utilizada para aplicar fungicidas e insecticidas ), grama, polvo, animales del campo y domésticos, insectos, manipulación humana o bien, el transporte pre y post producción (camiones y contenedores sucios) ( 33/34 ).

### **3.6 Proceso del congelado de hortalizas**

Los vegetales y las frutas que son preparadas para su posterior congelación deben de seguir las mismas operaciones utilizadas para preparar hortalizas frescas. Estas deben de ser lavadas para remover la suciedad del campo, desechos y residuos superficiales, proporcionando el primer paso de control sobre la contaminación microbiana.. Las partes inservibles son removidas por cortes manuales o bien mecánicamente para agilizar el proceso y reducir los costos correspondientes a la mano de obra. Los métodos mecánicos para el lavado de hortalizas se basan en la utilización de bombas de agua con alta presión para lograr el máximo de efectividad ( 35 ).

La congelación rápida ( IQF, por sus siglas en Inglés ) que corresponden a Individual Quick Frozen, ha sido definida como el proceso donde la temperatura del

alimento pasa a través de la zona de máxima formación del hielo cristalino (32° a 25°F) en 30 minutos o menos, basándose esto en la velocidad de eliminación del calor del mismo. Muchos de los vegetales y frutas que son congelados hoy en día son comprados bajo contratos establecidos entre el cliente y el fabricante, así como entre el fabricante y el agricultor ( proveedor de materia prima ), por ello existen especificaciones que son utilizadas para darle grado al producto, lo cual incluye límites mínimos y máximos para factores como el tamaño, textura, color, densidad, manchas, materia vegetal, infestaciones de insectos, enfermedades, etc. Si los envíos caen por debajo de los requerimientos en las especificaciones, el cliente puede rechazar el producto y penalizar al proveedor, por el contrario, si el envío está entre las especificaciones, entonces esto va en favor de la calidad del producto que se está ofreciendo al consumidor ( 33 ).

Una de las mayores operaciones en el congelado es el movimiento físico de grandes cantidades de producto, antes y después de procesado, de un lugar a otro dentro de la planta procesadora. Esto se realiza de distintas formas, utilizando bandas, fajas transportadoras de aire, fajas mecánicas, bins, etc. Otro punto durante el proceso es la inspección continua, la cual empieza en el momento en que se recibe la materia prima en la planta procesadora hasta que el producto es empacado y almacenado para su posterior exportación (33/35/36). Luego de que la inspección de materia prima es efectuada se procede al escaldado del producto (solo para vegetales), el cual consiste en aplicar calor al vegetal el tiempo suficiente para lograr inactivación enzimática y reducir los efectos del congelado sobre el color y la textura del mismo, así como para reducir su población microbiana. Las enzimas en vegetales congelados crudos son las responsables de colores y sabores indeseados que se desarrollan durante su almacenamiento. Muchas de estas enzimas son inactivadas rápidamente a temperatura que oscilan por los 180°F ( 82°C ). Las pruebas de catalasa y peroxidasa son las más utilizadas para conocer si el proceso de escaldado fue efectivo o no. El escaldado puede efectuarse con vapor o con agua caliente, el realizado con microondas aún se encuentra en fase experimental. Vegetales como el brócoli deben de escaldarse por 2 o 3 minutos en agua caliente o bien 3 a 4 minutos en vapor ( Ver anexo A-1 ) ( 35 ).

Luego del escaldado, la materia vegetal se conduce hacia el túnel de congelado por medio de una banda, en donde se efectúa la inspección del proceso, eliminando en este

punto piezas defectuosas. Aquí permanece aproximadamente 15 minutos a 0°F (-18°C) y sale a una última banda de inspección, en donde se eliminan grupos de hortalizas que se han congelado unidos (mal IQF) para luego ser empacado y almacenado ( 37 ).

En todos los productos congelados, los cambios en cuanto a calidad ocurren durante el almacenamiento, el cual generalmente es a 0°F (-18°C). A esta temperatura en pocos meses se puede notar un cambio en el color del producto y en poco menos de un año habrá un cambio en el sabor del mismo. Estos cambios casi nunca afectan al cliente ni al consumidor, porque compañías que se dedican al negocio de la exportación del congelado tienen poca probabilidad de mantener en sus cuartos refrigerados producto por más de seis meses debido a la alta demanda de los mismos ( 33/ 35 ).

En cuanto al congelado de frutas, la única variación es que ésta no se escalda, puesto que se llevaría a cabo un proceso de cocción. Así que el procedimiento se reduce a la recepción de materia prima con su consiguiente evaluación, la preparación de la fruta (el melón se puede preparar en bolas y trozos, así como la piña en cubos), el lavado, la inspección pre-congelado, la congelación, inspección post-congelado, empaque y almacenamiento. Es muy importante que frutas como el melón y la piña sean lavadas, luego de ser cortadas, en agua a la que se le ha agregado sucrosa para evitar la pérdida de su azúcar natural y por consiguiente una disminución de su grado Brix ( 37 ).

Los métodos convencionales de congelado tienden a destruir las estructuras así como la turgencia de las células vivas de los tejidos en las frutas. Por supuesto que muchas veces esto ocurre en los tejidos de los vegetales aunque con menos frecuencia, ya que estos presentan fibras que les proporcionan sostén ( 32/ 39 ).

Antes de ser congeladas, la frutas pueden presentar problemas de sobremaduración y manchas que luego de ser sometidas al frío, desaparecen. Un color atractivo es importante en las frutas congeladas. Para mantener el brillo en frutas que contienen enzimas, las cuales causan oxidación (mancha café), se debe de agregar un tratamiento químico o bien aditivos, como el ácido cítrico, ascórbico o málico, los cuales las inactivan. Una pobre variedad de congelado puede ser hecha sobre un producto de alta calidad; de otra manera, una materia prima de muy buena calidad puede ser rápidamente degradada por un mal proceso de congelado, desperdiciando de esta forma dinero, tiempo y espacio ( 36 ).

La preservación de las frutas por congelamiento depende del retardo de los cambios fisiológicos post-proceso, el cual incluye el retardo de la acción microbiana por las bajas temperaturas. Muchas reacciones, principalmente las catalizadas por enzimas, se llevan a cabo a temperaturas de 0°F (-18°C) o menos. Algunos datos evidencian deterioro del olor y sabor de las fresas congeladas en función logarítmica de la temperatura de almacenamiento, las cuales oscilan entre 30° a 0°F (-1° a -18°C). Por ejemplo, el cambio en el sabor y color de las fresas se hacen evidentes al permanecer 160 días almacenadas a 5°F (-15°C), 360 días a 0°F (-18°C) y 1,000 días a -5°F (-20.5°C) ( 16/ 38 ).

Los efectos de la formación de cristales de hielo en las frutas en estudio, producen daño mecánico y químico en sus estructuras. Las membranas celulares se comienzan a desprender en piezas pequeñas, aparentando una textura blanda. El daño químico es causado por cambios en el pH que hacen inestables a los coloides y hacen que el material lipídico se oxide ( 33 ).

El rápido enfriamiento de las frambuesas, moras y fresas a una temperatura menor a 40°F (4°C) se considera el paso más importante para la calidad de las mismas, más aún que su rápida congelación, ya que detiene su oxidación. Es importante recordar que el punto de congelación de un alimento es más bajo que el del agua pura, por lo que si hay tratamientos pre-proceso para facilitar su congelamiento no hay que escatimar recursos para obtener un producto final de buena calidad ( 38 ).

### **3.7 Efectos del proceso de congelado sobre los microorganismos**

A una temperatura ambiente ordinaria, el ataque microbiológico es causado tan rápido que todos los demás cambios sucedidos pasan a formar parte de un segundo plano. Los microorganismos que están inevitablemente presentes en todos los tipos de materias primas en los alimentos, liberan enzimas en el sustrato durante su desarrollo. Los cambios

proviene entonces de la actividad de estas enzimas microbianas las cuales alteraran el olor, sabor, textura y apariencia del producto; ocasionalmente esto podría ser una ventaja pero, en general, esto es causa de deterioración y putrefacción del producto ( 9 ).

El propósito de la preservación por congelamiento es prolongar la vida en almacenamiento de los distintos productos, ya sea aniquilando a los microorganismos o bien, inhibiendo su actividad y multiplicación ( 33 ).

El congelado y su posterior almacenaje, a bajo cero grados, podría matar algunos de los microorganismos presentes en un material no congelado, pero éste es un proceso lento y variable que depende en parte de la naturaleza del alimento. La higiene del producto previo a su congelamiento es un factor de mucha importancia. El almacenamiento a temperaturas más frías que  $-12^{\circ}\text{C}$  (  $10^{\circ}\text{F}$  ) inhibe el crecimiento microbiano y por lo tanto es un método efectivo para preservar los alimentos contra la putrefacción provocada por bacterias ( 9/6 ).

Hay tres aspectos a considerar con respecto a los microorganismos en alimentos congelados:

1. La clase de microorganismo: algunos patógenos son más resistentes al congelado que algunos microorganismos deteriorantes. Muchos de los patógenos más comunes son bacterias gram negativo; este grupo es más sensible al congelado, al almacenamiento bajo cero y descongelado que los organismos deteriorantes gram positivo.
2. La multiplicación de los microorganismos en el alimento congelado: a veces, cuando el crecimiento microbiano es completamente inhibido, el producto congelado puede seguir deteriorándose a la par de la actividad de la enzimas microbianas liberadas previamente, las cuales catalizan reacciones bioquímicas indeseables en el alimento.
3. Microbiología de los alimentos descongelados: los organismos patógenos, los cuales pueden crecer y producir toxinas en el alimento sin representar al producto no paletizado, estarán siempre presentes en cualquier tipo de producto congelado, aunque éste sea higiénicamente preparado. En el caso de los alimentos congelados que suelen ser descongelados lentamente, la microbiota psicotrópica es dominante y puede alterar el sustrato con la subsecuente inhibición o reducción de la multiplicación de cualquier tipo de patógeno presente cuando la descongelación se haga completa ( 6/35 ).

