



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo
Integral Regional Unidad Michoacán



PERFIL MICROBIANO DEL EPICARPIO DE AGUACATE (*Persea americana*, variedad Hass) ADQUIRIDO EN MERCADOS LOCALES DE GUADALAJARA, JALISCO

T E S I S

**QUE PARA OPTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

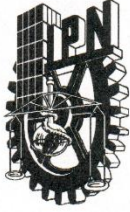
PRESENTA:

QFB. RAMÓN GARCÍA FRUTOS

DIRECTORES:

DR. JOSÉ LUIS MONTAÑEZ SOTO

DRA. NANCI EDID MARTÍNEZ GONZÁLES



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Perfil microbiano del epicarpio de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) adquirido en mercados locales de Guadalajara, Jalisco.

Presentada por el alumno:

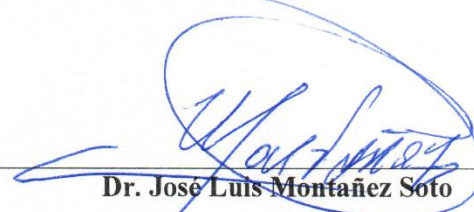
García	Frutos	Ramón
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre
Con registro:		
		B 1 6 1 2 6 6

aspirante de:

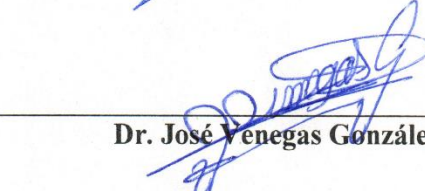
Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis



Dr. José Luis Montañez Soto



Dra. Nanci Edid Martínez Gonzáles


Dr. José Venegas González


Dra. Martha Alicia Velázquez Machuca


Dra. María Valentina Angoa Pérez


Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante.
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U. MICH.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 03 del mes diciembre del año 2018, el (la) que suscribe Ramón García Frutos alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B161266, adscrito a C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Luis Montañez Soto y Dra. Nanci Edid Martínez Gonzáles y cede los derechos del trabajo titulado Perfil microbiano del epicarpio de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) adquirido en mercados locales de Guadalajara, Jalisco al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ramongfru@hotmail.com m_nanci@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Ramón García Frutos

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Primero doy gracias a Dios por el hoy y por lo que soy ahora, sin Él yo no podría haber realizado este trabajo. Por cada momento que me ha permitido vivir, ya que todo ha sucedido en el preciso momento, en el lugar adecuado y con las personas indicadas.

A mi esposa Mayra, por su compañía, por todo el apoyo brindado día a día, su paciencia y motivación.

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y en la realización de mi maestría, sin su apoyo esto no sería posible. Gracias por ser mi ejemplo en el trabajo, responsabilidad y esfuerzo para lograr mis objetivos.

A la Dra. Nanci Edid Martínez Gonzáles, por brindarme la oportunidad de trabajar una vez más con ella, por su gran amistad, su apoyo, por confiar en mí para la realización de esta investigación. Por su arduo trabajo como mi directora de tesis, su interés en mi formación en la investigación, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencias y consejos para mejorar. Por ayudarme a explotar mis capacidades y a reconocerlas también. Por ser para mí, ejemplo perseverancia, empeño y dedicación en cada trabajo que realiza. Con gran admiración y respeto, gracias.

A la Dra. Liliana Martínez Chávez, por todo su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo de tesis y al igual que la Dra. Nanci, por darme la oportunidad de trabajar con usted una vez más. Por su tiempo para escucharme y brindarme sus consejos. Por su grata amistad y grandes experiencias compartidas.

Al Dr. José Luis Montañez Soto, por apoyarme en la realización de este trabajo, por aceptar ser mi director de tesis, por creer y confiar en mí y en mi trabajo como alumno de maestría.

A la Dra. Ma. del Rocío Ramírez Jiménez, por el apoyo brindado para que yo lograra completar esta etapa en mi desarrollo profesional. Por su amable y constante atención.

A los compañeros de servicio social y voluntarios del Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos del CUCEI, por su apoyo y amistad, sin su ayuda no habría sido posible la realización de todo el trabajo experimental de esta investigación.

A mis compañeros de la 12^a generación de la MCPAS, por la oportunidad de conocernos, por las experiencias compartidas y su apreciable amistad. Les deseo mucho éxito en su vida.

Gracias a Lupita, Becky y Eli Gómez, por su amable atención y colaboración en cada solicitud requerida durante mi estancia en el CIIDIR-Michoacán.

Al Instituto Politécnico Nacional, por permitirme ser parte de sus alumnos en CIIDIR-Michoacán. Por impulsar el desarrollo de sus estudiantes con estímulos en la participación de la difusión de la ciencia.

A la Benemérita Universidad de Guadalajara, ya que este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos, del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, U de G, bajo la dirección de la Dra. Nanci Edid Martínez González y el Dr. José Luis Montañez Soto. El proyecto fue auspiciado por el Programa de Fortalecimiento de la Investigación y Posgrado 2017, proyecto No. 237841, de la Universidad de Guadalajara y con la colaboración del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán del Instituto Politécnico Nacional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de maestría.

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”

Nelson Mandela

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cultivo de aguacate	3
2.2 Producción e impacto económico del aguacate	4
2.3 Sustentabilidad y producción de aguacate	6
2.4 Composición nutrimental y beneficios del consumo de aguacate	8
2.5 La inocuidad y el desarrollo sustentable	10
2.6 Inocuidad del aguacate y subproductos	11
2.6.1 El aguacate y subproductos como vehículo de microorganismos patógenos	11
2.6.2 Fuentes de microorganismos patógenos en el aguacate	16
2.6.3 Frecuencia de bacterias patógenas en el aguacate y subproductos	21
2.7 Supervivencia y crecimiento de bacterias patógenas en el aguacate y subproductos	22
2.8 Control de la contaminación del aguacate.....	24
2.8.1 La calidad del agua	24
2.8.2 Estiércol animal y fertilizantes orgánicos	24
2.8.3 Higiene de los trabajadores	25
2.8.4 Procesos sanitarios en el campo, las instalaciones	

y el transporte	25
2.8.5 Rastreo de origen de los frutos.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS	33
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
6.1 Obtención de las muestras	34
6.2 Determinación de <i>Salmonella</i> y recuento de grupos microbianos.....	34
6.3 Determinación de <i>Listeria</i> spp. e identificación de especies.....	36
6.4 Confirmación de <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> por PCR múltiple	37
6.4.1 Extracción de ADN de <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	37
6.4.2 PCR múltiple para <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	38
6.5 Serotipificación de <i>Salmonella</i>	39
6.6 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de <i>Salmonella</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	39
6.7 Manejo de datos	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1 Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacate Hass adquirido en mercados	42
7.2 Ocurrencia de <i>Salmonella</i> spp.	46
7.2.1 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de <i>Salmonella</i> sp.....	51
7.3 Ocurrencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	54
7.3.1 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de <i>L. monocytogenes</i>	59
8. CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fuentes de contaminación del aguacate.....	16
2	Distribución de recuentos para bacterias mesófilas aerobias (A), mohos y levaduras (B), <i>Enterobacteriaceae</i> (C), coliformes totales (D) y <i>Escherichia coli</i> (E) en el epicarpio de aguacates Hass adquiridos en mercados.....	44
3	Recuperación de cepas de <i>Salmonella</i> spp. naturalmente presentes en el epicarpio de aguacates Hass, de acuerdo con la ruta de aislamiento.....	49
4	Morfología de colonias de <i>Listeria</i> , sembradas por estría a partir de caldo Fraser después de 48 h de incubación. a) agar Oxford modificado (MOX), b) agar Oxford modificado adicionado con polimixina y ceftazidima (PCOM).....	57
5	Recuperación de cepas de <i>L. monocytogenes</i> naturalmente presentes en el epicarpio de aguacates Hass, de acuerdo con la ruta de aislamiento.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Producción de aguacate variedad Hass en México, 2017.....	5
2	Valor nutrimental por cada 100 g de pulpa de aguacate Hass.....	9
3	Brotos en Estados Unidos asociados al consumo de aguacate (2005-2016)	14
4	Fuentes ambientales de <i>Salmonella</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en huertas de aguacate.....	17
5	Antibióticos para la prueba de susceptibilidad de aislamientos de dos bacterias patógenas.....	40
6	Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacate Hass adquirido en mercados.....	42
7	Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacates Hass positivos a <i>Salmonella</i>	47
8	Perfil de susceptibilidad a antibióticos de <i>Salmonella</i> Bareilly aislada del epicarpio de aguacate Hass.	52
9	Resistencia múltiple a antibióticos de <i>Salmonella</i> Bareilly aislada del epicarpio de aguacates Hass.....	53
10	Distribución de <i>Listeria</i> spp. en el epicarpio de aguacates Hass.....	55
11	Multiplicidad de especies de <i>Listeria</i> en el epicarpio de aguacates Hass adquiridos en mercados.	55
12	Aislamientos de <i>Listeria</i> spp. de aguacates Hass vendidos en mercados, utilizando agar Oxford modificado (MOX) y Oxford modificado adicionado con polimixina y ceftazidima (PCOM).....	56
13	Perfil de susceptibilidad a antibióticos de <i>L. monocytogenes</i> aislada del epicarpio de aguacate Hass.....	60
14	Resistencia múltiple a antibióticos de <i>Listeria monocytogenes</i> aislada del epicarpio de aguacates Hass.....	61

ABREVIATURAS

ASTEL	Agar soya tripticasa con extracto de levadura
ANOVA	Análisis de Varianza
BMA	Bacterias mesófilas aerobias
BPW	Agua peptonada amortiguada
°C	Grados Celsius
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CF	Caldo Fraser
cm	Centímetro
CT	Coliformes totales
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FOOD	Base de datos en línea de brotes por consumo de alimentos
g	Gramo
h	Hora
ha	Hectárea
HE	Agar entérico Hektoen
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
LIA	Agar lisina descarboxilasa
LMIA	Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de los Alimentos
ML	Mohos y levaduras
MOX	Medio Oxford modificado
PCOM	Medio Oxford adicionado con polimixina y ceftazidima
ml	Mililitro
RV	Caldo Rappapot-Vassiliadis R10
s	Segundo
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

SB	Agar sulfito de bismuto
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TT	Caldo tetracionato verde brillante
TSI	Agar triple azúcar y hierro
ton	Toneladas
UFC	Unidades formadoras de colonia
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UVM	Caldo Universidad de Vermont modificado
XLD	Agar xilosa-lisina-desoxicolato

RESUMEN

Perfil microbiano del epicarpio de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) adquirido en mercados locales de Guadalajara, Jalisco

Ramón García Frutos
Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

El aguacate (*Persea americana*, var. Hass) es un fruto de consumo en fresco, utilizado como base o componente de algunos platillos. En México, los aguacates son ampliamente comercializados en mercados, en estos sitios, los frutos se almacenan a temperatura ambiente, exponen a fuentes de contaminación ambiental y se manejan por vendedores y compradores. Estas condiciones pueden favorecer la presencia, supervivencia y/o desarrollo de microorganismos en el epicarpio del aguacate. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de grupos microbianos, así como la ocurrencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y otras *Listeria* spp. en el epicarpio de aguacates comercializados en mercados. Un total de 450 aguacates fueron adquiridos en 45 establecimientos de 16 mercados, 225 se emplearon para determinar bacterias mesófilas aerobias (BMA), mohos y levaduras (ML), *Enterobacteriaceae*, coliformes totales (CT), *Escherichia coli* y *Salmonella* y otras 225 piezas se utilizaron para *L. monocytogenes*. La frecuencia de aislamiento para BMA fue del 99.5 %, ML 99.1 %, *Enterobacteriaceae* 84.0 %, CT 74.7 % y para *E. coli* 11.5 %. La cuenta (log UFC/aguacate) mínima y máxima para BMA fue de 4.3 a 9.0, ML 3.3 a 7.2, *Enterobacteriaceae* 3.3 a 8.2, CT 3.3 a 8.4 y para *E. coli* de 3.3 a 6.2. *Salmonella* fue recuperada del 3.2 % (n=8/225) de las muestras de aguacate adquiridas en dos mercados. Se aislaron 49 cepas de *Salmonella* Bareilly, el 36.7 % (n=18/49) presentaron resistencia a un antibiótico, 32.5 % (n=15/49) fueron resistentes a dos antibióticos, 24.7 % (n=12/49) a tres antibióticos, 4.1 % (n=3/49) a cuatro antibióticos y 2.0 % (n=1/49) a cinco antibióticos. La resistencia a ampicilina/sulbactam fue más común (100 %), seguida de carbencilina (26.5 %) y amikacina (20.4 %). *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se aislaron en el 12.4 (n=31/225) y 8 % (n=18/225), respectivamente, de los aguacates comprados en 11 mercados. Además, se identificó a *L. innocua* en el 7.1 % (n=16/225) de las muestras, *L. welshimeri* en 1.3 % (n=3/225) y *L. grayi* en 0.9 % (n=2/225). Se aislaron 40 cepas de *L. monocytogenes*, las cuales presentaron resistencia múltiple a antibióticos. El 37.5 % (n=15/40) de los aislamientos fueron resistentes a cuatro antibióticos, el 30 % (n=12/40) a cinco antibióticos, 12.5 % (n=5/40) a seis antimicrobianos y el 20 % (n=8/40) mostraron resistencia entre 7 a 13 antibióticos. La resistencia a la penicilina fue más común (100 %), seguida de la dicloxacilina (97.5 %), oxacilina (92.5 %) y cefotaxima (80.0 %). La frecuencia y niveles variables de grupos microbianos, así como la ocurrencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* puede ser resultado de las condiciones de manejo higiénico del aguacate en las etapas de la cadena productiva, las cuales pueden permitir la contaminación y/o proliferación microbiana. Estos resultados indican la necesidad de reforzar las Buenas Prácticas de Manejo en estos establecimientos para verificar que los aguacates son manejados y almacenados con base en la reducción de riesgos de contaminación y multiplicación de microorganismos patógenos y no patógenos.

ABSTRACT

Perfil microbiano del epicarpio de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) adquirido en mercados locales de Guadalajara, Jalisco

Ramón García Frutos
Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

The avocado (*Persea americana*, var Hass.) is a fruit consumed raw, as a base or component of some dishes. In Mexico, avocados are widely sold in local markets, in these sites, fruits are stored at room temperature, exposed to environmental sources of contamination and handled by sellers and buyers. These conditions may favor the presence, survival and growth of microorganisms in avocado epicarp. The aim of this study was to determine the microbial groups counts, as well as the occurrence of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. in the avocados epicarp sold in local markets. A total of 450 avocados were purchased in 45 establishments from 16 local markets, 225 were used to determine aerobic plate count (APC), yeasts and molds (Y/M), *Enterobacteriaceae*, total coliforms (TC), *Escherichia coli* and *Salmonella*, and other 225 avocados were used to determine the presence of *L. monocytogenes*. The frequency of isolation of microbial groups was 99.5 % for APC, 99.1 % Y/M, 84.0 % *Enterobacteriaceae*, 74.7 % TC and *E. coli* 11.5 %. The intervals of counts (log CFU/avocado) were 4.3-9.0 for APC, 3.3-7.2 Y/M, 3.3-8.2 *Enterobacteriaceae*, 3.3-8.4 TC and 3.3-6.2 *E. coli*. *Salmonella* was isolated in 3.2 % (n=8/225) of the analyzed samples obtained from two markets. A total of 49 strains of *Salmonella* Bareilly were isolated, of those, 36.7 % (n=18/49) showed resistance to one antibiotic, 32.5 % (n=15/49) to two antibiotics, 24.7 % (n=12/49) to three antibiotics, 4.1% (n=3/49) to four antibiotics, and 2.0 % (n=1/49) to five antibiotics. Resistance of *Salmonella* isolates to ampicillin/sulbactam was more common (100 %) than for carbenicillin (26.5 %) and amikacin (20.4 %). *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* were isolated in 12.4 (n = 31/225), and 8% (n=18/225) of avocados purchased in 11 markets, respectively. *L. innocua* was detected in 7.1 % (n=16/225) of the samples, *L. welshimeri* 1.3 % (n=3/225), and *L. grayi* 0.9 % (n=2/225). Forty strains of *L. monocytogenes* were isolated, which showed multiple resistance to antibiotics. A 37.5 % (n=15/40) of the isolates of *L. monocytogenes* were resistant to four antibiotics, 30 % (n=12/40) to five, 12.5 % (n=5/40) to six, and 20 % (n=8/40) between 7 and 13 antibiotics. Resistance to penicillin was more common (100 %), followed by dicloxacillin (97.5 %), oxacillin (92.5 %) and cefotaxime (80.0 %). The frequency and variable levels of microbial groups, as well as the *Salmonella* and *L. monocytogenes* occurrence can be a result of the handling conditions of avocado along the chain productive, that may allow microbial contamination and/or growth. These results indicate the need to reinforce Good Handling Practices in these establishments to verify that avocados are stored as safely as possible to minimize their contamination and growth with pathogenic and non-pathogenic microorganisms.

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* var. Hass) es un fruto con un exquisito sabor y alto valor nutritivo y con gran demanda mundial (Ortega Tovar, 2003). También se ha colocado como el alimento de moda en los países desarrollados (SAGARPA, 2015). México es líder en producción y venta internacional de aguacate, ya que aporta el 30 % de la producción mundial, y también es el país de mayor consumo *per cápita* con 7.2 kg al año (SIAP, 2017). El aguacate mexicano se exporta a 21 naciones, de las cuales, Estados Unidos (EUA), Japón y Canadá son los principales países importadores del fruto (SIAP, 2017).

El aguacate es consumido generalmente en fresco, como ingrediente de diversos platillos u otros alimentos de la cocina mexicana. El consumo del fruto en fresco puede representar un riesgo para la salud pública, cuando si no se aplica una medida destinada a reducir patógenos como *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Se han reportado alertas sanitarias y decomisos en EUA por la presencia de ambos patógenos en el aguacate fresco y algunos subproductos (Flynn, 2018; Marler, 2014; FDA, 2017). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EUA (CDC, por sus siglas en inglés), informó que de 1998 a 2016, se presentaron 61 brotes relacionados con el consumo de aguacate, subproductos y guacamole, con un total de 1 658 enfermos y 47 hospitalizaciones. El agente etiológico fue reportado en 46 brotes, de los cuales, 24 se relacionaron con Norovirus, 11 *Salmonella*, 4 *E. coli* y 7 involucraron a otros patógenos (NORS-CDC, 2017).

El ingreso de patógenos a la superficie del aguacate puede ocurrir en cualquier punto desde su producción primaria. La presencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y el contenido de *Escherichia coli* en frutos y fuentes ambientales como agua, suelo, compost comercial y equipo de recolección fue reportada en diversos estudios realizados durante el cultivo y cosecha de aguacate Hass (Enríquez-Hernández, 2007; García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011). Por otro lado, son escasos los estudios realizados para determinar la ocurrencia de patógenos y el contenido de grupos microbianos en otros puntos de la cadena productiva del aguacate (Rodríguez-Herrera, 2018). El aguacate contiene en su epicarpio microorganismos, los cuales, se pueden provenir del ambiente de producción; sin embargo, conforme avanza la cadena productiva el número y tipo de microorganismos presentes en la superficie del aguacate pueden

presentar variaciones (Nousiainen, Joutsen, Lunden, Hänninen, and Fredriksson-Ahomaa, 2016). Conocer el contenido de grupos microbianos en el epicarpio del aguacate puede ser útil para estimar su potencial como vehículo de patógenos. Además, el número y tipo de microorganismos en la superficie de los frutos puede ser variable dependiendo de las condiciones de manejo e higiene (ICMSF, 2011).

En México, los aguacates son ampliamente comercializados en mercados. En estos sitios, los frutos pueden ser contaminados con microorganismos patógenos provenientes del medio ambiente y del contenido intestinal de animales y humanos u otras fuentes humanas. Durante su venta al menudeo, los aguacates se mantienen a temperatura ambiente por varias horas o días y son ampliamente manipulados por clientes y comerciantes. Estas condiciones pueden favorecer la presencia, adhesión, desarrollo y formación de biopelículas por *Salmonella* y *L. monocytogenes* en el epicarpio del aguacate (Martínez-Chávez, 2015; Rodríguez-Correa, 2007), lo cual, puede dificultar su eliminación durante el lavado y desinfección de los frutos (Bañuelos-Gutiérrez *et al.*, 2017).

La presencia de microorganismos de patógenos en la superficie del aguacate tiene importantes implicaciones para la inocuidad durante el procesamiento de los frutos y la preparación de alimentos, ya que estos microorganismos pueden ser transferidos a la pulpa durante el corte o troceado e incluso llegar a contaminar otras superficies como utensilios y mesas de trabajo (Martínez-González, 2003; Strydom, Bester, Cameron, Franz, and Witthuhn, 2013; Strydom, Vorster, Gouws, and Witthuhn, 2016).

Este trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar los niveles de bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes totales y *E. coli*, así como la ocurrencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* y frecuencia de aislamiento de *Listeria* spp., en el epicarpio de aguacates comercializados en mercados de Guadalajara.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de aguacate

El aguacate (*Persea americana*) es un fruto tropical originario de México y cultivado en países generalmente de climas tropicales. Su origen data de más de 8 000 años, de acuerdo con las evidencias arqueológicas más antiguas encontradas en Tehuacán, Puebla, México. El árbol, perteneciente a la familia *Lauraceae*, es de aspecto frondoso, de hoja perene de color verde oscuro y puede llegar a alcanzar hasta los 20 m de altura. La producción de frutos se puede presentar dos veces por año, siendo mayor durante la primavera y verano (Alcaraz *et al.*, 2013; Thorp y Sedgley, 1993).

El cultivo de aguacate se realiza en hábitats que están a nivel del mar o hasta los 3 000 msnm y en climas templado, tropical, y sub-húmedo. La distribución del cultivo de este fruto se ha extendido hacia los países de Centro y Sudamérica, como Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Chile. Estos países abastecen el 70 % del fruto comercializado a Marruecos, Holanda, Suecia y Rusia (Alcaraz *et al.*, 2013; Macias, 2011).

Existen más de 400 variedades de aguacate, sin embargo, el 80 % (más de 4 millones de ton) del aguacate que se produce a nivel mundial es de la variedad “Hass”, la cual fue obtenida por Rudolph Hass en 1935, en California, Estados Unidos de América (EUA). Esta variedad, adquiere mayor relevancia comercial por sus características organolépticas que son más aceptadas por los consumidores y por poseer un epicarpio de mayor grosor que el resto de las variedades, ya que le brinda protección y facilita su manejo (Gutiérrez-Contreras, 2010; Alcaraz *et al.*, 2013). Otras variedades importantes son la Fuerte y Bacon, aunque el volumen de producción de estas variedades no supera el 5 % (230 000 ton) de la producción total, debido a que solo se comercializan para cubrir períodos del año en los que la variedad Hass no está disponible (Cerdas *et al.*, 2006).

En las últimas dos décadas, el aguacate ha dejado de ser un fruto exótico para formar parte de algunos platillos de muchos países y el alimento de moda en los países primermundistas, razón por la cual, se ha intensificado la producción y comercialización internacional del fruto. Aunado a esto, las tendencias alimenticias de la población están encaminadas hacia el consumo

de productos naturales que ofrezcan beneficios a la salud, las cuales son impulsadas por programas de algunos gobiernos como: “cinco al día” en México e Inglaterra o nueve al día en EUA. De tal forma que los productores de frutas y hortalizas deben estar comprometidos en brindar alimentos de calidad e inocuos para los consumidores (FAO, 2017).

2.2 Producción e impacto económico del aguacate

En el continente americano, se cultiva más del 69 % del aguacate que se produce en todo el mundo. México es el principal país productor de este fruto, ya que aporta el 30 % del aguacate que se comercializa a nivel internacional. Otros países que tienen una participación importante son República Dominicana e Indonesia, aunque su producción no sobrepasa el 10 %. La diferencia entre los tres países es muy amplia y con un gran valor de mercado a favor de México (FAO, 2017; SIAP, 2017).

El cultivo de aguacate es el más importante en México, aporta una derrama económica mayor a los 2 000 millones de dólares anuales, que representa el 4.39 % del producto interno bruto (PIB) del sector agrícola y el 8.84 % de la producción de frutas (SAGARPA, 2015; SIAP, 2017). En el 2017, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), informó que se tuvo una superficie de cosecha del fruto de 182 576 ha, con una producción de 1 979 362 ton y un aporte económico de 262 318 millones de dólares. Se estima que durante el período de 2017-2030 se tenga un incremento del volumen de producción del 68.3 % (SIAP, 2017).

Del 80 al 85 % de aguacate que se produce en México proviene del estado de Michoacán. Para el año 2017 se cosecharon más de 1 500 000 ton, con una participación económica mayor a los 39 millones de pesos (Tabla 1) (SIAP, 2017). Esta acción se concentra principalmente en 30 municipios de Michoacán, de los cuales 22 tienen un mayor impacto en la comercialización y son reconocidos a nivel internacional como la “franja aguacatera” más importante del país. Esta actividad es una de las mayores fuentes de su economía y genera más de 70 000 empleos directos y 300 000 indirectos (Gutiérrez-Contreras, Lara-Chávez, Guillén-Andrade, and Chávez-Bárcenas, 2010; SAGARPA, 2017).

El segundo estado productor de aguacate en México es Jalisco, en donde la producción del fruto ha incrementado considerablemente y calificado por SAGARPA como un estado con potencial de mayor rendimiento de producción, ya que la superficie sembrada aumentó en un 65 % (20 934 ha) de 2011 a 2017, con una producción de 168 000 ton (8.5 % de la producción nacional), seguido del Estado de México con el 5.5 % de la producción nacional. Otros estados que presentan una participación importante, aunque no mayor al 2 % son Morelos, Nayarit y Guerrero (Tabla 1) (SAGARPA, 2015; SIAP, 2017).

Tabla 1. Producción de aguacate variedad Hass en México, 2017.

Entidad federativa	Superficie (ha)		Producción		Rendimiento (ton/ha)	Valor de producción (miles de pesos)
	Sembrada	Cosechada	Toneladas	%		
Baja California	79.75	46.50	199.40	0.01	4.29	3 589.68
Baja California Sur	79.00	79.00	447.20	0.02	5.66	6 846.29
Chiapas	3 026.25	1 361.00	10 756.39	0.54	7.90	166 718.20
Colima	763.89	705.42	7 317.02	0.37	10.37	110 181.51
Durango	1 031.50	983.00	3 811.84	0.19	3.88	62 741.56
Guanajuato	136.00	120.00	695.50	0.04	5.80	9 489.65
Guerrero	3 658.43	2 574.03	18 551.36	0.94	7.21	225 720.38
Hidalgo	586.00	258.00	1 559.40	0.08	6.04	21 903.00
Jalisco	20 934.72	14 586.91	168 578.67	8.52	11.56	2 772 771.40
México	8 750.42	8 700.42	108 114.65	5.46	12.43	4 890 300.37
Michoacán ^a	158 739.98	141 986.03	1 565 171.76	79.07	21.38	29 714 974.45
Morelos	3 908.40	3 799.40	32 334.30	1.63	8.51	479 235.61
Nayarit ^a	5 326.98	4 269.52	39 159.57	1.98	17.35	504 845.65
Oaxaca	2 265.92	1 191.85	6 003.55	0.30	5.04	92 314.24
Puebla	2 028.50	1 302.20	10 412.14	0.53	8.00	120 416.17
Querétaro	33.00	33.00	105.60	0.01	3.20	1 128.86
San Luis Potosí	46.00	11.00	85.00	0.00	7.73	2 282.50
Sonora	30.00	30.00	406.62	0.02	13.55	7 786.41
Tlaxcala	25.00	20.00	140.00	0.01	7.00	3 220.00
Veracruz	565.00	490.00	5 307.30	0.27	10.83	82 802.07
Zacatecas	29.00	29.00	204.82	0.01	7.06	2 971.99
Total	212 043.74	182 576.28	1 979 362.09	100.00	10.59	39 282 239.95

^aEstados que participan con producción orgánica de aguacate.

Adaptado de SIAP, 2018.

Cerca del 68 % del aguacate mexicano es exportado a más de 21 países. Estados Unidos es el principal mercado por su valor comercial, seguido de Japón, Canadá, España, Francia y China. Australia, Argentina y Letonia, se perfilan como potenciales países importadores, lo cual abre otras oportunidades de mercado para México (SAGARPA, 2017).

Los principales países consumidores del fruto son latinoamericanos, México ocupa el primer lugar con un consumo *per cápita* de 7.2 a 10 kg/año (SIAP, 2017). El consumo de este

fruto ha aumentado en EUA, en el 2012 fue de 5.65 kg, mientras que para el 2017, alcanzó los 7.2 kg. La popularidad del fruto se expande en el país norteamericano, por los restaurantes en los que se elaboran platillos mexicanos (SIAP, 2017).