Estos tres aspectos se relacionan directamente a E. coli O157:H7, ya que algunas cepas como ésta son resistentes a la congelación, comprobándose esto al efectuársele el respectivo análisis microbiológico a una muestra de cada lote de la producción diaria utilizando para ello producto que se ha descongelado para su evaluación organoléptica, procedimiento que regularmente es hecho para verificar que todos los pasos efectuados sobre el mismo han sido realizados correctamente ( 40 ).

#### 4. JUSTIFICACION

Tanto para el pequeño como para el gran exportador de frutas y verduras congeladas en Guatemala, es una garantía de calidad el poder demostrar que su producto congelado está totalmente libre de E. coli O157:H7 y por tanto, ser aceptado al ingresar en el mercado de cualquier otro país, siempre y cuando cumplan con las especificaciones microbiológicas de rigor. Además, tiene la certeza de que su producto no será nocivo para la salud del consumidor, lo cual estará directamente relacionado con el incremento de sus ventas, puesto que la confianza en su producción, aumentará la demanda de la misma.

A nivel microbiológico, es importante que Guatemala empiece a actualizarse al incluir en la evaluación rutinaria del control de calidad de los alimentos congelados, la búsqueda de microorganismos enteropatógenos del tipo E. coli O157:H7 ya que hasta la fecha, esto no es un reglamento impuesto por las autoridades encargadas de la materia, mientras que en otros países industrializados, sí lo es.

Otro aspecto relevante es el grado de patogenicidad que esta bacteria presenta y, más aún, el hecho de que hasta el momento se desconoce la existencia de alguna droga que sea cien por ciento efectiva en el tratamiento de las infecciones y enfermedades causadas por E. coli O157:H7.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 GENERALES

- Identificar la presencia de Escherichia coli O157:H7 en verduras y frutas congeladas para exportación.
- Proporcionar un estudio de referencia en el área industrial del Químico Biólogo, en cuanto al análisis microbiológico de muestras alimenticias dentro de una empresa, en búsqueda de un microorganismo de alta patogenicidad como lo es E. coli O157:H7.

### 5.2 ESPECIFICOS

- Utilizar las técnicas de fermentación del sorbitol y aglutinación con antisueros látex para identificar la presencia o ausencia de E. coli O157:H7 en muestras de verdura y fruta congelada para exportación.
- Determinar si existe correlación entre una muestra con alto recuento de coliformes y E. coli O157:H7 presente, si es que llegara a descubrirse alguna muestra positiva para este microorganismo.

## 6. HIPOTESIS

Al menos una muestra de las frutas o verduras congeladas para exportación que se produzcan dentro de una planta congeladora nacional, durante el bimestre correspondiente a marzo-abril en que se ejecute la fase experimental de la tesis, estará contaminada con Escherichia coli O157:H7.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### Universo

Verduras y frutas congeladas obtenidas de una planta exportadora privada nacional.

### Muestra

Un número finito de muestras de una libra por cada 5,000 lbs. producidas de brócoli en flores y cubos, piña en cubos, bolas de melón Cantaloupe y Honey Dew, fresas, frambuesas y moras, que hayan resultado positivas para E. coli en el medio para recuento de coliformes (Chromocult Agar) durante los meses marzo y abril que dure la fase experimental.

### 7.1 Materiales

#### Equipo:

- Refrigeradora
- Mechero Bunsen
- Asas de nicromo
- Autoclave
- Estufa
- Balanza semianalítica
- Balanza analítica
- Motor para licuadora
- Contador Quebec

#### Cristalería:

- Cajas de petri estériles o desechables
- Probetas

- Pipetas volumétricas de 1 ml , de 5 ml y de 10 ml
- Tubos de ensayo con tapón de rosca
- Frascos Mason estériles
- Erlenmeyers de 250 ml
- Portaobjetos

**Medios de cultivo y Reactivos:**

- Agar Nutritivo ( Plate Count Agar -PCA- )
- Agar Chromocult
- Papa-Dextrosa-Agar ( PDA )
- Agar MacConkey Sorbitol modificado con Telurito de potasio y Cefixime ( TC SMAC )
- Agar Enriquecido para el crecimiento de E. coli enterohemorrágica ( EEB ).
- Agar Tripticasa Soya enriquecido con extracto de levadura ( TSAYE ).
- Reactivo de Kovac`s para la prueba de Indol
- Agua destilada
- Antisueros látex O157 y H7
- Etanol absoluto

**Controles:**

- Cepa ATCC No. 35150 de E. coli O157:H7 productora de SLT-1 y SLT-2 (Control Positivo)
- Cepa de Proteus vulgaris. ( Control Negativo )

## 7.2 Método

### 7.2.1 Recolección de muestras

Se tomó una muestra de 1 libra por cada 5,000 libras de producción para efectuarle análisis microbiológico ( 41/43 ) . Este análisis comprendió recuento total bacteriano, recuento de coliformes y presencia de E. coli. ( Ver Anexo A-2 )

Todas las muestras que fueron E. coli positivo o presuntivas de ello en el medio utilizado para hacer el recuento de coliformes, pasaron a ser parte de la muestra para la investigación de E. coli O157:H7.

### 7.2.2 Proceso analítico

- Todas las muestras se compararon contra los controles positivo y negativo cultivados paralelamente bajo las mismas condiciones ( se amplia en el punto 7.2.3.3 ) .
- Se tomaron muestras ( Brócoli, melón, piña, fresas, frambuesas y moras ) de la totalidad de verduras y frutas cortadas y congeladas para exportación de la planta congeladora privada nacional, que fueran E. coli positivo o bien presuntivas de ello.
- Se pesó 25 gr. de la muestra y se mezcló con 225 ml del medio enriquecedor para el crecimiento de E. coli enterohemorrágica (EEB). Se incubó 6 Hrs. a 37° C. (a)
- Se agregó 0.1 ml de (a) sobre el medio de aislamiento MacConkey Sorbitol + Telurito de potasio y Cefixime (TC SMAC) y se esparció. Se incubó a 37° C por 24 Hrs.
- Se reservó la muestra enriquecida por 18 Hrs. más. (b)
- Se buscaron colonias incoloras o grises. Si se encontraban, se subcultivaba a partir del TC SMAC en Agar Trypticosa Soya más extracto de levadura (TSAYE) y se incubaba a 37° C por 24 Hrs.
- Si no habian colonias sospechosas, se sembraba a partir de (b) sobre TC SMAC y se incubaba a 37°C por 24 Hrs. Luego se subcultivaba en TSAYE e incubaba por 24 Hrs. a 37° C.
- A las colonias sospechosas del TSAYE, se les realizó el Test del Indol.

- Si el Test del Indol era positivo entonces se confirmaba con Anti O157 látex y Anti H7 látex.
- Si Látex Test (+) — la cepa correspondía a E. coli O157:H7 .
- Si Látex Test (-) — se debería hacer el Test para SLT ( Shiga-like Toxin).
- Prueba confirmatoria definitiva : PCR ( Colaboración de la US Federal Drug Administration, US FDA, Washington, D.C. Estados Unidos de América )

### **7.2.3 Control de calidad**

#### **7.2.3.1 Ambientes:**

Para asegurarse que el ambiente de trabajo era el adecuado se desinfectó la campana de extracción con alcohol absoluto, se limpiaron los pisos y las mesas del laboratorio de microbiología todos los días, especialmente los días que se corrió la prueba para E. coli O157:H7. Cada cinco días se controlaba la efectividad de la desinfección, exponiendo cajas con agar nutritivo durante 15 minutos para luego incubarlas a 37°C por 48 Hrs. ( Ver anexo A-3 )

#### **7.2.3.2 Equipo:**

Se efectuaron lecturas diarias en las temperaturas de la incubadora, el baño de maría, el refrigerador y el congelador para asegurar condiciones constantes de trabajo.

#### **7.2.3.3 Medios de cultivo y reactivos**

Todas las pruebas con medios de cultivo se acompañaron de un control positivo ( cepa ATCC No. 35150 de E. coli O157:H7 ) y de un control negativo ( cepa de Proteus vulgaris. ), las cuales se mantuvieron viables dentro de tubos con tapón de algodón

que contenían agar nutritivo sin ningún aditivo resembrañolas a los dos meses para mantenerlas en óptimas condiciones ( Ver anexo A-4 ).

En la preparación de reactivos se utilizaron pesos medidos en balanza analítica y volúmenes medidos con pipetas calibradas.

Al efectuar pruebas de aglutinación con látex también se corrieron simultáneamente a la muestra, las cepas control ( Ver anexo A-4 ).

### **7.3            Diseño estadístico de la investigación**

#### **7.3.1 Muestreo**

##### **7.3.1.1        Tamaño de la muestra**

Debido a que éste estudio se catalogó como de tipo Sistemático-descriptivo, se aplicó el diseño ROC en donde se tomó como tamaño de muestra a la cantidad de muestras E. coli positivo o presuntivas de ello que se presentaron durante un bimestre, ya que la empresa privada que patrocinó el estudio así lo solicitó. No existió un número límite de muestras por producto, pues factores como la temporada de cosecha y las prioridades determinadas por los clientes, afectó el volumen de materia prima adquirida.

##### **7.3.1.2        Forma del muestreo**

Se recolectó una muestra de 1 libra por cada 5,000 libras de producto congelado; a la producción diaria ( que era de 35,000 lbs. en promedio ) se le asignó un número de código el cual variaba cada dos horas para formar lotes. El número diario de muestras dependió de la clase de producto, el tipo de corte y el volumen procesado en el día.

## 7.3.2 Análisis de resultados

### 7.3.2.1 Presentación gráfica de resultados

Se hizo por medio de histogramas de frecuencia y diagramas de secciones para facilitar la interpretación de los resultados.

### 7.3.2.2 Presentación numérica de resultados

Se utilizaron tablas para tabular los resultados que fueron presentados en forma porcentual.

### 7.3.2.3 Cálculos

Para calcular el porcentaje de cada una de las frutas y verduras incluidas dentro del estudio utilizó la fórmula :

$$\% \text{ de fruta o verdura} = \frac{\# \text{ de muestras de fruta o verdura}}{\# \text{ total de muestras}} * 100$$

## 8. Resultados

Para poder obtener resultados confiables en esta investigación, se tomó el tiempo necesario para montar y estandarizar la técnica de fermentación del sorbitol para la Escherichia coli O157:H7 propuesta por la 8a. edición del Bacteriological Analytical Manual ( BAM ) de la Food and Drug Administration ( FDA ), pues al haber consultado referencias bibliográficas en el ICAITI, INCAP, LUCAM, Universidad Del Valle y Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, no se encontró ninguna referencia de que algún otro investigador la haya utilizado en Guatemala

Un total de 223 muestras fueron analizadas durante los meses de marzo y abril. De éstas, 174 fueron confirmadas como E. coli positivo y 49 resultaron estar contaminadas por enteropatógenos del tipo Enterobacter sp., Citrobacter sp., Serratia sp. y Yersinia sp. De las 174 muestras contaminadas con E. coli, sólo dos muestras, una de melón y una de piña resultaron sospechosas de estar contaminadas con el serotipo O157:H7 al presentar colonias similares a las obtenidas por la cepa control positivo sobre el medio selectivo.

Debido a que el estudio se ejecutó durante dos meses, los datos fueron tabulados mes por mes ( Ver Tablas 1-12 ). Al sumar los resultados obtenidos por cada tipo de muestra, se contabilizaron 57 muestras de brócoli, 22 muestras de mora, 21 muestras de fresa, 22 muestras de frambuesa, 28 muestras de piña y 73 muestras de melón, para un total de 223. Estos datos representados porcentualmente indican que las muestras analizadas fueron 25.56% de brócoli, 9.87% de mora, 9.42% de fresa, 9.87% de frambuesa, 12.55% de piña y 32.73% de melón, para totalizar en un 100% la parte experimental de la investigación.

La cantidad por tipo de muestra varía durante todo el año pues se ve determinada por factores como la temporada de siembra y cosecha, es por ello que durante los dos meses de investigación, la mayor representación de muestras fue de melón, ya que la temporada alta de cosecha para esta fruta comprende los meses entre febrero y mayo.

En ninguna de las muestras se logró aislar Escherichia coli O157:H7 para su identificación (ver tablas 13 y 14). Por consiguiente, la hipótesis planteada para ésta investigación fue rechazada.

## 9. Discusión de resultados

Las primeras siembras fueron hechas solamente con cepas ATCC hasta lograr obtener el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de dicha bacteria, encontrando los mayores problemas en las mediciones tan pequeñas de suplementos para el medio, entre ellos cefixime, cefsulodin, vancomicina y telurito de potasio, así como la optimización del medio enriquecedor para el crecimiento de E. coli enterohemorrágica ( EEB ), que es uno de los pasos más importantes en la marcha bacteriológica para obtener un buen aislamiento de colonias sobre el medio selectivo. Las muestras con mayor facilidad de homogenización en el EEB fueron las fresas, moras y frambuesas, que demostraron ser las que mejor desarrollaban crecimiento microbiano comprobado a través de la evaluación visual de los frascos durante cada hora por un periodo de 6 horas, logrando un cambio de coloración del EEB de morado intenso a amarillo más rápidamente que las muestras de brócoli, melón y piña que por lo general no se lograban triturar bien ( menos área de contacto entre la muestra y el EEB ).

Del total de 223 muestras cultivadas sobre MacConkey-Sorbitol solamente dos muestras, una de melón y una de piña, presentaron colonias sospechosas y características de E. coli O157:H7 al observar en las cajas post-incubación, colonias incoloras y con centro ahumado. Estas fueron trasladadas a tubos con Plate Count Agar enriquecido con extracto de levadura ( para favorecer el crecimiento de colonias ) a partir de los cuales se hizo la prueba con indol ( positiva para ambas ) y posterior aglutinación con anti H7 y anti O157, resultando negativa la prueba para ambas muestras. Esto hace pensar que alguna cepa de Escherichia coli resistente a la congelación estaba presente, la cual probablemente pertenecía a un serotipo distinto al del estudio.

Como se puede observar en las tablas No. 1 a la 12, el seguimiento microbiológico dado a las muestras fue completo, ya que se les efectuó recuento total, recuento de coliformes, presencia de E. coli y E. coli O157:H7 con el propósito de relacionar los resultados obtenidos entre si, ésto para establecer si las muestras con recuento alto de coliformes estarían mayormente predisuestas a presentar E. coli como indicador de contaminación fecal y por consiguiente que existiera la posibilidad de que entre ellas se

encontrara alguna cepa de E. coli O157:H7, sin embargo para este estudio no se encontró ninguna correlación con significancia estadística, ya que el tipo de alimento analizado, por haber sufrido un proceso físico de preservación como lo es la congelación, no es tan propenso a presentar éste tipo de contaminación como otros alimentos, por ejemplo las carnes y embutidos ( 1 ).

La mayoría de muestras con altos recuentos totales, generalmente poseían elevados recuentos de coliformes, pero no necesariamente presentaban E. coli sino que otro tipo de enteropatógeno, entre ellos Enterobacter sp. en 1 muestra ( 0.45% ), Serratia sp. en 1 muestra ( 0.45% ), Yersinia sp. en 23 muestras ( 10.31% ) y Citrobacter sp. en 24 muestras (10.76%). Estos datos indican que solamente el 78.03% de la totalidad de las muestras estaban realmente contaminadas con E. coli. La identificación de enteropatógenos se realizó a través de reacciones bioquímicas llevadas a cabo en el laboratorio.

Generalmente este tipo de contaminación se da cuando los procedimientos de sanitización no son efectivos, fallando tanto en la aplicación como en la dosificación de los químicos sobre las superficies que tienen contacto con el producto. Además, si la carga bacteriana de la materia prima es demasiado grande, el procedimiento de blanqueado no llega a ser suficiente para eliminar por completo la población microbiana que puede contener cepas resistentes a la congelación y mantenerse latentes en el producto terminado. Otro motivo que suele incrementar los recuentos bacterianos en el producto final es la manipulación inadecuada de los mismos, principalmente en el momento de la selección de producto terminado para su posterior empaque. He aquí la importancia de dar a conocer al personal de planta las buenas prácticas de manufactura.

Al comparar el número de muestras obtenido durante el primer mes (marzo) contra el segundo (abril), se observó que la presencia de E. coli disminuyó en el brócoli, en la mora y en la frambuesa (ver tabla No. 13). Esto no sucedió por mejoras en procedimientos de sanitización internos ni por cambio de proveedor de materia prima, sino que son productos en declive de cosecha y por tanto la producción de los mismos se ve reducida en las plantas congeladoras. Caso contrario sucedió con el melón, la piña y las fresas, en donde el número de muestras fue mayor en abril que en marzo debido a que su pico de cosecha es próximo a este mes y los pedidos de congelado de estas frutas son mayores. Por

tanto, no es que durante el mes de abril haya disminuido la presencia de E. coli en la producción de congelados sino que la cantidad de muestras de algunos productos, como el brócoli, las moras y las frambuesas, disminuyeron al reducirse la producción de los mismos. No son datos significativamente estadísticos desde el momento en que no se efectuaron recuentos de E. coli sino que el método de identificación fue presencia/ausencia.

Con respecto al rechazo de la hipótesis propuesta para esta investigación, científicamente este estudio no logró su objetivo, ya que uno de los propósitos era identificar E. coli O157:H7 en frutas y vegetales congelados ( ver tabla No.14 ). Desde el punto de vista industrial y de la salud, es una ventaja no haberla encontrado, pues se tiene la certeza que dicho producto no fue nocivo para la salud del consumidor ni fue rechazado por las autoridades salubristas de los países a donde este producto fue exportado, pues cumplió con todos los parámetros de calidad microbiológica entre los cuales se encuentra la ausencia total de E. coli O157:H7.

Es importante hacer notar que si el muestreo se hubiese ampliado para cada tipo de producto, o bien el diseño estadístico fuese planteado en base a probabilidades con un número de muestra definido, los datos recolectados al final habrían proporcionado información más enriquecedora de la que se presenta en esta oportunidad. Además, si la investigación se hubiese centralizado en uno o dos tipos de productos como máximo, y no en seis como en este caso, el número de muestras analizadas para cada uno habría sido mayor y por consiguiente se habría incrementado la probabilidad de encontrar algún caso positivo.

## 10. Conclusiones

- El recuento elevado de coliformes en una muestra de fruta o verdura congelada no fue indicativo de la presencia de E. coli ni se relacionó con la presencia de E. coli O157:H7 en el presente estudio.
- El incremento de muestras de marzo para abril de melón, piña y fresas fue consecuencia de la proximidad a la temporada alta de cosecha y producción del congelado de las mismas.
- La disminución de muestras entre marzo y abril de brócoli, mora y frambuesas se debió al término de la temporada de cosecha y no a mejoras en procedimientos de sanitización internos durante la producción.
- Enteropatógenos distintos a E. coli, como Serratia sp. Citrobacter sp. Yersinia sp. y Enterobacter sp. fueron identificados en 49 de las 223 muestras analizadas.
- En ninguna de las muestras de frutas y verduras congeladas analizadas durante marzo y abril se identificó Escherichia coli O157:H7, razón por la cual se rechaza la hipótesis propuesta para la presente investigación.

## 11. Recomendaciones

- No prescindir de la utilización del Enriquecedor para el crecimiento de E. coli enterohemorrágica (EEB) durante la marcha para la identificación de este microorganismo, ya que su uso garantiza la obtención de suficientes Unidades Formadoras de Colonias ( UFC's ) sobre el medio MacConkey-Sorbitol si es que la bacteria estuviese presente en la muestra.
- Utilizar cantidades exactas de aditivos, como Cefixima, Vancomicina y Telurito de potasio, tanto en el enriquecedor para el crecimiento de E. coli enterohemorrágica (EEB) como para el medio de cultivo MacConkey Sorbitol, ya que su escasez o excesividad pueden producir alteración en el crecimiento bacteriano.
- Los complementos agregados al medio de cultivo MacConkey Sorbitol, tales como Cefixima y Telurito de potasio deben ser medidos cuantitativa y volumétricamente con equipo calibrado, ya que una medición menor o mayor de los mismos pueden inhibir el crecimiento de E. coli O157:H7 sobre el medio.
- Una colonia que presente todas las características morfológicas y bioquímicas compatibles con E. coli O157:H7 pero que no aglutine con alguno de los antisueros látex, debe ser analizada con una técnica más específica de identificación como lo es PCR, ya que puede tratarse de algún otro serotipo de E. coli que sintetize verotoxina .
- Evitar el uso de medios de cultivo, complementos y antisueros vencidos, ya que esto provoca falsos-positivos o falsos-negativos en los resultados.
- Utilizar cepas ATCC como controles de calidad, tanto en las siembras como en la aglutinación con los antisueros látex.