La comercialización globalizada del fruto ha ocasionado que su valor económico presente grandes fluctuaciones, con un incremento creciente. El aguacate se comercializaba alrededor de los \$ 13/kg en México durante 2001. Sin embargo, en el 2017 llegó a venderse hasta en \$ 120/kg en algunos estados de la República como Baja California y Nuevo León (SNIIM, 2017). En tanto en EUA, el valor del fruto llegó a ser de 0.94 dólares/pieza, con un valor máximo de 1.44 dólares/pieza en 2016. El progresivo incremento en el valor del aguacate despertó el interés de los productores por vender sus frutos en dólares, con lo que comenzó la fiebre del “oro verde”, refiriéndose así, a la excesiva producción y cultivo de aguacate, con el abandono de la siembra de granos y hortalizas para sustituir las parcelas por huertos de aguacate (Salazar-García *et al.*, 2005).

2.3 Sustentabilidad y producción de aguacate

La demanda internacional del aguacate trajo consigo el aumento de su producción y de la superficie cultivada. En la franja aguacatera de Michoacán, tan solo durante el período de 2005 a 2010, la superficie de cultivo aumentó en un 10 % de 86 000 ha a más de 94 000 ha (SAGARPA, 2005; Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010). Para el año 2016, el cultivo de aguacate rebasaba las 112 000 ha, de acuerdo con los datos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2016).

En el estado de Michoacán se pierden cada año más de 600 a 1 000 ha de bosques. La mayoría de la superficie actualmente cultivada era terreno forestal. Sin embargo, el indiscriminado cambio de uso de suelo ha dado lugar a que zonas boscosas del estado sean ahora áreas productoras de aguacate, lo cual se ha realizado de manera ilegal, ya que desde la década de los 90's, SEMARNAT no ha otorgado licitaciones de cambio de uso de suelo forestal para producción agrícola (INIFAP, 2012; SEMARNAT, 2016).

A pesar de que México es el principal productor del fruto, el rendimiento por unidad de superficie sembrada es de 10.2 ton/ha, a diferencia de otros países como Brasil, República

Dominicana, Israel y Colombia en donde los rendimientos son de 14.4 ton/ha, 12.7 ton/ha, 11.2 ton/ha y 10.5 ton/ha, respectivamente, lo cual manifiesta que la producción de aguacate en México se puede aumentar o mantenerse sin necesidad de expandir más el monocultivo. Bajo las condiciones de uso del suelo con fines agrícolas resulta necesario el uso de alternativas a la agricultura tradicional para coadyuvar en la preservación de la sanidad de suelos agrícolas, en este contexto puede emplearse el no laboreo del suelo, la reducción de pesticidas, la incorporación de materia orgánica y mantenimiento adecuado de la macro y microfauna en la producción de aguacate (García, 2003; Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010).

En los estados de Michoacán y Nayarit, se ha impulsado la producción orgánica de aguacate, con el fin de minimizar el impacto ambiental de la industria del aguacate, para preservar la sustentabilidad del suelo a largo plazo y reducir al mínimo el uso de recursos no renovables y para el 2017, ambos estados tuvieron una producción del fruto del 5 y 2 % respectivamente (Gomiero, *et al.*, 2011; SIAP, 2018).

Las precipitaciones anuales en los municipios productores de aguacate de Michoacán van de 1 200 a 1 600 mm. Esta cantidad de agua es suficiente para la producción de aguacate, debido a que el cultivo del fruto requiere grandes volúmenes de agua para su riego y fertilización. Sin embargo, en la última década, se han generado problemas en el abastecimiento del recurso hídrico en más de la mitad de los 113 municipios del estado (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010).

La pérdida de áreas forestales afecta también el abastecimiento de agua, ya que esto depende en gran medida de las zonas boscosas. Una hectárea de suelo sano puede filtrar y almacenar hasta 3 750 ton de agua (López *et al.*, 2014). Con el objetivo de frenar la deforestación de bosques en Michoacán, la SAGARPA y la SEMARNAT firmaron un acuerdo de colaboración para preservar los bosques y fortalecer la sustentabilidad alimentaria en el país (SEMARNAT, 2016).

El riego de tipo rodado o tradicional para el cultivo de aguacate continúa siendo el más utilizado por los productores, sin embargo, el hacerlo de esta manera genera la pérdida de grandes volúmenes de agua, además de la erosión de los suelos y contaminación de mantos freáticos por la lixiviación de fertilizantes y pesticidas. El riego por goteo es una alternativa

adoptada en gran parte de la producción agrícola, ya que brinda un mayor aprovechamiento del agua y permite conservar una humedad adecuada para el cultivo, sin generar excesos en el terreno. Además, de evitar la pérdida de nutrientes del suelo por el arrastre del exceso de agua (López *et al.*, 2014).

El agua de uso agrícola es la principal fuente de contaminación de frutas y hortalizas frescas, ya que se utiliza para el riego de las plantas, aplicación de fertilizantes, foliares, lavado de manos y utensilios para la cosecha. Se puede decir que de acuerdo a la calidad del agua utilizada depende la inocuidad o contaminación del producto (Veliz *et al.*, 2009; Aleid *et al.*, 2016).

Para solventar la necesidad de agua requerida para los cultivos, los productores hortofrutícolas tienden a utilizar aguas residuales provenientes de las zonas urbanas aledañas a las áreas de cultivo. En América Latina al menos 500 000 ha de cultivos son irrigadas con aguas residuales no tratadas, inclusive para la producción de frutas y hortalizas frescas para consumo humano, lo cual representa un grave problema para la salud humana, debido a que pueden contener patógenos entéricos y no suelen recibir un tratamiento que inactive patógenos previo a su consumo (Veliz *et al.*, 2009). En México, al menos 150 000 ha son irrigadas con aguas residuales sin tratamiento, esto pone de manifiesto la deficiencia en la calidad del agua para la producción hortofrutícola, incluyendo el cultivo de aguacate (Ángel 2010; Cifuentes *et al.*, 1994).

Rodríguez-García (2011), señaló la importancia de racionar el abastecimiento de agua a los productores agrícolas, para así incentivarlos al aprovechamiento óptimo del recurso, con el uso de alternativas de riego e incorporación periódica y adecuada de materia orgánica, que coadyuven a mantener la humedad en el suelo y mejorar la captación de nutrientes por los árboles, para contribuir a fortalecer la sustentabilidad.

2.4 Composición nutrimental y beneficios del consumo de aguacate

El aguacate contiene un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (66-72 %), diversas proteínas (1.7 %) y un bajo porcentaje de carbohidratos (5.9 g). Además, contiene algunas vitaminas liposolubles como biotina, niacina y vitamina E, poco frecuentes en las frutas. Provee

grandes cantidades de betacarotenos, ácido fólico y cobre (Tabla 2). Es un fruto de fácil digestión y su consumo no contribuye a la formación de colesterol, sino que favorece a la eliminación del mismo (Kadam and Salunkhe, 1995; Ortega Tovar, 2003).

Tabla 2. Valor nutrimental por cada 100 g de pulpa de aguacate Hass.

Ácidos grasos (%)		Minerales (mg)	Vitaminas (mg)	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Grasas (g)
Monoinsaturados	66-72	Calcio 10.0	A 85.0	3.3	10.0	16.7
Polinsaturados	8-11	Hierro 1.06	D 10.0			
Saturados	16-22	Fosforo 40.0	E 3.0			
		Magnesio 41.0	K 8.0			
		Potasio 463.0	C 14.0			
		Sodio 4.0	Niacina 1.60			
			Biotina 10.0			
			Ácido fólico 14.0			

Adaptado de Ortega-Tovar, 2003 y base de datos de composición de alimentos de la USDA, 2018.

El consumo de aguacate de manera regular provee algunos beneficios a la salud como la reducción y eliminación de colesterol de baja densidad, con lo que se reducen los riesgos de padecer arterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Lo anterior, es por el alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (oleico y palmitoleico) y polinsaturados (omega 3, 6 y 9) (Pérez, Villanueva, and Cosío, 2005).

Algunas investigaciones realizadas en ratones han reportado que la presencia de β -sitosterol en el aguacate (4.5 mg/g) inhibe la absorción de colesterol en el intestino de los roedores y la síntesis del colesterol hepático, lo que favorece también la reducción de niveles de triglicéridos en sangre y la regeneración de membranas de las células de la mucosa intestinal (Ortega-Tovar, 2003; Salgado *et al.*, 2008).

Fulgoni *et al.* (2013) compararon los niveles de colesterol de alta densidad entre personas con una dieta que incluía el consumo de aguacate y personas que no incluían aguacate en su alimentación. Las personas que consumieron aguacate tuvieron niveles más altos de colesterol de alta densidad (55.8 > 52.8 mg/d). En el mismo estudio, los pacientes que presentaban enfermedades cardiovasculares o diabetes mejoraron su calidad de vida por reducir los niveles de lípidos y glucosa en sangre, por lo que recomiendan el consumo de aguacate o de

aceite de este fruto, para reducir el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico.

El consumo de aguacate provee también algunos beneficios en la prevención de cáncer de colón y próstata, por su alto contenido de principios bioactivos como los carotenoides y tocoferoles. Quing-Yi *et al.*, (2005), encontraron que los niveles de luteína, zeaxantina, α -caroteno y β -caroteno en el aguacate, inhiben el crecimiento de células relacionadas con el cáncer de próstata.

2.5 La inocuidad y el desarrollo sustentable

El desarrollo sustentable y la salud pública están interrelacionados, no se puede hablar de sustentabilidad si no se toma en cuenta el preservar la salud de los individuos. El desarrollo sustentable está enfocado en satisfacer las necesidades de la generación humana, con el mejor aprovechamiento y cuidado de los recursos naturales, sin comprometer el desarrollo y bienestar de las futuras generaciones (Gliessman, 2002).

Una de las necesidades básicas del ser humano es la alimentación; un individuo activo en su entorno adquiere los compuestos nutricionales necesarios para su óptimo desarrollo físico y mental, a partir de la ingesta de alimentos nutritivos. La Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el año 2003, declaró indispensable el derecho a la alimentación para todo ser humano y con ello, la búsqueda de la seguridad alimentaria para la población. Lo anterior se consigue cuando todas las personas tienen acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer las necesidades y llevar una calidad de vida activa y saludable (Orozco *et al.*, 2016). Es necesaria la participación de individuos sanos para preservar un desarrollo continuo.

En Estados Unidos, se estima que cada año al menos 48 millones de personas enferman, 128 000 son hospitalizados y 3 000 mueren por enfermedades transmitidas por alimentos. El costo anual promedio, para la atención de estas enfermedades se estima en un rango entre los 5 000 y los 33 000 millones de dólares (CDC, 2011a; Hoffmann *et al.*, 2016). Las agencias regulatorias de algunos países han desarrollado iniciativas de inocuidad para prevenir la

contaminación de alimentos, debido al elevado número de casos y el impacto económico ocasionado por las enfermedades transmitidas por alimentos.

El derecho a la alimentación es una de las garantías básicas de la humanidad y debe ser un aspecto reconocido y atendido por la comunidad internacional, para que el gobierno de cada país respete, proteja y busque la seguridad alimentaria. La ausencia de la inocuidad de los alimentos conlleva al incumplimiento y violación de los derechos humanos, con un impacto negativo tanto social como económico para el desarrollo sustentable (Hoffmann *et al.*, 2016; Molins, 2007).

2.6 Inocuidad del aguacate y subproductos

2.6.1 El aguacate y subproductos como vehículo de microorganismos patógenos

El aguacate Hass posee un epicarpio que le brinda protección a la pulpa de la contaminación externa. El epicarpio del fruto contiene microorganismos, cuyo número y tipo puede ser modificado como resultado de las prácticas de manejo e higiene a lo largo de la cadena productiva (García-Sánchez, 2008; Graça, Esteves, Nunes, Abadias, and Quintas, 2017; Rodríguez-García, 2011).

La presencia de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) ha sido reportada en el epicarpio del aguacate fresco (Enríquez-Hernández, 2007; García-Sánchez, 2008; Strydom, Bester, Cameron, Franz, and Witthuhn, 2013), lo que ha ocasionado la emisión de alertas sanitarias y el decomiso de productos del mercado (FDA, 2008; Flynn, 2018; Marler, 2014). En julio de 2008, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés), lanzó una alerta sanitaria que involucró al aguacate Hass proveniente de Michoacán, México contaminado con *Salmonella* Anatum, lo que provocó el retiro voluntario de un lote de aguacates exportados a EUA (FDA, 2008; Reardon, 2008). No se reportaron casos de enfermedad relacionados con esta alerta. Así mismo, en noviembre de 2014 la FDA lanzó una alerta, por la presencia de *Salmonella* en aguacates enteros cultivados en Houston, Texas. En total se decomisaron 80 cajas que contenían 32 piezas de aguacate. No se reportó la variedad del fruto (Marler, 2014).

Además del fruto entero, algunos subproductos del aguacate también se han relacionado con alertas y decomisos por contaminación con patógenos (U.S. FDA, 2017b). Durante el período de 1993-2004, se reportaron 11 decomisos de subproductos en EUA debido a la contaminación con *Listeria monocytogenes*, entre los que se incluyeron 4.0 ton de pulpa de aguacate, 4.5 ton de guacamole refrigerado, 46.0 ton de guacamole congelado y 1.0 ton de mitades de aguacate con cáscara provenientes de México (U.S. FDA, 2017b). Recientemente, la FDA ordenó el decomiso de un lote de guacamole envasado en presentación de nueve onzas que fue distribuido en EUA y Canadá, debido a la contaminación con *L. monocytogenes*. No se reportaron enfermos (U.S. FDA, 2017b, 2017a).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EUA (CDC, por sus siglas en inglés), ha señalado que las salsas y guacamole forman parte de los alimentos involucrados en brotes de ETA y afirma que el uso de ingredientes hortofrutícolas frescos contaminados es la causa del elevado número de brotes (Lee, Hwang, and Mustapha, 2014; Simonne *et al.*, 2004). En un estudio realizado para determinar la tendencia de la inocuidad alimentaria en EUA de 1990 a 2006, se reportó que el consumo de salsas y guacamole estuvo involucrado en el 13 % de los brotes por *Salmonella*, *Clostridium*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus* (Franco y Simonne 2009).

El número de brotes por consumo de salsas y guacamole ha aumentado en los Estados Unidos, el promedio de brotes por año fue de dos entre 1984 y 1997, en comparación con un promedio de 11 brotes por año en el período de 1998 a 2008 (CDC, 2017). Lo anterior, se asocia al incremento en el consumo de estos productos, al escrutinio de las autoridades sanitarias en los reportes de ETA, el crecimiento del comercio internacional, los cambios demográficos de la sociedad, la resistencia y adaptación de patógenos al estrés ambiental, el mayor número de consumidores inmunocomprometidos, así como a los cambios en las prácticas agronómicas (Beuchat y Ryu, 1997; CDC, 2011).

Kendall *et al.* (2013) realizaron una investigación sobre 136 brotes de ETA con un total de 5 658 casos de enfermedad y 140 hospitalizaciones, causados por el consumo de salsas y guacamole en el periodo de 1984 a 2008. El consumo de guacamole contaminado estuvo implicado en 35 brotes (26 %). Los principales patógenos asociados a los 136 reportes fueron norovirus (24 %), algunos serotipos de *Salmonella* no tifoidea (19 %) y *Shigella* (7 %), entre

otros agentes patógenos (18 %). Se reportaron también brotes asociados a múltiples patógenos (4 %) y en algunos casos no se confirmó el agente causal (28 %). *Salmonella* causó el mayor número de casos de enfermedades (33 %), seguido por norovirus (17 %) y *Shigella* (14 %). Un 84 % de los brotes fueron atribuidos al consumo de alimentos preparados en restaurantes o tiendas delicatessen, en los cuales se reportó que el 19 % de los trabajadores estaba enfermo y el 29 % tuvo prácticas de almacenamiento inadecuado del producto (Kendall *et al.*, 2013).

De acuerdo con los datos del Sistema Nacional de Notificación de Brotes (NORS, por sus siglas en inglés) del CDC, entre 2005 y 2016 se reportaron 27 brotes de ETA relacionadas con el consumo de aguacate solo o como ingrediente de algunos platillos. De los 27 brotes, en 13 (48 %) se identificó a norovirus como el agente etiológico, 10 (37 %) a *Salmonella*, tres (11 %) a *E. coli* patógena y solo uno (4 %) a *Clostridium perfringens*, en total se registraron 1 055 personas enfermas y 37 hospitalizaciones (Tabla 3) (CDC- NORS, 2018).

En el 96% de los brotes se notificó que el alimento contaminado se adquirió en restaurantes, aunque no se informó la fuente de contaminación (NORS-CDC, 2017). El guacamole figuró como el alimento mayormente implicado en los brotes, con el 89 % de los reportes (Tabla 3). A pesar de que el aguacate es el ingrediente principal de este platillo, es difícil hacer una asociación epidemiológica del fruto como la fuente de contaminación, debido a que otros vegetales empleados en su preparación como tomate, cebolla y cilantro, han sido reportados como vehículo de patógenos causantes de brotes de ETA (Beuchat, 2002).

Mientras que, el aguacate se vinculó con tres de los 27 brotes y en los tres reportes el agente etiológico fue *Salmonella*, con los serotipos *S. Newport*, *S. Braenderup* y *S. Enteritidis* (NORS-CDC, 2017). Uno de los brotes más importantes reportados durante este período, tuvo lugar en el estado de Illinois, EUA, en 2005. En el cual, 162 personas enfermaron por el consumo de salsa y guacamole contaminados con *Salmonella* Typhimurium, no se reportaron hospitalizaciones ni muertes (NORS-CDC, 2017).

Tabla 3. Brotes en Estados Unidos asociados al consumo de aguacate (2005-2016).

Agente etiológico	Año	Alimentos	Número de enfermos	Número de hospitalizaciones
Norovirus	2005	Guacamole	13	0
Norovirus Genogrupo I	2005	Guacamole; papas y salsa	44	0
<i>Salmonella enterica</i>	2005	Salsas; fajita; guacamole	162	0
Norovirus Genogrupo I	2006	Guacamole,	113	1
<i>Salmonella enterica</i>	2007	Tomate; aguacate; guacamole; cilantro	46	0
<i>Clostridium perfringens</i>	2007	Fajita, pollo; guacamole; frijoles fritos	6	0
<i>Salmonella enterica</i>	2008	Pico de gallo; guacamole	29	4
<i>Salmonella enterica</i>	2008	Guacamole	17	3
<i>Escherichia coli</i> , productora de toxina Shiga	2008	Guacamole	68	4
<i>Escherichia coli</i> , productora de toxina Shiga	2009	Guacamole	4	2
<i>Escherichia coli</i> , enterotoxigénica	2009	Guacamole	58	0
Norovirus	2009	Guacamole; salsa	13	0
Norovirus	2010	Guacamole; pizza, vegetales	26	0
<i>Salmonella enterica</i>	2010	Pico de gallo; guacamole	73	3
<i>Salmonella enterica</i>	2010	Guacamole	15	2
Norovirus	2010	Guacamole; frijoles	36	0
Norovirus	2010	Guacamole; papa salada	14	0
<i>Salmonella enterica</i>	2010	Guacamole	41	5
<i>Salmonella enterica</i>	2011	Aguacate	3	0
Norovirus Genogrupo II	2013	Ensalada de yoba; guacamole	4	0
Norovirus Genogrupo II	2014	Guacamole; crema ácida	135	6
Norovirus Genogrupo II; Norovirus Genogrupo II	2014	Lechuga; guacamole	8	0
Norovirus Genogrupo II	2015	Guacamole	26	0
<i>Salmonella enterica</i>	2015	Guacamole	9	0
Norovirus Genogrupo II	2016	Paella marinera; guacamole	19	0
Norovirus Genogrupo I	2016	Guacamole	14	0
<i>Salmonella enterica</i>	2016	Aguacate	59	7
Total			1 055	37

Adaptado del NORS-CDC, 2018 <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.

Si bien es cierto, *Salmonella* no figuró como el principal patógeno en los brotes por consumo de aguacate y/o subproductos de 2005 a 2016. Sin embargo, este enteropatógeno fue responsable de 454 (36 %) casos de enfermedades y del mayor número de hospitalizaciones reportadas (65 %) (Tabla 4). Los serotipos de *Salmonella* identificados fueron *S. Enteritidis*, *S. Grupo B*, *S. Braenderup*, *S. Newport*, *S. Typhimurium* y *S. Virchow* (NORS-CDC, 2017).

A pesar de que *L. monocytogenes* no se ha vinculado como agente causal de brotes por consumo de aguacate, su hallazgo tanto en el epicarpio del fruto como en subproductos es de interés sanitario por su carácter ubicuo, su capacidad de supervivencia a bajas temperaturas (-4 °C) y alta acidez (pH <3.0), y su alta letalidad (20-40 %) (Clark *et al.*, 2010; Martínez-Gonzales *et al.*, 2003; U.S. FDA, 2017b). Esta bacteria es uno de los agentes patógenos más importantes asociados a casos de ETA y los productos hortofrutícolas se encuentran dentro de los alimentos con mayor incidencia de este (U.S. FDA, 2001).

No obstante, los casos de listeriosis por consumo de alimentos, generalmente se han reportado de manera aislada o en pocos casos se ha relacionado al consumo solo de un alimento. Es probable que lo anterior este influido por factores como el estado inmunológico de los individuos, ya que los grupos más vulnerables son mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunocomprometidas (Buchanan, Gorris, Hayman, C., and Whiting, 2017; Xu *et al.*, 2017). Aunque también, se han registrado brotes con un gran número de casos, como el que se suscitó en diversas entidades de EUA durante 2011 por el consumo de melón cantaloupe fresco contaminado con *L. monocytogenes*, en el que se reportó un total de 147 personas enfermas, 145 hospitalizaciones, 33 defunciones y un aborto espontáneo (CDC, 2011).

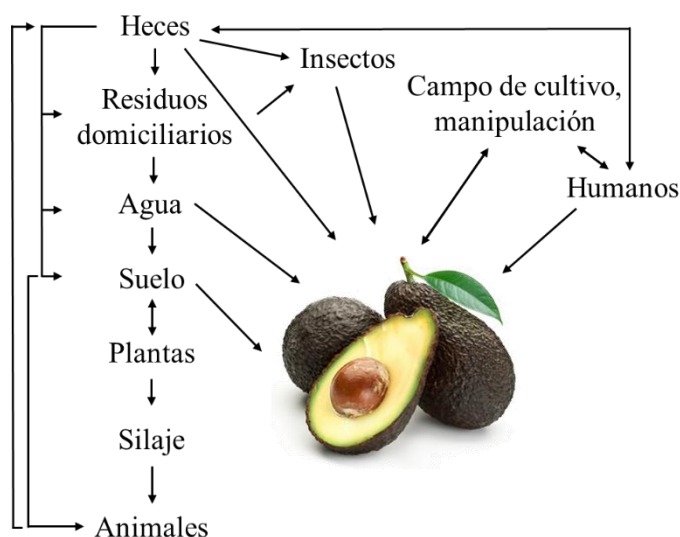
Debido al creciente número de brotes y casos de enfermedades relacionados con el aguacate y subproductos, la FDA ha desarrollado un modelo de muestreo de vigilancia microbiana con el objetivo de identificar patrones que contribuyan a predecir y prevenir la contaminación futura por patógenos transmitidos por alimentos (U.S. FDA, 2014). El modelo incluye la recolección de muestras nacionales e importados de aguacate procesado listo para el consumo, para la identificación de *Salmonella*, principal patógeno bacteriano causante de brotes relacionados con el aguacate y *L. monocytogenes*, cuya implementación es recomendada por el Comité Nacional de Consultores sobre Criterios Microbiológicos en Alimentos, cuando no se asocie el alimento con un patógeno específico, debido a la distribución ubicua de la misma

(Beuchat, 2002; Kendall *et al.*, 2013). Lo anterior, con el fin de evitar que los alimentos contaminados lleguen a los consumidores y facilitar la comprensión de los peligros relacionados con el consumo de aguacate para el desarrollo de estrategias que eviten o minimicen la contaminación del aguacate y subproductos. En marzo de 2018, se emitieron resultados parciales de este muestreo de vigilancia, los cuales, reportaron el hallazgo de *L. monocytogenes* en cuatro muestras de guacamole (2.3 %) (U.S. FDA, 2018).

2.6.2 Fuentes de microorganismos patógenos en el aguacate

Los patógenos pueden llegar al epicarpio del aguacate desde su producción primaria, a través de diversas fuentes de contaminación, que incluyen el agua, suelo, animales, insectos, equipo, utensilios y las manos de los trabajadores en la realización de actividades relacionadas con el cultivo y cosecha del fruto (Figura 1) (Alegbeleye, Singleton, and Sant'Ana, 2018; García-Sánchez, 2008; Mir *et al.*, 2018; Rodríguez-García, 2011).

Figura 1. Fuentes de contaminación del aguacate



Adaptado de Harris, 1998.

Se han realizado diversas investigaciones con el objetivo de conocer la distribución de bacterias patógenas durante el cultivo y cosecha del aguacate en huertas productoras y exportadoras del estado de Michoacán. Estas investigaciones señalan deficiencias en la aplicación de las buenas prácticas agrícolas e higiene; lo cual ha propiciado la contaminación microbiana de los frutos. Los resultados muestran el hallazgo de *Salmonella* spp. (2.7-2.8 %)

(García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011), *Listeria innocua* (2.6 %), *L. wilshimeri* (1.3 %), *L. grayi* (0.7 %), *L. murrayi* (1.3 %) y *L. monocytogenes* (0.7 %) (Enríquez-Hernández, 2007; Rodríguez-García, 2011), en el epicarpio de aguacates. Los serotipos de *Salmonella* aislados fueron *S. Bardo*, *S. Poona*, *S. Agona*, *S. Braenderup*, *S. Newport* y *S. London* (García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011).

El uso de agua proveniente de ríos puede ser utilizada para irrigar cultivos, preparar soluciones pesticidas, para el lavado de los utensilios y manos de los trabajadores, sin recibir un tratamiento previo que inactive microorganismos patógenos (Beuchat, 2002). Esta práctica puede conducir a la diseminación de bacterias patógenas, ya que se ha reportado la presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en el agua de uso agrícola en huertas de aguacate (Tabla 4) (Enríquez-Hernández, 2007; García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011).

Tabla 4. Fuentes ambientales de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en huertas de aguacate.

Fuente de aislamiento	Patógeno	Prevalencia %	Referencia
Agua de riego	<i>Salmonella</i>	33	García-Sánchez, 2008
	<i>Salmonella</i>	9	Rodríguez-García, 2011
	<i>L. monocytogenes</i>	17	Enríquez-Hernández, 2007
	<i>L. monocytogenes</i>	5	Rodríguez-García, 2011
Agua de reservorio	<i>Salmonella</i>	33	García-Sánchez, 2008
	<i>L. monocytogenes</i>	20	Enríquez-Hernández, 2007
Suelo agrícola	<i>Salmonella</i>	3	García-Sánchez, 2008
	<i>Salmonella</i>	4	Rodríguez-García, 2011
	<i>L. monocytogenes</i>	5	Enríquez-Hernández, 2007
	<i>L. monocytogenes</i>	2	Rodríguez-García, 2011
Compost comercial	<i>Salmonella</i>	100	García-Sánchez, 2008
	<i>L. monocytogenes</i>	5	Enríquez-Hernández, 2007
Superficies ^a	<i>Salmonella</i>	4	Rodríguez-García, 2011
	<i>L. monocytogenes</i>	4	Rodríguez-García, 2011

^a Manos de los trabajadores, vehículos de transporte, tijeras de corte, picaporte de la puerta del baño, manija del lavamanos, boquilla del aspersor y mangueras de riego.

La fertilización de cultivos de aguacate con estiércol de animales, crudo o sin un tratamiento que inactive patógenos, es una práctica prohibida durante el cultivo y cosecha del aguacate, porque puede conducir a la contaminación del fruto (Rodríguez-García, 2017; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999). Algunas publicaciones han documentado que patógenos como *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir en heces de ganado bovino durante 49 días a 37 °C y hasta 56 días a 22 °C (Wang, Zhao, and Doyle, 1996). Asimismo, *Salmonella* Typhimurium y

L. monocytogenes sobreviven hasta por 135 y 84 días respectivamente, a 4 y 17°C en estiércol líquido de ganado (Kearney, Larkin, and Levett, 1993). Por otra parte, la implementación de compost o desechos biosólidos con insuficiente tiempo de compostaje puede ser una fuente de patógenos de riesgo para la salud pública, los cuales, pueden ingresar directamente al suelo o contaminar depósitos de agua y ser diseminados en el huerto (Brackett, 1999; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999). Ya que, se ha aislado a *Salmonella* y *L. monocytogenes* a partir de compost comercial a base de estiércol de res, hojarasca y cáscaras de cítricos, empleada en huertos de aguacate (Tabla 4) (Enríquez-Hernández, 2007; García-Sánchez, 2008).