- En estudios de este tipo, siempre mantener comunicación con alguna entidad que proporcione apoyo diagnóstico, ya que muchas veces la confirmación de cepas debe hacerse a través de técnicas más sofisticadas y confiables que las proporcionadas por casas comerciales.
- En investigaciones posteriores y similares a esta, utilizar un diseño estadístico basado en probabilidades con un número de muestra definido, enfatizando el mismo en uno o dos productos a la vez, con el fin de obtener mayor información sobre las muestras y el comportamiento de la bacteria según sea el caso a analizar.

## 12. Referencias bibliográficas

1. Feng P. Escherichia coli serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Synopsis, US Food and Drug Administration US FDA, Washington DC, USA, Doc. Tec. No.1, 1996. 11p. ( p. 1-9).
2. Jawetz D. Microbiología Clínica. 7 ed. Argentina: Editorial Interamericana, 1988. 617p. ( p. 311-329 ).
3. Brown J et al. Acid habituation of Escherichia coli and the potential role of cyclopropane and fatty acids in low pH tolerance. Int J Food Microbiol 1997;1:1-4.
4. Desrosier NW. Conservación de alimentos. 2 ed. México. Compañía Editorial Continental, S.A., 1995. 259p. (p. 123-157).
5. Goodson M, Rowbury RJ. Resistance of acid-habituated Escherichia coli to organic acid and its medical and applied significance. Letters in Appl Microbiol 1989;8:211.
6. Lund BM. Bacterial spoilage; Post-harvest pathology of fruits and vegetables. London Academic Press 1983; p. 219-220.
7. Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of Escherichia coli O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. J Food Prot 1994;57:629-631.
8. FDA, Bacteriological Analytical Manual. 8. Ed. Estados Unidos de América, 1995. 1080p.(p. 420-426).
9. Brinton M, Miller K, Litsky W. Industrial Microbiology. Estados Unidos de América. Harrison, 1976. 411p. (p. 296-297).
10. Abdoul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. Survival and growth of Escherichia coli O157:H7 on salad vegetables. Appl Environ Microbiol 1993;59:1999-2006.
11. Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. Factors affecting the efficiency of washing procedures used in the production of prepared salads. Food Microbiol 1989;6:69-77.
12. Bettelheim K, Thomas G. E. coli as Pathogens. Synopsis, 3<sup>rd</sup>. International Symposium and Workshop on Shiga toxin producing Escherichia coli Infections at University of Birmingham 1997;1:1-2.

13. Sánchez N. Escherichia coli O157:H7, aspectos generales. Unidad de análisis y tendencias de salud. Cuba: Ministerio de Salud Pública. 1997. 2p.
14. Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. Diagnóstico clínico y Tratamiento. 33 ed. México D.F.: Editorial Manual Moderno, 1998. 1613p. (p. 537-538).
15. Padhye NV, Doyle MP. Escherichia coli O157:H7 : Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Protec* 1992;55:555-565.
16. Cimolai N et al. Risk factors for the progression of E. coli O157:H7 enteritis to hemolytic syndrome. *J pediatric* 1990;116:589-592.
17. Thacker SB, Hughes JM. CDC Vessel Sanitation Program. Advisory letter on preventing foodborne disease outbreaks on cruise ships. *EUA, Doc. Tec.*, 1994:1-3.
18. Morgan D et al. Verotoxin producing Escherichia coli O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* 1993;111:181-187.
19. NCID Home Page. Escherichia coli O157:H7 outbreak in Japan. Report of Division of bacterial and mycotic diseases home page. *EUA, Doc. Tec.*, 1996;6:1.
20. Oliver D, Atwill ER. Research and reason can minimize foodborne and waterborne illnesses. *California Agricul* 1997;2:9-13.
21. Maurice J. The rise and rise of food poisoning. *New Scient* 1994;144:28-33.
22. Division of bacterial and mycotic diseases. Preventing Foodborne Illness: E. coli O157:H7. National Center for Infectious Diseases. Centers for Diseases Control and Prevention. *EUA, Doc. Tec.*, 1997;1-6.
23. Menchú Rosal DE. Evaluación de la calidad microbiológica de los alimentos vendidos en la vía pública, en áreas de venta callejera del departamento de Guatemala, consideradas como riesgo por el departamento de Registro y Control de alimentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996. 6:20-35 p.
24. Endo YK et al. Site of action of a verotoxin from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga-like toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur J Biochem* 1988;171:45-50.
25. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986;5:869-872.

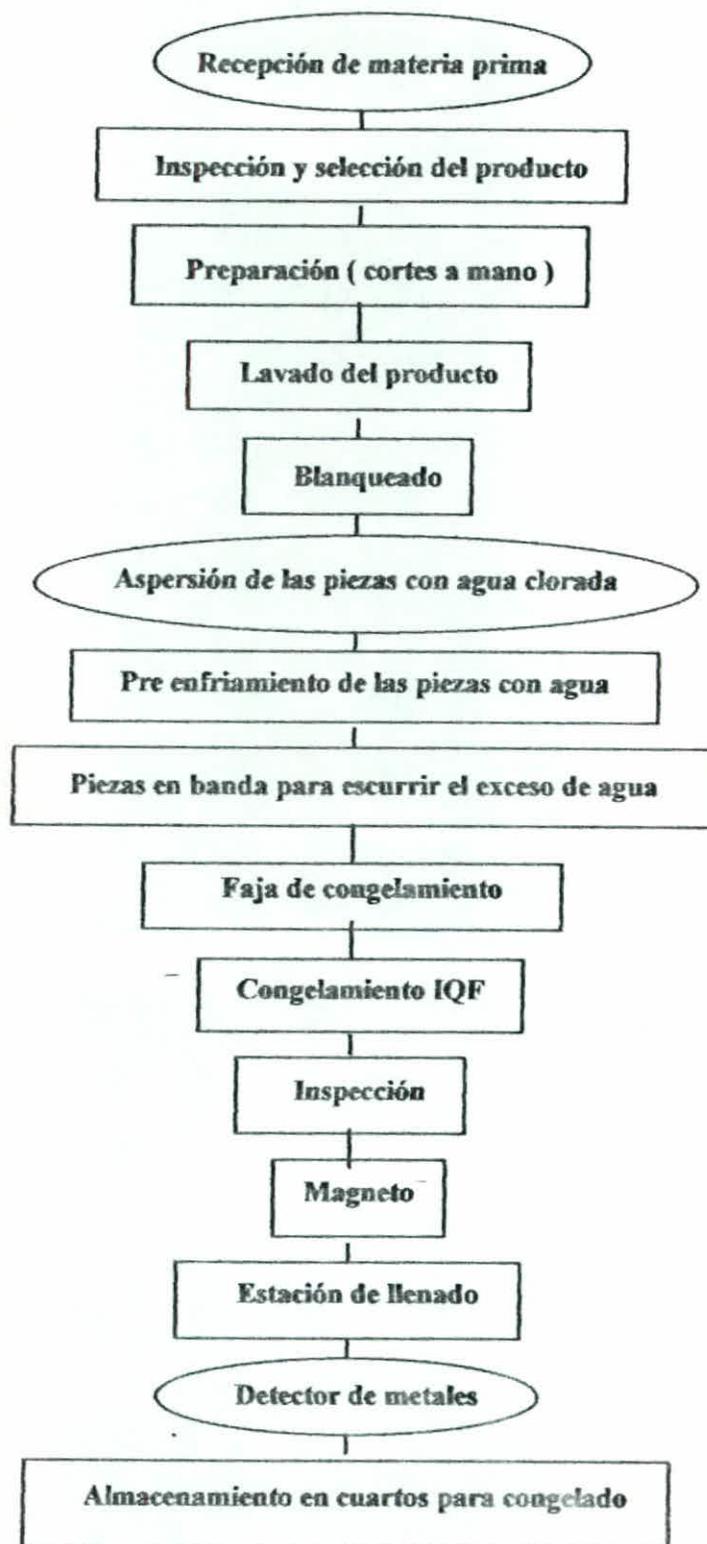
26. Harrigan WF. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Inglaterra: London Academic Press, 1976. 428p. (p. 210-214).
27. Chapman PA et al. An improved selective medium for the isolation of Escherichia coli O157. J Med Microbiol 1991;35:107-110.
28. Board RG, Lovelock DW. Some methods for microbiological assay. The society for applied bacteriology technical. Londres, Doc. Tec., 1975;5:97-99.
29. Speck ML. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, USA. APHA Intersociety Agency Committee on microbiological methods for foods, American Public Health Association, INC. Doc. Tec. No.1., 1976. 968p. (p. 277-298;556-561).
30. Szabo RA, Todd EC, Jean A. Method to isolate Escherichia coli O157:H7 from food. J Food Protec 1986;49:768-772.
31. Farmer JJ, Davis B. H7 Antiserum-Sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1985;10:620-25.
32. Deitrich WC, Feinberg B. Fundamentals of Food Freezing. CA, Estados Unidos de América: AVI Publishing Co, 1981. 337p. (p. 81-133).
33. Reid DS. Optimizing the Quality of Frozen Foods. Food Tech 1990;6:78-82.
34. Mazollier J. Ivé gamme. Lavage-desinfection des salades. Infros-Crifl 1988;41:19.
35. Tucker CG. The freeze-drying of vegetables and fruit. Food Tech 1958;1:111-119.
36. Beuchat LR, Ryu JH. Produce, handling and processing practices. Emerg Infect Dis 1997;1-3.
37. Potter NN. La ciencia de los alimentos. 2 ed. México. Editorial Harla, 1978. 741p. (p. 203-261;537-571).
38. Eckert JW, Ogawa JM. The chemical control of postharvest diseases; deciduous fruits, berries, vegetables and root/tubers crops. Annu Rev Phytopathol 1988;26:433-63.
39. Gould GW, Shapton DA. Isolation methods for microbiologists; the society for applied bacteriology technical. London Academic Press. Doc. Tec., 1969. 196p. (p.127-134).
40. McMeekin TA et al. Quantitative Microbiology: A basis for food safety. Emerg Infect Dis 1997;3:1-4.