Otra manera en que pueden llegar los contaminantes de origen fecal a los campos de cultivo es a través de la fauna silvestre, insectos, cuando se permite el ingreso de animales de crianza y/o domésticos. *Salmonella*, *E. coli* patógena, *L. monocytogenes* y norovirus han sido aislados de heces de pájaros, gaviotas, perros y reptiles, los cuales pueden contaminar no solo el suelo agrícola, sino también el agua de irrigación o directamente los frutos (Aguilar *et al.*, 2005; Beuchat, 2006). Un estudio realizado en Reino Unido, *Salmonella* se aisló del 16 % de muestras de heces de palomas (Beuchat, 2006). Además, en Noruega, este mismo enteropatógeno se encontró en 426 aves pertenecientes a 26 especies. *Escherichia coli* O157:H7 puede estar presente en el 3-12.5 % de aves y ganado bovino y porcino (Beuchat, 2006; Fernández-Escartín, 2008a). Por otra parte, entre el 2 y 16% de los cerdos, reces y borregos sanos pueden excretar *L. monocytogenes* (Fernández-Escartín, 2008b).

Si bien es cierto que el aguacate crece suspendido en el árbol, no está exento de la contaminación por patógenos que estén presentes en los campos de cultivo, ya que estos pueden llegar a los frutos de diversas maneras. Rodríguez-García (2011), menciona que algunos árboles de baja altura (1.5 m), producen frutos cuyo peso vence la rama que los sostiene y llegan a tocar el suelo, lo que podría conducir a una contaminación directa del epicarpio del aguacate. Durante la jornada de cosecha algunos frutos llegan a caer al suelo; y de acuerdo con las normas fitosanitarias no deben emplearse estos para el consumo. Sin embargo, estos frutos suelen ser comercializados en el mercado nacional e incrementa la posibilidad de contaminación directa del fruto por patógenos como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, los cuales han sido aislados del suelo en huertas de aguacate (Tabla 5) (Enríquez-Hernández, 2007; Rodríguez-García, 2011; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999).

Las superficies que incluyen las manos de los trabajadores, vehículos de transporte, equipos y utensilios empleados durante el cultivo y cosecha del aguacate representan otra importante fuente de contaminación de bacterias patógenas. Se ha reportado el aislamiento de *Salmonella* spp. (4 %) y *L. monocytogenes* (4 %) en superficies ambientales de huertas de aguacate (Tabla 5), entre las que se encontraban bolsas, tijeras, ganchos, zapatos, picaporte de la puerta del baño, manija de lavamanos, boquilla del aspersor y mangueras de riego (Enríquez-Hernández, 2007; Rodríguez-García, 2011). Por otro lado, no se tienen reportes del aislamiento de patógenos en los vehículos empleados para el transporte de aguacate. Sin embargo, Beuchat and Ryu (1997), documentaron que los camiones empleados para transportar frutas fueron reportados como fuente de *Salmonella* en un brote de salmonelosis cuando se usaron previamente para trasladar ganado y no recibieron un tratamiento de limpieza adecuado.

En las etapas post-cosecha del aguacate aumentan las posibilidades de que los microorganismos patógenos lleguen a la superficie de los frutos. Salazar-Arriaga and González-Sánchez (1999), mencionan que en las plantas de empaque existe un mayor riesgo de contaminación de los frutos, debido omisiones en la aplicación de las buenas prácticas de manejo e higiene. *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se aislaron en las manos de los trabajadores, botas, cintas transportadoras, pisos, desagües y salas de almacenamiento de las instalaciones de empacadoras y procesadoras de aguacate entre un 0.7 y 14 % y a partir de estas superficies pueden llegar a contaminar los frutos en la etapa de empaque o procesamiento del aguacate (Rodríguez-García, 2011; Strydom *et al.*, 2013, 2016). Además, en algunos empaques los aguacates son sumergidos en contenedores que contienen agua para lavado y si una parte de estos se encuentra contaminada, los patógenos pueden diseminarse a todo el lote (Rodríguez-García, 2017).

El aguacate es comercializado al menudeo en supermercados, mercados locales y puestos ambulantes. En México, el 85 % de los productos hortofrutícolas se vende en los mercados locales y suelen ser el mayor punto de abastecimiento de los consumidores finales o por los preparadores de alimentos (Reardon and Berdegué, 2008; SE, 2012). En estos establecimientos, los aguacates son expuestos a fuentes de contaminación ambiental, además de entrar en contacto con superficies vivas e inertes como las manos de compradores y vendedores, contenedores, otros productos hortofrutícolas, roedores e insectos que pueden actuar como

vehículos de patógenos transmitidos por alimentos (Fröder *et al.*, 2007; Korir *et al.*, 2016; Leal-Cervantes *et al.*, 2018; Quansah *et al.*, 2018; Roth, *et al.*, 2018; Seow *et al.*, 2012; Viswanathan and Kaur, 2001). En este punto, la contaminación humana adquiere relevancia, ya que la Organización Mundial de la Salud reporta que del 20 al 30 % de las personas son portadores de patógenos entéricos como norovirus, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 (FAO, 2017). Además, durante su comercialización los frutos se mantienen a temperatura ambiente por periodos de 8 a 12 h, estas condiciones podrían favorecer la supervivencia y/o multiplicación de bacterias patógenas en el epicarpio del aguacate (Rodríguez-Correa, 2007).

Los riesgos de contaminación microbiana en los subproductos del aguacate como la pulpa y guacamole también se presentan durante el procesamiento del fruto y la preparación de alimentos. Un riesgo adicional es que, el consumo del aguacate es en fresco y carece de un tratamiento térmico para la eliminación de agentes patógenos (Arvizu-Medrano, Iturriaga, and Escartín, 2001; Iturriaga, Arvizu-Medrano, and Escartín, 2002; Strydom *et al.*, 2013, 2016). Las fuentes de mayor interés son las partes externas del aguacate, ya que la probabilidad de contaminación aumenta cuando la pulpa tiene contacto directo con la superficie del fruto. Los patógenos pueden internalizarse al fruto a través de la cicatriz del pedúnculo o sitios dañados del fruto. Incluso, la inmersión y aspersion de los aguacates con agua fría mientras éstos conservan la temperatura de campo (40 °C), facilita la infiltración de los patógenos en el fruto (Chen, Evans, Hammack, Brown, and Macarisin, 2016).

Se puede presentar la contaminación cruzada del exterior al interior del aguacate al momento del corte o rebanado, durante la obtención de subproductos o la preparación de alimentos, además, los microorganismos pueden ser transferidos a las superficies que entran en contacto como cuchillos, mesas y manos de los manejadores del fruto, y operar como mecanismos de contaminación (Martinez-Gonzales *et al.*, 2003; Ragaert, Devlieghere, and Debevere, 2007). La contaminación también puede ocasionarse directamente por un manejador de alimentos portador de tales patógenos (Kendall *et al.*, 2013).

En una investigación realizada por Iturriaga y Fernández-Escartín (1999), con el objetivo de identificar fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en la línea de producción de una planta procesadora de guacamole, reportaron la presencia del patógeno en aguacates enteros, pulpa, producto final y en el equipo con residuos de aguacates, los investigadores sugieren que

a partir del epicarpio del fruto el patógeno pudo ser diseminado a las demás superficies, lo que pudo dar oportunidad a la contaminación cruzada de los subproductos del aguacate.

2.6.3 Frecuencia de bacterias patógenas en el aguacate y subproductos

Se han realizado diversos estudios con el objetivo de determinar la presencia de patógenos bacterianos y grupos de microorganismos que pueden ser asociados con contaminación fecal y sugieren la posible presencia de patógenos entéricos en la superficie del aguacate durante su cultivo y cosecha. En estos estudios se reportó una frecuencia para *E. coli* de 8.0-96.5 %, y para *Salmonella* fue de 2.7-2.8 % (García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011). También, se ha reportado el aislamiento de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* con una positividad del 18.5 % y 0.7 %, respectivamente (Rodríguez-García, 2011), lo que señala que durante la producción primaria del aguacate se pueden ingresar patógenos al fruto. Por lo anterior, el epicarpio del aguacate puede operar como una importante fuente de contaminación de la pulpa del fruto en la etapa de procesamiento (Strydom *et al.*, 2016).

En octubre de 2017, la FDA inició un programa de vigilancia sanitaria de subproductos de aguacate y guacamole de origen nacional e importación, con el objetivo de conocer la frecuencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en estos productos. Se estableció que la recolección de muestras cesaría hasta alcanzar un total de 1 600 muestras (800 nacionales y 800 de importación). El 31 de marzo de 2018 se publicaron resultados preliminares, con un total de 171 muestras nacionales y 55 muestras de importación, en las que se reportó la ausencia de *Salmonella*, en tanto que *Listeria monocytogenes* fue detectada en cuatro muestras de guacamole (2.3 %), tres de origen nacional y una de importación (U.S. FDA, 2018).

En México, Arvizu-Medrano *et al.*, (2001), realizaron un estudio de prevalencia de patógenos y *E. coli* en muestras de guacamole vendido en restaurantes y en puestos de la calle en la ciudad de Querétaro. Se reportó una prevalencia para *Salmonella* spp. del 1.3 %, 16 % para *L. monocytogenes* y del 60 % para *E. coli*, los recuentos de esta última bacteria estuvieron en un rango de 29 a 3 800 NMP/g. Estos resultados evidenciaron deficiencias en las condiciones sanitarias durante la preparación del alimento y un probable abuso de la temperatura de almacenamiento.

La información sobre la frecuencia de patógenos en el aguacate y subproductos es necesaria para el desarrollo y sustento de normas y procedimientos de inocuidad alimentaria, enfocados en la prevención de la contaminación, con el objetivo de preservar la salud de los consumidores.

2.7 Supervivencia y crecimiento de patógenos en el aguacate y subproductos

Los microorganismos presentes en la superficie de diversas frutas pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo, o incluso multiplicarse si disponen de nutrientes y agua, un valor de pH y temperatura favorables. Algunos patógenos transmitidos por alimentos, expresan capacidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración, por lo que, durante periodo de almacenamiento pueden alcanzar niveles detectables y comprometer la salud de los consumidores (Beuchat, 2002).

El epicarpio del aguacate Hass puede permitir la supervivencia y desarrollo de patógenos bacterianos durante el almacenamiento a diferentes condiciones de temperatura y tiempo. Rodríguez-Correa (2007) realizó un estudio relacionado con la supervivencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en la superficie de aguacate Hass almacenado a 5 y 25 °C. Los resultados del estudio señalan que, las poblaciones de ambos microorganismos presentaron reducciones a 5 °C. Sin embargo, presentaron la capacidad de sobrevivir durante 72 días.

En otro estudio realizado por Martínez-Chávez (2015), reportó la fuerza de adhesión (S_R) de *Salmonella* y *L. monocytogenes* inoculadas en el epicarpio de aguacate var. Hass almacenado a 5, 12 y 25 °C por 10 días, por medio de la comparación de recuentos de células débil y fuertemente adheridas. De manera general los resultados muestran que, la tendencia para ambos patógenos durante el almacenamiento a las tres temperaturas fue la de mantenerse o disminuir. Sin embargo, en los frutos almacenados a 25 °C la S_R presentó un incremento de 0.23 ± 0.06 a 0.86 ± 0.08 para *L. monocytogenes* y de 0.39 ± 0.07 a 0.92 ± 0.04 para *Salmonella*, por lo que, a mayor temperatura de almacenamiento mayor fuerza de adhesión de las bacterias. Aunado a lo anterior, el aguacate Hass posee un epicarpio rugoso, lo cual favorece la adhesión de las bacterias al epicarpio del fruto (Martínez-Chávez, 2015), ya que un estudio realizado en manzanas, naranjas, aguacates y melón cantaloupe inoculados con *E. coli* O157:H7 demostró

que la rugosidad de las frutas brinda protección a la bacteria y favorece su adhesión (H. Wang, Feng, Liang, Luo, and Malyarchuk, 2009).

Es posible que la supervivencia de bacterias patógenas sobre la superficie del aguacate sea favorecida por la microflora nativa del fruto, ya que el crecimiento de mohos y levaduras tiene efectos proteolíticos que pueden aumentar el pH de los tejidos del fruto y la disponibilidad de nutrientes, lo que aumenta la probabilidad de supervivencia y multiplicación bacteriana (Wade and Beuchat, 2003; Wade, Deak, and Beuchat, 2003). Además, la interacción de patógenos con otros géneros bacterianos como *Pseudomonas*, puede brindarles protección, favorecer su adhesión al epicarpio y la subsecuente formación de biopelículas (Beuchat, 2002; Donnelly, 2001; Hoagland, Ximenes, Ku, and Ladisch, 2018). Tanto *Salmonella* como *L. monocytogenes* tienen la capacidad de formar biopelículas en el epicarpio de aguacate Hass después de 5 días de almacenamiento a 25 °C (Martínez-Chávez, 2015), lo cual, brinda mayor protección a las células bacterianas y aumenta el riesgo para los consumidores, ya que al estar adheridas se dificulta su eliminación y/o remoción al aplicar un tratamiento de descontaminación (Bañuelos-Gutiérrez *et al.*, 2017).

Bañuelos-Gutiérrez *et al.* (2017) realizaron una investigación para evaluar la eficiencia de tratamientos de descontaminación en la remoción de células de *L. monocytogenes* adheridas al epicarpio del aguacate Hass. Los resultados señalan que, tanto el hipoclorito de sodio a 200 ppm como el ácido láctico al 2 % presentaron baja eficiencia en la reducción de *L. monocytogenes* adheridas a la superficie del aguacate, ya que lograron reducir 0.8 y 1.3 log UFC/aguacate, respectivamente. La permanencia de bacterias patógenas en la superficie del aguacate, aún después de aplicar un tratamiento de descontaminación representa un mayor riesgo para la salud de los consumidores, ya que estas células pueden ser transferidas a la pulpa durante el corte del epicarpio (Martínez-González, 2003).

Una vez que las bacterias ingresan a la pulpa del aguacate tienen mayores posibilidades de supervivencia, ya que es un excelente medio de crecimiento para los microorganismos por su alto contenido de lípidos y humedad (0.98 %), así como su baja concentración de carbohidratos y pH cercano a la neutralidad (6.5-6.7) (Iturriaga *et al.*, 2002). *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir en pulpa de aguacate almacenada entre 4 y 7 °C por 15 días y multiplicarse a los 22 °C, presentando un tiempo de generación de 54 y 74 min respectivamente

(Arvizu *et al.*, 2001). Además, *Salmonella enterica* inoculada en pulpa de aguacate almacenada a 10, 15, 20, y 30 °C, presentó un tiempo de adaptación de 22.6, 10.0, 11.5 y 3.2 h respectivamente, lo que indica que a mayor temperatura de almacenamiento es menor el tiempo de adaptación del patógeno (Rezende *et al.*, 2016). Por otro lado, *L. monocytogenes* puede sobrevivir en pulpa de aguacate y guacamole durante 58 semanas a -18 °C, también puede multiplicarse en la pulpa (pH 5.3) almacenada a 22 y de 4 a 7 °C. Las evidencias sugieren que *L. monocytogenes* inoculada en guacamole, muere más rápidamente (48 h) cuando se conserva a 22 °C que entre 4 y 7 °C (15 días) (Iturriaga *et al.*, 2002). La supervivencia o multiplicación de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en la pulpa de aguacate y guacamole evidencian el potencial de estos subproductos para actuar como un vehículo de estos.