41. Board RG, Lovelock DW. Sampling - microbiological monitoring of environments. The society for applied bacteriology technical series No.7. 2 ed. Londres. Academic Press 1975. 510p. (p. 246-250).
42. Garfield FM. Sampling in the analytical scheme. *J Assoc Official and Analyt Chem* 1989;72:405.
43. Steiner EH. Statistical Methods in Quality Control. *Quality Control in the Food Industry* 1984;169-298.

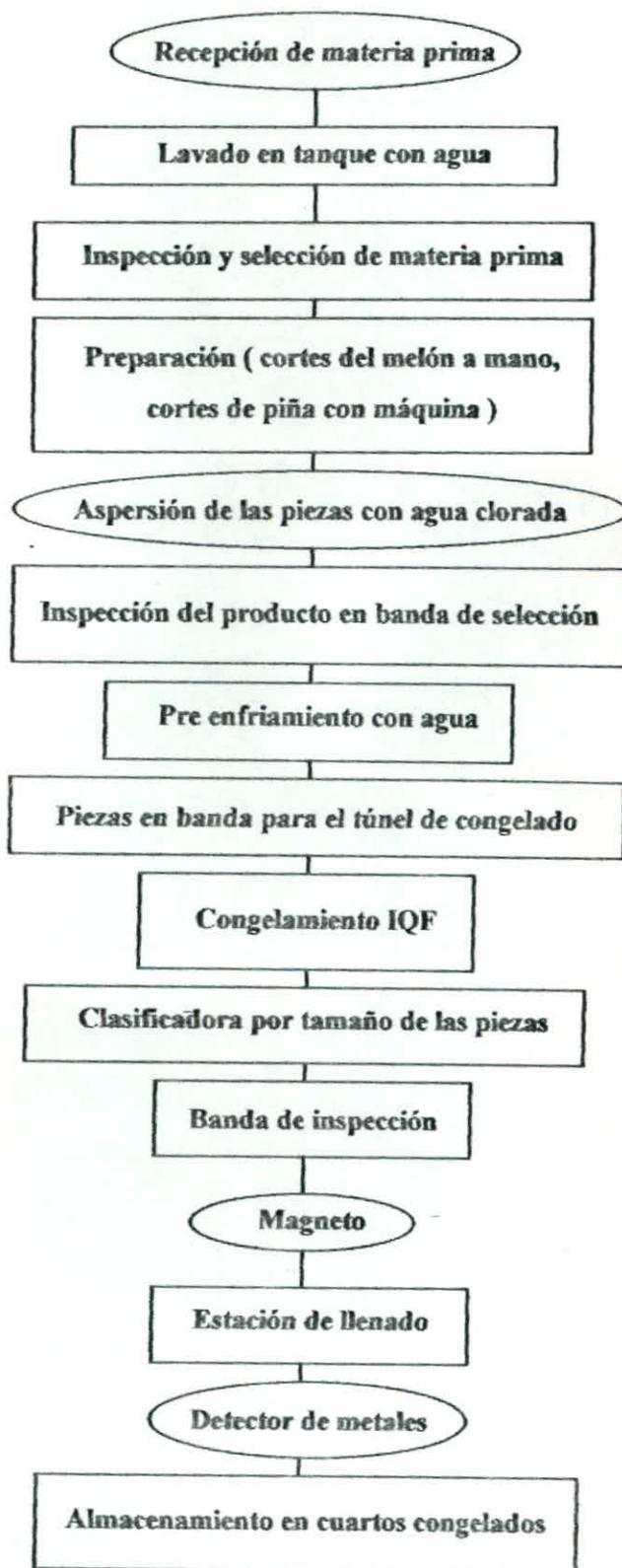
**13. ANEXOS**

## Anexo A-1.

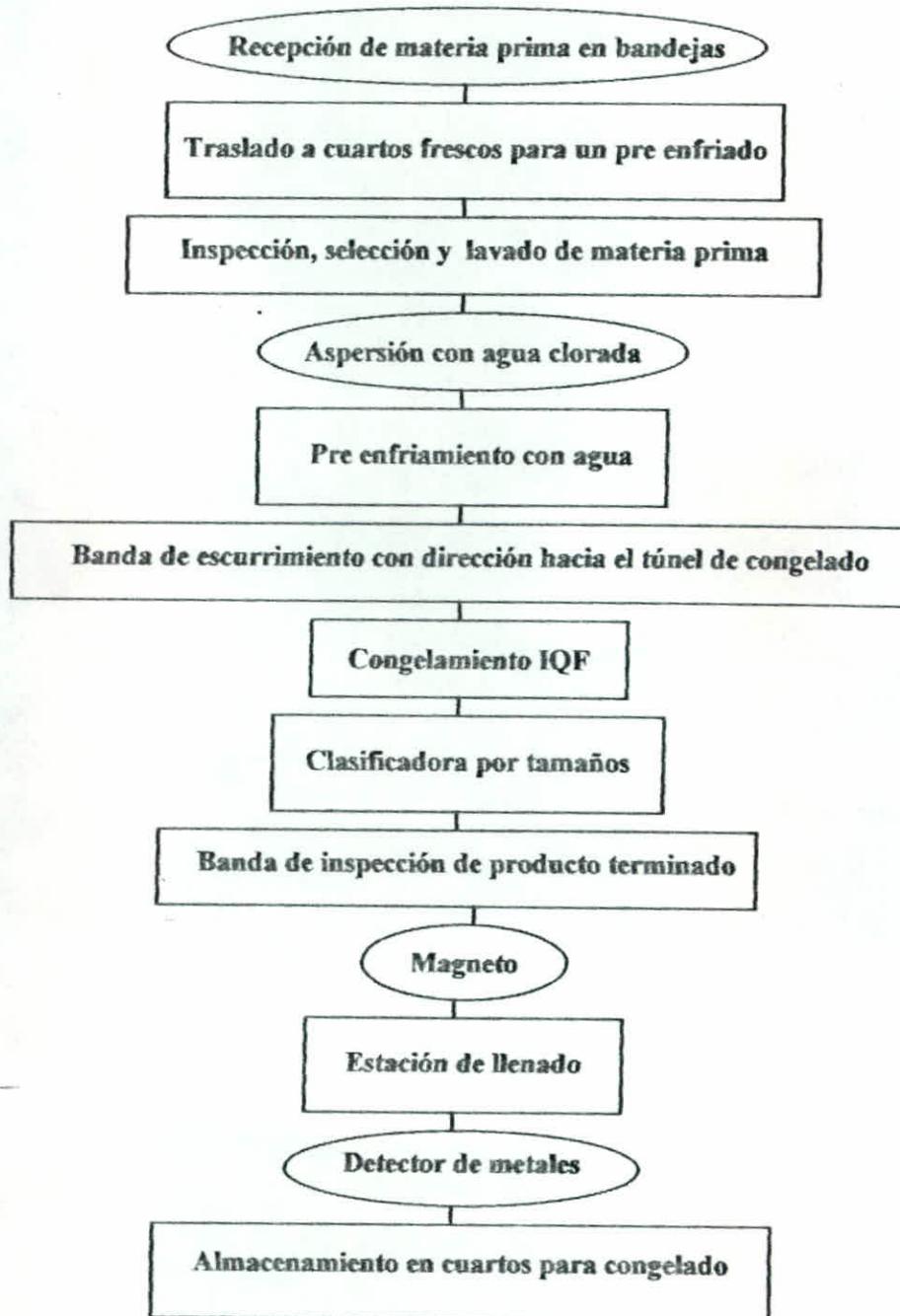
## Esquema del congelado para brócoli



### Esquema del congelado para melón y piña



## Esquema del congelado para fresas, moras y frambuesas



### Anexo A-2.

Esquema del registro utilizado para recopilar información de tesis

No. de muestra	Fecha de producción	Fecha de análisis	Descripción de la muestra	Recuento total	Recuento de coliformes	E. coli	E. coli O157: H7

### Anexo A-3.

Esquema del registro de control de calidad de ambientes

Fecha de análisis	Tiempo de exposición	Recuento total	Recuento de coliformes	E. coli

### Anexo A-4

Cepas ATCC utilizadas como referencia en la interpretación de cultivos

Cepa	Descripción morfológica en cultivo sobre Agar MacConkey-Sorbitol	Pruebas bioquímicas de control
<u>E. coli</u> O157:H7 ATCC # 35150	Colonias pequeñas, con un color rosado grisáceo, ahumadas o con centro gris. Medianamente mucoides. Con bordes bien definidos.	Indol Positivo. Test Anti O157 Látex + Test Anti H7 Látex +
<u>P. vulgaris</u> ( cultivo secundario)	Colonias medianas, color rosado pálido; centro negro por producción de H <sub>2</sub> S.	Indol Negativo.

Tabla #1. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de brócoli analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Brócoli en flor	4000	4000	Positivo **	Negativo
2	Brócoli en flor	64000	45000	Positivo **	Negativo
3	Brócoli en cubos	44000	32000	Positivo **	Negativo
4	Brócoli en flor	60000	40000	Positivo	Negativo
5	Brócoli en cubos	11000	7000	Positivo	Negativo
6	Brócoli en flor	48000	42000	Positivo **	Negativo
7	Brócoli en flor	36000	16000	Positivo **	Negativo
8	Brócoli en flor	2000	1000	Positivo	Negativo
9	Brócoli en flor	12000	80000	Positivo	Negativo
10	Brócoli en flor	3000	3000	Positivo	Negativo
11	Brócoli en flor	7000	2000	Positivo	Negativo
12	Brócoli en flor	35000	7000	Positivo	Negativo
13	Brócoli en flor	7000	1000	Positivo **	Negativo
14	Brócoli en flor	3000	1000	Positivo **	Negativo
15	Brócoli en cubos	16000	7000	Positivo **	Negativo
16	Brócoli en flor	8000	5000	Positivo **	Negativo
17	Brócoli en flor	16000	9000	Positivo **	Negativo
18	Brócoli en flor	11000	8000	Positivo	Negativo
19	Brócoli en flor	5000	2000	Positivo **	Negativo
20	Brócoli en flor	37000	20000	Positivo **	Negativo
21	Brócoli en cubos	29000	22000	Positivo **	Negativo
22	Brócoli en cubos	16000	13000	Positivo	Negativo
23	Brócoli en flor	6000	5000	Positivo	Negativo
24	Brócoli en flor	5000	2000	Positivo **	Negativo
25	Brócoli en flor	1000	1000	Positivo **	Negativo
26	Brócoli en flor	10000	8000	Positivo **	Negativo
27	Brócoli en flor	14000	10000	Positivo **	Negativo
28	Brócoli en cubos	7000	5000	Positivo **	Negativo
29	Brócoli en flor	9000	3000	Positivo **	Negativo
30	Brócoli en flor	11000	5000	Positivo **	Negativo
31	Brócoli en flor	2000	1000	Positivo **	Negativo
32	Brócoli en flor	3000	1000	Positivo	Negativo
33	Brócoli en flor	11000	3000	Positivo **	Negativo
34	Brócoli en flor	15000	5000	Positivo **	Negativo
35	Brócoli en flor	6000	1000	Positivo **	Negativo
36	Brócoli en flor	5000	2000	Positivo **	Negativo
37	Brócoli en flor	1000	1000	Positivo	Negativo
38	Brócoli en flor	3000	1000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromococult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

**Tabla #2.** Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de brócoli analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Brócoli en flor	3000	1000	Positivo **	Negativo
2	Brócoli en flor	4000	1000	Positivo **	Negativo
3	Brócoli en flor	11000	8000	Positivo	Negativo
4	Brócoli en flor	8000	5000	Positivo **	Negativo
5	Brócoli en flor	15000	8000	Positivo	Negativo
6	Brócoli en flor	10000	9000	Positivo **	Negativo
7	Brócoli en flor	6000	5000	Positivo	Negativo
8	Brócoli en flor	2000	1000	Positivo **	Negativo
9	Brócoli en flor	2000	2000	Positivo **	Negativo
10	Brócoli en flor	3000	2000	Positivo **	Negativo
11	Brócoli en flor	9000	5000	Positivo **	Negativo
12	Brócoli en flor	1000	1000	Positivo **	Negativo
13	Brócoli en flor	12000	8000	Positivo**	Negativo
14	Brócoli en flor	1000	1000	Positivo	Negativo
15	Brócoli en flor	11000	7000	Positivo **	Negativo
16	Brócoli en flor	16000	12000	Positivo **	Negativo
17	Brócoli en flor	14000	10000	Positivo	Negativo
18	Brócoli en cubos	9000	7000	Positivo **	Negativo
19	Brócoli en flor	1000	1000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

**Tabla #3.** Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de mora analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Mora IQF	12000	10000	Positivo **	Negativo
2	Mora IQF	100	100	Positivo **	Negativo
3	Mora Block	1000	700	Positivo	Negativo
4	Mora IQF	6000	3000	Positivo **	Negativo
5	Mora IQF	5000	3000	Positivo **	Negativo
6	Mora IQF	9000	8000	Positivo **	Negativo
7	Mora IQF	13000	10000	Positivo	Negativo
8	Mora IQF	6000	5000	Positivo **	Negativo
9	Mora IQF	1000	1000	Positivo **	Negativo
10	Mora Block	20000	16000	Positivo **	Negativo
11	Mora IQF	15000	10000	Positivo **	Negativo
12	Mora IQF	2000	2000	Positivo	Negativo
13	Mora IQF	7000	2000	Positivo **	Negativo
14	Mora IQF	2000	1000	Positivo **	Negativo

- \* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocoult  
 \*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #4. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de mora analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Mora IQF	9000	2000	Positivo **	Negativo
2	Mora IQF	10000	2000	Positivo	Negativo
3	Mora IQF	15000	6000	Positivo **	Negativo
4	Mora IQF	5000	1000	Positivo **	Negativo
5	Mora IQF	2000	1000	Positivo	Negativo
6	Mora Block	11000	7000	Positivo **	Negativo
7	Mora Block	8000	2000	Positivo **	Negativo
8	Mora IQF	2000	1000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromococult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

**Tabla #5.** Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de fresa analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Fresa IQF	25000	20000	Positivo **	Negativo
2	Fresa IQF	16000	5000	Positivo	Negativo
3	Fresa IQF	18000	4000	Positivo	Negativo
4	Fresa IQF	14000	3000	Positivo **	Negativo
5	Fresa IQF	20000	8000	Positivo	Negativo
6	Fresa IQF	11000	6000	Positivo **	Negativo
7	Fresa IQF	3000	1000	Positivo **	Negativo
8	Fresa IQF	9000	2000	Positivo **	Negativo
9	Fresa IQF	10000	2000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #6. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de fresa analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Fresa IQF	25000	20000	Positivo **	Negativo
2	Fresa IQF	16000	5000	Positivo **	Negativo
3	Fresa IQF	18000	4000	Positivo **	Negativo
4	Fresa IQF	14000	3000	Positivo **	Negativo
5	Fresa IQF	20000	8000	Positivo	Negativo
6	Fresa IQF	11000	6000	Positivo	Negativo
7	Fresa IQF	3000	1000	Positivo **	Negativo
8	Fresa IQF	9000	2000	Positivo **	Negativo
9	Fresa IQF	10000	2000	Positivo **	Negativo
10	Fresa IQF	9000	1000	Positivo **	Negativo
11	Fresa IQF	6000	2000	Positivo **	Negativo
12	Fresa IQF	16000	6000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #7. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de frambuesa analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Frambuesa IQF	700	500	Positivo **	Negativo
2	Frambuesa block	900	300	Positivo **	Negativo
3	Frambuesa IQF	1000	600	Positivo	Negativo
4	Frambuesa IQF	5000	1000	Positivo **	Negativo
5	Frambuesa IQF	3000	1000	Positivo **	Negativo
6	Frambuesa IQF	5000	2000	Positivo **	Negativo
7	Frambuesa block	6000	5000	Positivo **	Negativo
8	Frambuesa IQF	1000	1000	Positivo **	Negativo
9	Frambuesa IQF	8000	2000	Positivo **	Negativo
10	Frambuesa IQF	5000	3000	Positivo	Negativo
11	Frambuesa block	11000	5000	Positivo **	Negativo
12	Frambuesa IQF	1000	1000	Positivo **	Negativo
13	Frambuesa IQF	3000	1000	Positivo **	Negativo
14	Frambuesa block	16000	6000	Positivo	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

**Tabla #8.** Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de frambuesa analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Frambuesa IQF	700	500	Positivo **	Negativo
2	Frambuesa IQF	900	300	Positivo **	Negativo
3	Frambuesa IQF	1000	600	Positivo	Negativo
4	Frambuesa IQF	5000	1000	Positivo	Negativo
5	Frambuesa block	3000	1000	Positivo	Negativo
6	Frambuesa IQF	5000	2000	Positivo **	Negativo
7	Frambuesa IQF	6000	5000	Positivo **	Negativo
8	Frambuesa IQF	9000	8000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #9. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de piña analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Piña cubos pequeños	2000	2000	Positivo **	Negativo
2	Piña cubos grandes	100000	100000	Positivo **	Negativo
3	Piña cubos grandes	5000	5000	Positivo **	Negativo
4	Piña cubos grandes	190000	120000	Positivo	Negativo
5	Piña cubos pequeños	1400000	800000	Positivo	Negativo
6	Piña cubos pequeños	30000	20000	Positivo **	Negativo
7	Piña cubos pequeños	55000	30000	Positivo **	Negativo
8	Piña cubos grandes	9000	1000	Positivo **	Negativo
9	Piña cubos grandes	17000	6000	Positivo **	Negativo
10	Piña cubos grandes	18000	5000	Positivo **	Negativo
11	Piña cubos pequeños	37000	16000	Positivo **	Negativo
12	Piña cubos pequeños	66000	45000	Positivo	Negativo
13	Piña cubos grandes	81000	60000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromococult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #10. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de piña analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Piña cubos pequeños	9000	8000	Positivo **	Negativo
2	Piña cubos grandes	58000	50000	Positivo **	Negativo
3	Piña cubos grandes	16000	10000	Positivo **	Negativo
4	Piña cubos grandes	29000	22000	Positivo **	Negativo
5	Piña cubos grandes	75000	60000	Positivo	Negativo
6	Piña cubos pequeños	60000	50000	Positivo **	Negativo
7	Piña cubos grandes	50000	45000	Positivo **	Negativo
8	Piña cubos grandes	65000	50000	Positivo **	Negativo
9	Piña cubos pequeños	28000	20000	Positivo **	Negativo
10	Piña cubos grandes	15000	10000	Positivo	Negativo
11	Piña cubos grandes	10000	9000	Positivo	Negativo
12	Piña cubos grandes	21000	18000	Positivo **	Negativo
13	Piña cubos grandes	10000	4000	Positivo **	Negativo
14	Piña cubos grandes	12000	5000	Positivo	Negativo
15	Piña cubos grandes	7000	3000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #11. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de melón analizadas durante el primer mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Melón Cantaloupe bolas	35000	12000	Positivo **	Negativo
2	Melón Cantaloupe bolas	22000	16000	Positivo **	Negativo
3	Melón Cantaloupe bolas	15000	7000	Positivo **	Negativo
4	Melón Honey Dew bolas	27000	20000	Positivo **	Negativo
5	Melón Cantaloupe cubos	21000	11000	Positivo **	Negativo
6	Melón Cantaloupe bolas	11000	6000	Positivo **	Negativo
7	Melón Cantaloupe bolas	16000	9000	Positivo	Negativo
8	Melón Cantaloupe bolas	7000	1000	Positivo **	Negativo
9	Melón Cantaloupe cubos	6000	1000	Positivo	Negativo
10	Melón Cantaloupe cubos	8000	2000	Positivo **	Negativo
11	Melón Cantaloupe bolas	13000	4000	Positivo **	Negativo
12	Melón Cantaloupe bolas	22000	6000	Positivo **	Negativo
13	Melón Cantaloupe bolas	24000	9000	Positivo	Negativo
14	Melón Cantaloupe cubos	6000	5000	Positivo **	Negativo
15	Melón Cantaloupe bolas	9000	1000	Positivo **	Negativo
16	Melón Cantaloupe bolas	1000	1000	Positivo **	Negativo
17	Melón Cantaloupe bolas	18000	1000	Positivo **	Negativo
18	Melón Honey Dew bolas	15000	9000	Positivo **	Negativo
19	Melón Honey Dew bolas	12000	6000	Positivo **	Negativo
20	Melón Honey Dew bolas	5000	2000	Positivo **	Negativo
21	Melón Cantaloupe bolas	3000	2000	Positivo **	Negativo
22	Melón Honey Dew bolas	13000	6000	Positivo **	Negativo
23	Melón Honey Dew bolas	5000	2000	Positivo **	Negativo
24	Melón Honey Dew bolas	10000	1000	Positivo **	Negativo
25	Melón Cantaloupe bolas	19000	11000	Positivo **	Negativo
26	Melón Cantaloupe bolas	15000	6000	Positivo **	Negativo
27	Melón Cantaloupe cubos	26000	20000	Positivo **	Negativo
28	Melón Cantaloupe cubos	35000	27000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