2.8 Control de la contaminación del aguacate

La prevención de la contaminación del aguacate fresco por microorganismos causantes de ETA debe iniciar durante la producción primaria. Los programas desarrollados por las autoridades sanitarias se orientan hacia cinco áreas fundamentales: 1) la calidad del agua, 2) el estiércol animal y fertilizantes orgánicos, 3) higiene de los trabajadores, 4) las condiciones de sanidad en el campo, las instalaciones y el transporte, y 5) el rastreo de origen de los frutos.

2.8.1 La calidad del agua

Siempre que el agua entre en contacto con los aguacates representa una fuente de contaminación, ya sea durante el cultivo o en cualquier etapa posterior a la cosecha, por lo que se requieren acciones que reduzcan el riesgo de contaminación, como el uso de agua libre de agentes patógenos, proveniente de un pozo construido correctamente, alejado de áreas asépticas y que se mantenga protegido contra escurrimientos superficiales y del acceso de animales (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017; FDA, 2018). En algunos casos puede ser necesario la aplicación de algún tratamiento de desinfección para el agua de riego, aplicación de pesticidas y fertilizantes, el hidro-enfriamiento, lavado y transporte (Alegbeleye *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2016).

2.8.2 Estiércol animal y fertilizantes orgánicos

Durante el cultivo del aguacate se debe considerar es el almacenamiento y compostaje adecuado del estiércol de animales empleado como abono orgánico, ya que este, pueden introducir una

gran cantidad de agentes patógenos (Alegbeleye *et al.*, 2018; Rodríguez-García, 2011). Por ello, se deben de establecer planes de manejo y aplicación que aseguren que el uso de fertilizantes orgánicos no representa un riesgo potencial en la inocuidad de los frutos. El USDA establece que en caso de que se aplique estiércol crudo, se realice por lo menos 120 días previos a la cosecha y que en medida de lo posible, esta práctica deje de emplearse debido a que, es incierto el tiempo requerido para la segura eliminación de agentes patógenos que suelen estar presentes (FDA, 2018; Suslow, 2003). Además, se debe evitar el acceso de fauna doméstica y silvestre a los campos de cultivo, mediante el control de las fuentes de agua y la aplicación de barreras físicas en el campo, sobre todo en momentos previos a la cosecha (Beuchat, 2006; Castro-Ibáñez *et al.*, 2017; FDA, 2018).

2.8.3 Higiene de los trabajadores

Ragaert *et al.* (2007) señalan que la manipulación humana del aguacate podría considerarse como una de las principales fuentes de patógenos, por lo que es indispensable que el personal que tenga contacto con los frutos esté capacitado sobre los requisitos de higiene y salud como medidas preventivas, así como los procedimientos de saneamiento aplicados en el campo o empaque (FDA, 2018; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999). Se debe evitar que toda persona enferma tenga contacto con los frutos, ya que estas condiciones aumentan el riesgo de contaminación de los productos.

Además de los manipuladores de los frutos, es importante asegurar que todo personal involucrado indirectamente en las distintas etapas de la cadena productiva del aguacate, tales como operadores de equipos, cumplan con los requerimientos de higiene establecidos, como el adecuado lavado de manos o la implementación de guantes desechables para minimizar el riesgo contaminación (Beuchat and Ryu, 1997; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999).

2.8.4 Procesos sanitarios en el campo, las instalaciones y el transporte

Para mantener las condiciones sanitarias adecuadas en el cultivo, empaque, sitios de venta y vehículos de transporte de los aguacates, es indispensable la aplicación de buenas prácticas agrícolas, de higiene y buenas prácticas sanitarias de operación, además de contar con las instalaciones adecuadas en cada una de las etapas de la cadena productiva.

Un mal manejo de los desechos humanos durante el cultivo del aguacate puede incrementar el riesgo de que los patógenos transmitidos por alimentos ingresen a los frutos. Por ello, se debe contar con letrinas y estaciones de lavado de manos distribuidas en el campo de cultivo, que sean de fácil acceso para los trabajadores (Beuchat and Ryu, 1997; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999). En relación con las medidas de higiene, el equipo y los utensilios empleados durante el cultivo y la cosecha deben mantenerse en buenas condiciones en todo momento mediante el lavado y desinfección (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999).

Dentro del empaque se deben tener la delimitación física de las áreas de trabajo, para evitar el ingreso de personal no autorizado que ponga en riesgo la inocuidad de los frutos, ya que a través de la indumentaria se pueden vehiculizar patógenos que pueden llegar a contaminar diversas áreas dentro de las instalaciones del empaque o directamente los aguacates (Rodríguez-García, 2011; Strydom *et al.*, 2016). Es necesario contar con procedimientos de limpieza y desinfección de las instalaciones, equipos y utensilios, para que estos permanezcan limpios previo a su implementación. Además de evitar el ingreso de fauna nociva mediante un control de plagas (FDA, 2018; Strydom *et al.*, 2016).

El empleo de tratamientos de descontaminación en los aguacates, previo a su empaque, es una medida que se realiza en algunos empaques, para reducir el número de microorganismos patógenos, mediante la aplicación de agentes químicos o por métodos físicos (Beuchat and Ryu, 1997; Codex Alimentarius 2009). Rodríguez-García *et al.*, (2011) señala que el ácido láctico 2 % a 55 °C asperjado por 15 s, es efectivo para reducir hasta 3 log UFC/aguacate de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 del epicarpio de aguacates inoculados. Por otro lado, el asperjado de agua electrolizada ácida por 30-60 s seguido del asperjado de agua alcalina por 30 s sobre los frutos inoculados conduce a la reducción de entre 4-5 log UFC/cm² de los tres patógenos.

El transporte de los aguacates a los diferentes puntos de venta y distribución debe realizarse en vehículos previamente lavados y desinfectados que cuenten con sistemas de refrigeración y atmósfera controlada, para evitar la maduración acelerada de los frutos y la pérdida de humedad, además de inhibir o reducir el desarrollo de microorganismos presentes en los aguacates (FDA, 2018; Rezende *et al.*, 2016; Yahia, 2003). Además, el almacenamiento del

aguacate a 25 °C favorece la fuerza de adhesión de *Salmonella* y *L. monocytogenes* al epicarpio y la formación de biopelículas por parte de ambos patógenos, a diferencia de un almacenamiento a 5 °C, la fuerza de adhesión es menor y el desarrollo de los microorganismos es retardado (Martínez-Chávez, 2015).

La comercialización suele ser el último punto de la cadena de comercialización del aguacate previo a su adquisición por parte del consumidor. Para prevenir la contaminación microbiana del aguacate en esta etapa, es necesario mantener las instalaciones de los puntos de venta en libres de suciedad y una distribución que evite la contaminación cruzada, sobre todo las superficies y contenedores utilizados para la exhibición de los frutos (FAO, 2003; FDA, 2009).

Es necesario evitar el contacto y exposición de los aguacates a fuentes de contaminación microbiológica, las cuales pueden ser superficies sucias, el polvo arrastrado por corrientes de viento, insectos, roedores, diversas frutas y vegetales comercializadas en el mismo sitio y la manipulación por parte de portadores de patógenos (Beuchat, 2002). Para ello, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación recomienda la implementación de estantes individuales para cada tipo de producto que funcionen como barrera física, a fin de reducir el riesgo de contaminación de los productos hortofrutícolas. Además, se debe mantener el control de plagas y la adecuada eliminación de basura (Beuchat, 1996; Beuchat and Ryu, 1997; FAO, 2003; FDA, 2009).

Debido a que los aguacates son un fruto perecedero, estos deben ser almacenados bajo condiciones de refrigeración de 3-7 °C durante su comercialización, con lo que se retarda la maduración de los frutos y se prolonga su vida de anaquel de 7 a 9 semanas (Yahia, 2003). Rodríguez-Correa (2007), observó que en aguacates inoculados con *Salmonella* y *L. monocytogenes*, almacenados a 5 °C, se inhibió el crecimiento para ambos patógenos, además se presentó una reducción en el contenido de *Salmonella* de 4.0 log UFC/cm² y para *L. monocytogenes* de 4.9 log UFC/cm². Por lo que, el almacenamiento de los aguacates en refrigeración reduce el riesgo de contaminación y crecimiento microbiano en la superficie de los frutos.

Rezende *et al.*, (2016) realizaron un estudio para evaluar la influencia de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de *Salmonella enterica* inoculada en la superficie de aguacate var. Americana (2.5-3.0 log UFC/g) almacenado a 10, 15, 20 y 30 °C. Para cada temperatura de almacenamiento el patógeno mostró una fase de adaptación de 39.2, 11.8, 10.5 y 1.8 h, una tasa de crecimiento exponencial de 0.01, 0.16, 0.18, 0.44 1/h y una población máxima de 3.3, 4.1, 4.1 y 4.6 log UFC/g, la cual se alcanzó transcurridas 43.3, 12.4, 11.0 y 2.2 h, respectivamente. Por lo anterior, se puede decir que un abuso de la temperatura de almacenamiento de los aguacates exagera la sobrevivencia y crecimiento de patógenos bacterianos en el epicarpio, ya que como se mencionó anteriormente, la temperatura más elevada favorece la fuerza de adhesión de los microorganismos.

2.8.5 Rastreo de origen de los frutos

El contar con un sistema de rastreo del origen de los frutos no puede prevenir que se presenten ETA por consumo de aguacate. Sin embargo, a través de este sistema se puede obtener información que permita identificar en que punto de la cadena alimentaria se presentó la contaminación y tomar acciones correctivas (Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999).

Desde el punto de vista de la salud pública, la rapidez y exactitud del sistema de rastreo en caso de que el aguacate se vea implicado con la presencia de agentes patógenos puede evitar que se presenten brotes, o en caso de que este ocurra, reducir la población de consumidores en riesgo de adquirir la enfermedad. Conjuntamente, contribuye a reducir gastos innecesarios para las autoridades de salud pública. Además, a través de este sistema de rastreo se pueden identificar y reducir las posibles fuentes y mecanismos de contaminación del aguacate a lo largo de su cadena productiva y el desarrollo de acciones preventivas que reduzcan al mínimo la oportunidad de que se presente nuevamente la contaminación microbiana (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017; Salazar-Arriaga and González-Sánchez, 1999).

Por otra parte, conocer bacterias mesófilas aerobias, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli*, mohos y levaduras puede reflejar las condiciones de manejo de los aguacates; incluso *E. coli* puede emplearse como un indicador de una posible contaminación fecal o sugerir la posibilidad de contener patógenos entéricos y su potencial como vehículo de microorganismos patógenos (Beuchat, 2002).

Conocer la carga microbiana en aguacates comercializados en mercados, puede ser útil para adoptar medidas de control que reduzcan el riesgo de contaminación y crecimiento microbiano en la superficie de los aguacates en estos puntos de venta. Además de que la detección directa de patógenos requiere más tiempo, es más costosa, aunado a que las bacterias patógenas en esta matriz poder estar estresadas o distribuidas en bajas concentraciones, lo que dificulta su detección y se pueden reportar falsos negativos.

3. JUSTIFICACIÓN

El aguacate Hass es un fruto que se consume fresco como base o componente de platillos y bebidas en diferentes regiones del mundo. El consumo de aguacate y subproductos contaminados ha sido relacionado con brotes de enfermedades por norovirus, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7. No se han reportado brotes de *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de aguacate. Sin embargo, la presencia de esta bacteria en guacamole, mitades de aguacate y pulpa, ha ocasionado la emisión de alertas sanitarias y el decomiso de estos.

El ingreso de bacterias patógenas a la superficie del aguacate puede presentarse en cualquier punto de la cadena productiva. En un esfuerzo por conocer la distribución de patógenos durante el cultivo y cosecha del aguacate, se han realizado diversas investigaciones para determinar la presencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y el contenido de *E. coli* en el fruto y superficies del ambiente de cultivo. Por otra parte, son escasos los estudios referentes al recuento de bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes y *E. coli*, así como la ocurrencia de patógenos en otros puntos de la cadena productiva del aguacate. El recuento de microorganismos indicadores como *E. coli* puede ser útil para estimar el potencial del aguacate como vehículo de patógenos entéricos, particularmente cuando sus poblaciones están por debajo de niveles detectables. También, las cuentas de bacterias mesófilas aerobias, mohos y levaduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes pueden estar relacionadas con el manejo higiénico del fruto.

En México, los aguacates son ampliamente comercializados en los mercados, los cuales son uno de los principales puntos de venta para el consumidor. En estos establecimientos, los aguacates pueden ser contaminados por patógenos ambientales o provenientes del contenido intestinal de animales y humanos u otras fuentes. Durante su venta son manipulados por vendedores y compradores, y almacenados a temperatura ambiente por varias horas e incluso días. Estas condiciones pueden favorecer la presencia, supervivencia, desarrollo, adhesión y formación de biopelículas por patógenos como *Salmonella* y *L. monocytogenes* en el epicarpio del aguacate, lo que representa serias implicaciones para la inocuidad alimentaria en el procesamiento y preparación de los frutos, ya que los microorganismos de la superficie pueden ser transferidos a la pulpa durante el corte y a otras superficies.

El conocimiento de los niveles de grupos indicadores y la ocurrencia de patógenos puede servir como base para el desarrollo de programas o estrategias dirigidas a preservar la calidad e inocuidad del aguacate.

4. HIPÓTESIS

Los aguacates (*Persea americana* var. Hass) vendidos en mercados, contienen en su epicarpio cuentas elevadas de grupos microbianos y son una fuente de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Los aislamientos de ambas bacterias patógenas poseen resistencia a diversos antibióticos utilizados comúnmente para el tratamiento de salmonelosis y listeriosis.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el contenido de grupos microbianos, así como la ocurrencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* y otras *Listeria* spp., en el epicarpio de aguacates (*Persea americana*, var. Hass) comercializados en mercados.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la frecuencia y recuentos de bacterias mesófilas aerobias, *Enterobacteraceae*, coliformes, *E. coli* y mohos y levaduras en el epicarpio del aguacate.
2. Determinar la ocurrencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. en el epicarpio del aguacate.
3. Identificar los serotipos de *Salmonella* spp., que se logren recuperar del epicarpio del aguacate.
4. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

Se adquirieron 450 piezas de aguacate (*Persea americana*, variedad Hass) en 45 establecimientos de 16 mercados locales de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México, durante el período de julio de 2017 a enero de 2018. Las visitas a los mercados se realizaron quincenalmente. Se compraron 10 aguacates en cada establecimiento, cinco para la determinación de grupos microbianos y *Salmonella* spp. y cinco más para la determinación de *Listeria* spp.