Tabla #12. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de melón analizadas durante el segundo mes de la investigación.

# de muestra	Descripción	Recuento Total Bacteriano (UFC/gr)	Recuento de coliformes (UFC/gr)	<i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i> O157:H7
1	Melón Cantaloupe bolas	35000	12000	Positivo **	Negativo
2	Melón Cantaloupe bolas	22000	16000	Positivo **	Negativo
3	Melón Cantaloupe bolas	15000	7000	Positivo **	Negativo
4	Melón Honey Dew bolas	27000	20000	Positivo **	Negativo
5	Melón Cantaloupe cubos	21000	11000	Positivo **	Negativo
6	Melón Cantaloupe bolas	11000	6000	Positivo **	Negativo
7	Melón Cantaloupe bolas	16000	9000	Positivo **	Negativo
8	Melón Cantaloupe bolas	7000	1000	Positivo	Negativo
9	Melón Cantaloupe cubos	6000	1000	Positivo **	Negativo
10	Melón Cantaloupe cubos	8000	2000	Positivo **	Negativo
11	Melón Cantaloupe bolas	13000	4000	Positivo **	Negativo
12	Melón Cantaloupe bolas	22000	6000	Positivo **	Negativo
13	Melón Cantaloupe bolas	24000	9000	Positivo **	Negativo
14	Melón Cantaloupe cubos	6000	5000	Positivo **	Negativo
15	Melón Cantaloupe bolas	9000	1000	Positivo **	Negativo
16	Melón Cantaloupe bolas	1000	1000	Positivo **	Negativo
17	Melón Cantaloupe bolas	18000	1000	Positivo **	Negativo
18	Melón Honey Dew bolas	15000	9000	Positivo	Negativo
19	Melón Honey Dew bolas	12000	6000	Positivo **	Negativo
20	Melón Honey Dew bolas	5000	2000	Positivo **	Negativo
21	Melón Cantaloupe bolas	3000	2000	Positivo **	Negativo
22	Melón Cantaloupe cubos	20000	12000	Positivo **	Negativo
23	Melón Cantaloupe bolas	18000	10000	Positivo **	Negativo
24	Melón Cantaloupe bolas	17000	6000	Positivo **	Negativo
25	Melón Cantaloupe bolas	20000	11000	Positivo **	Negativo
26	Melón Honey Dew bolas	9000	2000	Positivo **	Negativo
27	Melón Honey Dew bolas	11000	3000	Positivo	Negativo
28	Melón Honey Dew bolas	6000	1000	Positivo **	Negativo
29	Melón Honey Dew bolas	10000	2000	Positivo **	Negativo
30	Melón Cantaloupe bolas	24000	16000	Positivo **	Negativo
31	Melón Honey Dew bolas	12000	1000	Positivo **	Negativo
32	Melón Cantaloupe bolas	19000	11000	Positivo **	Negativo
33	Melón Cantaloupe bolas	18000	10000	Positivo **	Negativo
34	Melón Honey Dew bolas	10000	5000	Positivo **	Negativo
35	Melón Honey Dew bolas	9000	6000	Positivo	Negativo
36	Melón Honey Dew bolas	16000	8000	Positivo	Negativo
37	Melón Honey Dew bolas	12000	5000	Positivo **	Negativo
38	Melón Cantaloupe bolas	9000	5000	Positivo **	Negativo
39	Melón Cantaloupe bolas	5000	3000	Positivo **	Negativo
40	Melón Honey Dew bolas	5000	1000	Positivo **	Negativo
41	Melón Cantaloupe bolas	14000	10000	Positivo	Negativo
42	Melón Honey Dew bolas	10000	2000	Positivo **	Negativo
43	Melón Honey Dew bolas	1000	1000	Positivo **	Negativo
44	Melón Honey Dew bolas	6000	2000	Positivo **	Negativo
45	Melón Cantaloupe bolas	15000	6000	Positivo **	Negativo

\* Presencia de colonias moradas presuntivas de *E. coli* en Agar Chromocult

\*\* *E. coli* positivo confirmado a través de reacciones bioquímicas

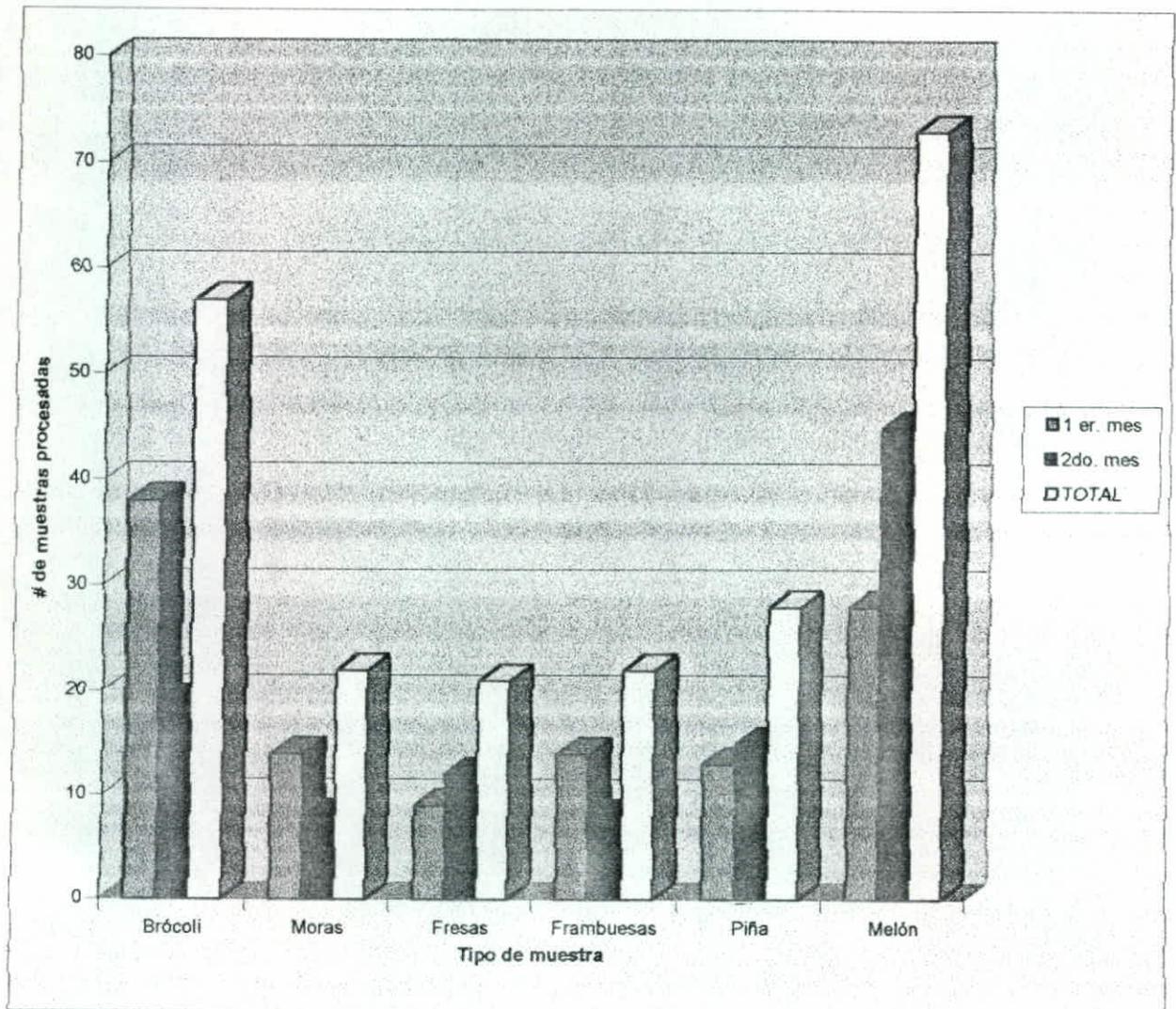
**Tabla # 13.** Presencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 en las muestras de frutas y verduras congeladas para exportación durante los meses de marzo y abril.

Tipo de muestra	1er. mes		2do. Mes		TOTAL	
	Muestras presentando		Muestras presentando		Muestras presentando	
	<i>E. coli.</i>	<i>E. coli.</i> O157:H7	<i>E. coli.</i>	<i>E. coli.</i> O157:H7	<i>E. coli.</i>	<i>E. coli.</i> O157:H7
Brócoli	38	0	19	0	57	0
Moras	14	0	8	0	22	0
Fresas	9	0	12	0	21	0
Frambuesas	14	0	8	0	22	0
Piña	13	0	15	0	28	0
Melón	28	0	45	0	73	0
<b>TOTAL</b>	<b>116</b>	<b>0</b>	<b>107</b>	<b>0</b>	<b>223</b>	<b>0</b>

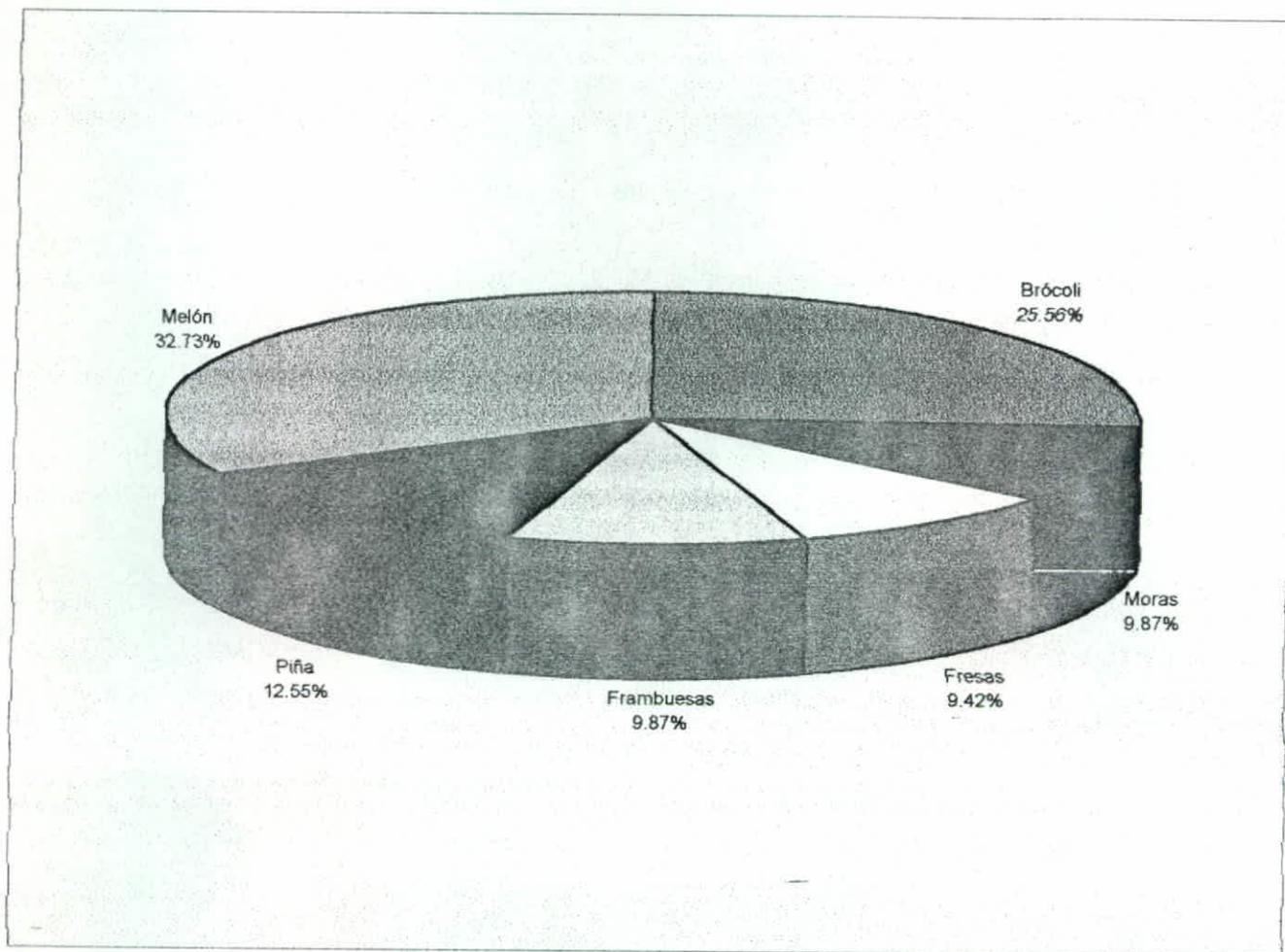
**Tabla # 14.** Porcentaje de muestras procesadas para la identificación de *E. coli* O157:H7 durante los meses de marzo y abril.

Tipo de muestra	Total de muestras procesadas	Representación porcentual de muestras	% de muestras positivas para <i>E. coli</i> O157:H7
Brócoli	57	25.56	0
Moras	22	9.87	0
Fresas	21	9.42	0
Frambuesas	22	9.87	0
Piña	28	12.55	0
Melón	73	32.73	0
<b>TOTAL</b>	<b>223</b>	<b>100</b>	<b>0</b>

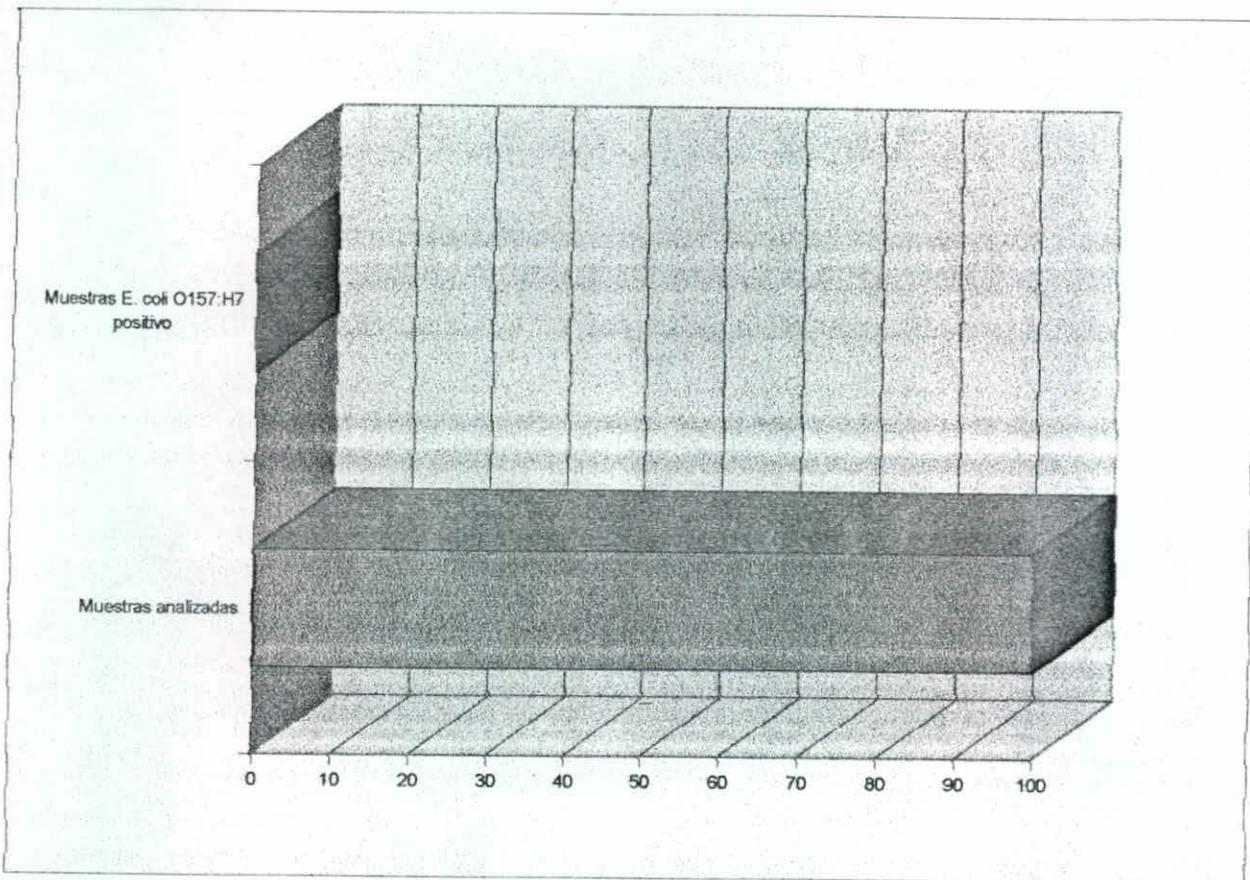
Gráfica # 13. Representación del número de muestras procesadas durante los dos meses en que se ejecutó la investigación de E. coli O157:H7 en frutas y verduras congeladas para exportación.



Gráfica # 14. Representación porcentual de muestras analizadas durante dos meses consecutivos para la identificación de E. coli. O157:H7 en frutas y verduras congeladas para exportación.



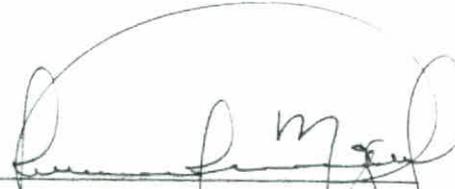
Gráfica #15. Representación porcentual de la identificación de E. coli O157:H7 en muestras de frutas y verduras congeladas para exportación, analizadas durante dos meses consecutivos.





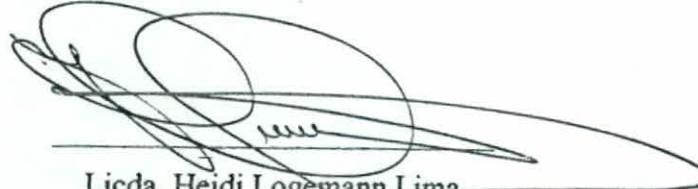
---

Nelly Beatriz Castañeda Rosales  
Tesisista



---

Licda. Florencia Moguel de Paniagua  
Asesor de tesis



---

Licda. Heidi Logemann Lima  
Directora



---

Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
Decana