Los frutos se encontraban almacenados a temperatura ambiente (25 °C). Se seleccionaron aguacates de color negro y/o con zonas de color verde, de 200 ± 50 g aproximadamente, sin daño aparente en el epicarpio. Se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente, en bolsas de polietileno cerradas, proporcionadas por el vendedor y colocados de manera separada cada cinco frutos. El análisis microbiológico se realizó no después de 1 h de su obtención.

6.2 Determinación de *Salmonella* spp. y recuento de grupos microbianos

Los aguacates se colocaron individualmente en bolsas de plástico estéril Whirl-Pak (Nasco, Wisconsin, EUA) y se les adicionó 200 ml de agua de peptona tamponada (BPW, por sus siglas en inglés; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA). Cada pieza se agitó en baño de ultrasonido (Fisher Scientific Ultrasonic Bath, México), a una potencia de 300 W y 40 kHz de frecuencia por 1 min (Cabrera *et al.*, 2016). Se prepararon diluciones decimales a partir de los líquidos de enjuague con diluyente de peptona de caseína al 0.1 % (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), para el recuento de grupos microbianos de acuerdo con el procedimiento descrito por Wallace and Hammack (2013), del Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (BAM, FDA, por sus siglas en inglés).

La cuenta de bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli*, mohos y levaduras fue realizada en placas Petrifilm™, (3M™, St. Paul, MN, EUA). Las placas

para el recuento de mesófilos y *E. coli*, se incubaron a 35 °C durante 48 h (LabCare America, BOD815, EUA), mientras que las placas para *Enterobacteriaceae* y coliformes, se incubaron a 35 °C por 24 h y para mohos y levaduras a 25 ± 2 °C por 5 días. El recuento de colonias se realizó con ayuda de un contador de colonias (Solbat, Q-20, México), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados para cada grupo microbiano fueron expresados en log UFC/pieza.

La bolsa con el fruto y el líquido de enjuague restante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h para la determinación de *Salmonella*. Posteriormente se filtró el líquido de enjuague con un equipo para filtración al vacío (Bomba Millipore, WP6211560, EUA) a través de una membrana de celulosa de 45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Germany). Cada membrana se colocó en 50 ml de BPW y se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 h. Se transfirieron 1 ml y 0.1 ml a tubos con 10 ml de caldo tetrionato verde brillante (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) y 10 ml de caldo Rapaport-Vassiliadis R10 (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), respectivamente. Se incubaron a 43 ± 0.2 °C para caldo tetrionato y 42 ± 0.2 °C para Rapaport-Vassiliadis por 24 ± 2 h (Thermo Scientific, 2868, EUA) (Wallace *et al*, 2016). De cada tubo con caldo tetrionato y Rapaport, se tomaron dos gotas biconvexas y se sembraron por estría en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), entérico Hektoen (HE; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) y sulfito de bismuto (SB; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) para el aislamiento de *Salmonella*. Los primeros dos medios se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. En el caso de SB, la incubación se prolongó hasta 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se examinaron las placas y de cada una de ellas se seleccionaron de 3 a 5 colonias con características morfológicas de *Salmonella* para su caracterización bioquímica (Wallace, Jacobson, and Hammack, 2016).

Las colonias presuntivas a *Salmonella* se probaron para la fermentación de lactosa y producción de ácido sulfhídrico (H₂S) en agar triple azúcar hierro (Becton Dickinson de México, Estado de México, México), la descarboxilación de la lisina y producción de H₂S en agar hierro lisina (Becton Dickinson de México, Estado de México, México). Además de la producción de enzima ureasa en caldo urea (Becton Dickinson de México, Estado de México, México). Las colonias que presentaron un perfil bioquímico correspondiente a *Salmonella* se confirmaron mediante aglutinación con antisuero polivalente somático (O) (BD, Becton Dickinson and

Company, Sparks, EUA) (Wallace *at al*, 2016). Los aislamientos con reacciones bioquímicas típicas a *Salmonella* se confirmaron mediante el análisis del gen *invA* por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

6.3 Determinación de *Listeria* spp. e identificación de especies.

El aislamiento de *Listeria* spp., se realizó siguiendo el protocolo del Departamento de Agricultura de EUA (USDA, 2017). Cada fruto se colocó en una bolsa estéril y se le adicionaron 200 ml de caldo Universidad de Vermont modificado (UVM; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA). Los aguacates fueron procesados de igual forma que para el análisis de *Salmonella*, hasta la etapa de filtración por membrana, como se describe en la sección 6.2.

Después de la filtración, cada membrana se colocó en 50 ml de caldo UVM y se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Se tomaron dos gotas biconvexas del caldo UVM y se sembraron por estría en medio Oxford Modificado (MOX; Difco™, BD, EUA) y medio Oxford Polimixina Ceftazidima (Martínez-González *et al.*, 2014). Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h y se revisaron para observar el crecimiento de colonias presuntivas a *Listeria*, en caso de no ser evidente el crecimiento, la incubación se prolongó hasta 48 h. También, se transfirió 0.1 ml del caldo UVM a tubos con 10 ml de caldo Fraser (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) que se incubó a 35 °C durante 24 ± 2 h y se examinaron para observar hidrólisis de esculina. La incubación se prolongó 24 h más en caso de no presentar hidrólisis (USDA, 2017). Se tomaron dos gotas biconvexas de caldo Fraser, con o sin hidrólisis de esculina y se sembraron en placas de MOX y PCOM como se mencionó anteriormente y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 h (Martínez-González *et al.*, 2016; USDA, 2017).

De cada placa se eligieron de 3 a 5 colonias con características morfológicas de *Listeria* y se sembraron en placas de agar soya tripticasa adicionado con 0.6 % de extracto de levadura (ASTEL; Difco™, BD, EUA), se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 h. Se seleccionó una colonia de cada placa de ASTEL y se sembró en tubos inclinados con agar base sangre (Columbia agar; Difco™, BD, EUA), que fueron incubados a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Los cultivos puros se sometieron a prueba de catalasa y tinción Gram. Aquellos cultivos que se observaron como bacilos cortos Gram-positivos, catalasa y oxidasa positivos se probaron para observar la movilidad en fresco, crecimiento en forma de sombrilla y producción de H₂S en el

medio SIM (Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), fermentación de lactosa en TSI, oxidación y fermentación de la dextrosa en medio OF (OF; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA), reacción de rojo de metilo y Voges Proskauer (MR-VP; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) y producción de la enzima ureasa. Los cultivos confirmados como miembros del género *Listeria*, fueron probados para la identificación de especies. Para ello se realizó la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP), la reacción de β -hemólisis en placas de agar sangre de carnero (Columbia agar con 5 % de sangre de carnero; Becton Dickinson and Company, Sparks, EUA) y su habilidad de producir ácido a partir de la fermentación de xilosa, ramnosa y manitol, de acuerdo con el protocolo utilizado (USDA, 2017). Los aislamientos con reacciones bioquímicas típicas a *L. monocytogenes*, fueron confirmadas mediante la prueba de PCR, como se describe a continuación.

6.4 Confirmación de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* por PCR múltiple

6.4.1 Extracción de ADN de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*

Las cepas sospechosas a *Salmonella* y *L. monocytogenes* se reactivaron en 3 ml de caldo soya tripticaseína adicionado con 0.6 % extracto de levadura (CSTEL, Difco™, BD, México) a 35 ± 2 °C por 18-24 h. Un volumen de 1.5 ml de cada cultivo se centrifugó a $15\ 000 \times g$ a 4 °C por 5 min (Thermo Fisher Scientific™, Micro 21R, EUA), para sedimentar las células. Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el kit de purificación de ADN genómico a partir de bacterias (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para esta prueba, se utilizaron las cepas de *Salmonella* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* ATCC 19111 como controles positivos y los cuales se procesaron de la misma manera que las muestras.

A los aislamientos de *L. monocytogenes* se les aplicó un pretratamiento antes de continuar con la extracción de ADN, a las células se les adicionaron 300 μ L de solución de resuspensión y 2 μ L de lisozima (100 mg/ml) y se mezclaron por inversión durante 1 min. Se incubaron en termoblock (TD 200 P1, Hera Scientific, Madrid, España) a 37 °C por 60 min, se centrifugaron a $15\ 000 \times g$ a 4 °C por 1 min y el sobrenadante fue desechado.

Para ambos microorganismos, las células se resuspendieron en 300 μ L de solución para lisis y 1.5 μ L de RNasa A (4 mg/ml), se incubaron a 37 °C por 30 min y se llevaron a baño de

hielo por 1 min. De les adicionaron 100 μ L solución para precipitación de proteínas, y se mezclaron vigorosamente con la ayuda de un vortex (Biosan Sia, Letonia) por 30 s y se centrifugaron a 15 000 x g a 4 °C por 5 min.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que con 300 μ L de isopropanol ultra puro (Golden Bell Products, Inc. USA) y se centrifugó a 15 000 x g a 4 °C por 1 min. El sedimento de ADN se enjuagó con 500 μ L de solución buffer de lavado; se centrifugó una vez más a 15 000 x g a 4 °C por 1 min y se descartó el sobrenadante. El ADN se resuspendió con 100 μ L de solución de hidratación y se incubó a 65°C por 1 h. La pureza y la concentración del ADN bacteriano se determinaron usando un espectrofotómetro de UV-visible a 260 nm (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Germany).

6.4.2 PCR múltiple para *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*

La PCR se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Kawasaki *et al.*, (2005), en un volumen total de 50 μ L, que consistió de 2 μ L de ADN molde y 48 μ L de mezcla maestra de PCR compuesta de 1 X de tampón de PCR II, 5,0 mM de MgCl₂, una concentración de 120 nM de cada cebador para detección de *Salmonella* (TS-11: 5'-GTCACGGAAGAAGAGAAATCCGTACG-3'; TS-5: 5'-GGGAGTCCAGGTTGACGGAAAATTT-3') para amplificación del gen *invA*, 100 nM de cada cebador para detección de *L. monocytogenes* (LM1: 5'-CGGAGGTTCCGCAAAGATG-3'; LM2: 5'-CCTCCAGAGT GATCGATGTT-3') para amplificación del gen *hlyA*, 200 mM dATP, dCTP y dGTP, 400 mM dUTP, 0.025 U de AmpliTaq Gold ADN polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA), y 0.05 U de AmpErase UNG (uracil-N-glucosidasa; Applied Biosystems) con un termociclador de ADN (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems).

La PCR se realizó en el termociclador (Aeris™-MB-BG096, Hatboro, EUA) de acuerdo con las siguientes condiciones: un tratamiento de arrastre a 50 °C por 2 min y una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min. Las muestras se sometieron a 40 ciclos de desnaturalización (95 °C/20 s), hibridación (60 °C/30 s) y extensión (72 °C/30 s) y luego se incubaron a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % (Becton Dickinson and Company, Estado de México, México), usando

una solución tamponada de ácido bórico tris-EDTA 10X (pH 7,2) (Ultrapure, Invitrogen) a 100 V. Se utilizó SYBR Green (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) como colorante para teñir el ADN. Para detectar la posición de las bandas, se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 340 nm, las cuales se observaron de color verde fluorescente. El tamaño esperado de los productos de la PCR para *Salmonella* y *L. monocytogenes* fue de 375 y 240 pb respectivamente (Kawasaki *et al.*, 2005).

6.5 Serotipificación de *Salmonella*

De cada muestra de aguacate que arrojó resultados positivos para *Salmonella*, se recuperaron hasta cuatro aislamientos del patógeno. Todos los aislamientos (n=49) se enviaron al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica para identificar serotipos de *Salmonella*, de acuerdo con el esquema de Kauffman-White (Grimont and Weill, 2007).

6.6 Prueba de susceptibilidad a antibióticos de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*

Los aislamientos de *Salmonella* (n=49) y *L. monocytogenes* (n=40) confirmadas por RCP se sometieron a la prueba de susceptibilidad a antibióticos por el método de difusión en agar, de acuerdo con la Guía del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI, 2014).

Para esta prueba, las cepas de *Salmonella* y de *L. monocytogenes* fueron sembradas en ASTEL e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones al 0.5 en la escala de McFarland (108 UFC) con solución salina fisiológica y se sembraron por extensión con un hisopo estéril en placas de agar Mueller-Hinton (MHA, Becton Dickinson and Company de México, Estado de México, México), se dejaron secar en condiciones asépticas durante cinco min y se colocaron los sensidiscos (Oxoid Ltd. Wade Road, Basingstoke, Hants, United Kindom) de los diversos antibióticos (Tabla 5). Las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 se utilizaron como controles para la prueba.

Tabla 5. Antibióticos para la prueba de susceptibilidad de aislamientos de dos bacterias patógenas.

Antibióticos probados para <i>Salmonella</i> spp.	Antibióticos probados para <i>L. monocytogenes</i>
Amikacina (AK) 30 µg/ml	Ampicilina (AM) 10 µg/ml
Ampicilina (AM) 10 µg/ml	Cefalotina (CF) 30 µg/ml
Carbencilina (CB) 100 µg/ml	Cefotaxima (CFX) 30 µg/ml
Cefalotina (CF) 30 µg/ml	Ciprofloxacino (CPF) 5 µg/ml
Cefotaxima (CFX) 30 µg/ml	Clindamicina (CLM) 30 µg/ml
Cloranfenicol (CL) 30 µg/ml	Dicloxacilina (DC) 1 µg/ml
Gentamicina (GE) 10 µg/ml	Eritromicina (E) 15 µg/ml
Netilmicina (NET) 30 µg/ml	Gentamicina (GE) 10 µg/ml
Nitrofurantoína (NF) 30 µg/ml	Penicilina (PE) 10 µg/ml
Norfloxacino (NOF) 10 µg/ml	Tetraciclina (TE) 30 µg/ml
Trimetoprima/sulfametoxazol (STX) 25 µg/ml	Trimetoprima/sulfametoxazol (STX) 25 µg/ml
Fosfomicina (FOS) 50 µg/ml	Vancomicina (VA) 30 µg/ml
Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 3 µg/ml	Kanamicina (K) 30 µg/ml
Cefepima (FEP) 30 µg/ml	Linezolid (LZD) 30 µg/ml
Imipenem (IPM) 10 µg/ml	Oxacilina (OX) 5 µg/ml
Tetraciclina (TE) 10 µg/ml	Azitromicina (AZM) 15 µg/ml
Levofloxacino (LEV) 5 µg/ml	Norfloxacino (NOR) 10 µg/ml
Ampicilina/Sulbactam (SAM) 30 µg/ml	Amikacina (AK) 30 µg/ml
Ertapenem (ETP) 10 µg/ml	Doxiciclina (DO) 30 µg/ml
Piperacilina/tazobactam (TZP) 110 µg/ml	
Minociclina (MH) 30 µg/ml	
Ciprofloxacino (CFX) 5 µg/ml	

Fuente: CLSI, 2014.

Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h y con un vernier, se midió el diámetro (mm) de los halos de inhibición de crecimiento, formados alrededor de cada disco para ser comparados con las referencias del CLSI e identificar si la cepa presentó resistencia (R), un grado intermedio (I) o susceptibilidad (S) al antibiótico. Para *Salmonella*, se tomó como referencia los criterios de interpretación de susceptibilidad para la familia *Enterobacteraceae* y en el caso de *L. monocytogenes*, los criterios de interpretación para *Staphylococcus* spp., ya que no existen referencias del perfil de susceptibilidad para este microorganismo. (Amajoud *et al.*, 2018; CLSI, 2014; de Vasconcelos *et al.*, 2016).

6.7 Manejo de datos

El recuento de grupos microbianos fue reportado en log UFC/aguacate. Las cuentas de los grupos microbianos compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) y se sometieron a la prueba de mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés), para identificar las diferencias estadísticas entre los grupos microbianos. Además, se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para comparar el número de aislamientos confirmados y no confirmados como *Listera* spp., recuperados de MOX y PCOM. El análisis de los datos se realizó con ayuda del programa Statgraphics Centurion XV ver.15.2.06.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacate Hass adquirido en mercados

Un total de 450 aguacates fueron adquiridos en 45 establecimientos ubicados en 16 mercados locales de Guadalajara, Jalisco México, entre julio de 2017 y enero de 2018, de los cuales, se analizaron 225 aguacates para detectar la presencia de *Salmonella* y grupos microbianos y otros 225 para *Listeria monocytogenes*. Los frutos se encontraban almacenados a temperatura ambiente con una media de 22.5 ± 6.0 °C y humedad relativa promedio de 59.3 ± 7.4 %, en todos los establecimientos.

La frecuencia de aislamiento de los grupos microbianos fue 99.5 % para bacterias mesófilas aerobias (BMA), 99.1 % para mohos y levaduras (ML), 84.0 % para *Enterobacteriaceae*, 74.7 % coliformes totales (CT) y 11.5 % para *Escherichia coli* (Tabla 6). La cuenta promedio de BMA fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la cuenta promedio de ML, *Enterobacteriaceae*, CT y *E. coli*. La dispersión de los recuentos fue mayor para CT, seguida de *Enterobacteriaceae*, BMA, ML y *E. coli*. Los recuentos de BMA fueron de 4.3 a 9.0 log UFC/aguacate, de los cuales, el 87 % de las muestras fue de 5.1 a 8.0 log UFC/aguacate (Figura 2), mientras que en el 3 % de los frutos los recuentos oscilaron entre 8.1 y 9.0 log UFC/aguacate. Los recuentos de ML en las muestras fueron de 3.3 a 7.1 log UFC/aguacate, de éstos, un 82 % tuvo cuentas de 4.1 a 6.0 log UFC/aguacate y en el 12 % de 6.1 a 7.1 log UFC/aguacate.

Tabla 6. Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacate Hass adquirido en mercados.

Grupo microbiano	Muestras con niveles contables (%) n=225	Media log UFC/aguacate ^a ±3DS	Cuenta mínima-máxima (log UFC/aguacate)
Bacterias mesófilas aerobias	224 (99.5)	6.2 ^b ±2.8 D	4.3 - 9.0
Mohos y levaduras	223 (99.1)	5.1±2.3 B	3.3 - 7.1
<i>Enterobacteriaceae</i>	189 (84.0)	5.4±3.8 C	3.3 - 8.2
Coliformes totales	168 (74.7)	5.4±4.1 C	3.3 - 8.4
<i>Escherichia coli</i>	26 (11.5)	4.6±2.9 A	3.3 - 6.2

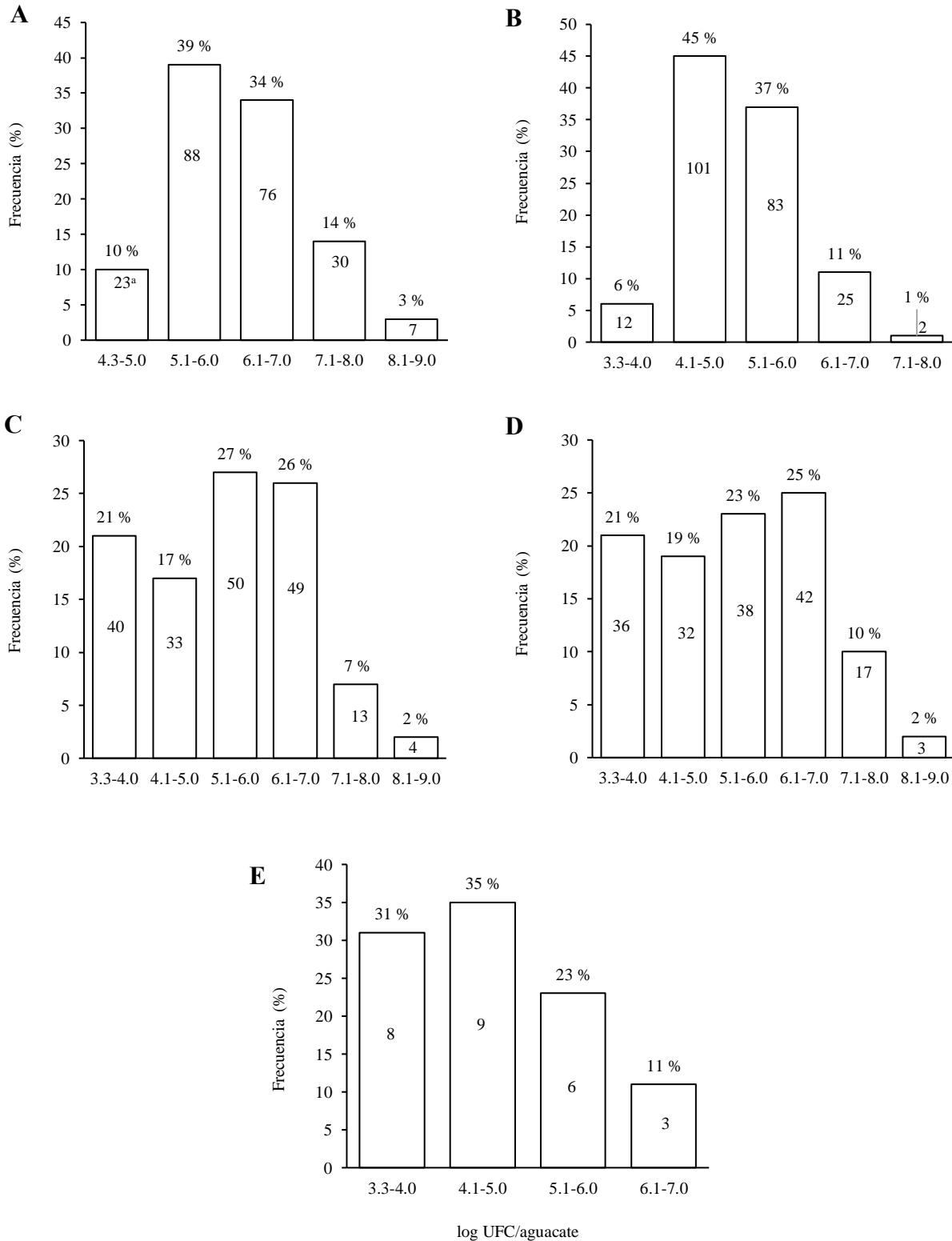
^a El límite mínimo de cuantificación fue 4.3 log UFC/aguacate para bacterias mesófilas aerobias, 3.3 log UFC/aguacate para mohos y levaduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes totales y *E. coli*.

^b Medias en la columna con diferente letra (A, B, C, D) son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y CT no mostraron diferencia significativa ($P>0.05$), con recuentos para estos grupos microbianos entre 3.3 y 8.2 log UFC/aguacate y 3.3 a 8.4 log UFC/aguacate, respectivamente (Tabla 6). Se observó una concentración de *Enterobacteriaceae* entre 3.3 y 7.0 log UFC/aguacate en el 91.0 % de las muestras, mientras que cuentas de 7.1 a 8.2 log UFC/aguacate se presentaron en el 9.0 % de los frutos (Figura 2). De manera similar, se observaron niveles de CT de 3.3 a 7.0 log UFC/aguacate en el 88.0 % de la superficie de las muestras, en tanto que, se encontraron recuentos de 7.1 a 8.4 log UFC/aguacate en el 12.0 % de las muestras. *Escherichia coli* estuvo presente con recuentos entre 3.3 y 6.2 log UFC/aguacate. De estas muestras, el 88 % contenía entre 3.3 y 6.0 log UFC/aguacate y un 12 % presentó cuentas entre 6.1 y 6.2 log UFC/aguacate.

Los estudios sobre la frecuencia y distribución de grupos microbianos en aguacates Hass son escasos y la comparación de los resultados debe ser cuidadosa debido a las diferentes características fisiológicas de los frutos, las condiciones en que se adquirieron las muestras, los métodos de análisis y unidades reportadas (García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011; Rodríguez-Herrera, 2018; Solórzano-Alvarado, 2014). La mayoría de estas investigaciones incluyen recuentos de CT (Rodríguez-García, 2011; Rodríguez-Herrera, 2018; Solórzano-Alvarado, 2014), coliformes fecales (Rodríguez-García, 2011; Solórzano-Alvarado, 2014), y *E. coli* (García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011), con cifras que van desde 0.03 a >10 000 NMP/unidad de muestreo.

En la Figura 2 se puede observar que la distribución de los recuentos para BMA y ML presentan una tendencia hacia el valor de su media (6.1 y 5.1 log UFC/aguacate, respectivamente), mientras que los recuentos de *Enterobacteriaceae*, CT y *E. coli* presentan una distribución más amplia, ya que el número de muestras con cifras cercanas al límite mínimo de cuantificación (3.3 log UFC/aguacate) es similar al número de muestras con recuentos de hasta 7.0 log UFC/aguacate para *Enterobacteriaceae* y CT y de 6.0 log UFC/aguacate en el caso de *E. coli*.



^a Número de muestras en el intervalo indicado.

Figura 2. Distribución de recuentos para bacterias mesófilas aerobias (A), mohos y levaduras (B), *Enterobacteriaceae* (C), coliformes totales (D) y *Escherichia coli* (E) en el epicarpio de aguacates Hass adquiridos en mercados.

La frecuencia y amplia distribución de grupos microbianos observada en la superficie de los aguacates Hass comercializados en mercados puede estar relacionada con la exposición de los frutos a fuentes de contaminación en las diversas etapas de su cadena productiva (Aycicek, Oguz, and Karci, 2006) y/o atribuirse a condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) del aguacate que permiten la proliferación microbiana. Rodríguez-Correa (2007) reportó un incremento en las cuentas de BMA, ML y CT de 1.2, 2.9 y 2.0 log UFC/cm² en el epicarpio de aguacate Hass durante su almacenamiento a 25 °C hasta por 504 h.

Es probable que algunas BMA, ML, *Enterobacteriaceae* y CT formen parte de la microbiota nativa del aguacate, debido a que durante su cultivo los frutos son expuestos a condiciones ambientales. Además, estos grupos microbianos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y comúnmente se han encontrado en niveles variables en frutas y hortalizas (Beuchat, 2006; Beuchat and Ryu, 1997; Li *et al.*, 2017; Seow, Ágoston, Phua, and Yuk, 2012). En Singapur, se reportó una frecuencia del 61.1 % para BMA en la superficie de naranjas vendidas en mercados y supermercados, con recuentos de 3.0 a 5.0 log UFC/g, una frecuencia de 63.6 % para ML con cuentas de 1.0 a 2.0 log UFC/g y del 18.2 % para CT con niveles entre 2.0 y 3.0 log UFC/g (Seow *et al.*, 2012). Li *et al.* (2017) reportaron cuentas de 4.8, 3.3 y 4.4 log UFC/g de BMA, ML y CT, respectivamente, en el epicarpio de melón cantaloupe comercializado en mercados de Virginia y Kentucky, EUA.

La presencia y cuantificación de *Enterobacteriaceae* y CT no necesariamente se relacionan con contaminación fecal, a pesar de que algunas especies de estos grupos microbianos son comunes en heces de animales y humanas (Beuchat and Ryu, 1997; Nasrolahei, Mirshafiee, Kholdi, Salehian, and Nasrolahei, 2017). Debido a que la distribución de estos microorganismos es muy amplia y algunas enterobacterias y coliformes se encuentran comúnmente en el suelo, el agua y alimentos crudos (Alegbeleye, Singleton, and Sant'Ana, 2018; Allen *et al.*, 2013; Beuchat and Ryu, 1997; Mir *et al.*, 2018; Ssemenda *et al.*, 2017). Por tanto, altos recuentos de *Enterobacteriaceae* y CT presentes en aguacates adquiridos en mercados podrían resultar de la exposición directa o indirecta de los frutos a superficies, personas, alimentos, agua y diversos ambientes, o la multiplicación de éstos en los frutos.

Por otro lado, encontrar una dispersión tan amplia en los niveles y recuentos de hasta 6.2 log UFC/fruto de *E. coli* en el epicarpio de aguacates durante su comercialización, puede ser

resultado de la multiplicación del microorganismo en la superficie del fruto o que ha ocurrido una contaminación fecal y la posible presencia de otros microorganismos entéricos, incluidos patógenos (Allen *et al.*, 2013). El nivel de esta bacteria puede emplearse como indicador de la calidad sanitaria de los aguacates, aunque en frutas y hortalizas esta interpretación dependerá de la frecuencia y concentración en la que se encuentre (ICMSF, 2011). *E. coli* posee la capacidad de sobrevivir en ambientes extraintestinales y puede ingresar a los frutos a través de agua contaminada, el contacto con diversas superficies, vectores o por manipulación humana (Allen *et al.*, 2013; Beuchat and Ryu, 1997; Little, Roberts, Youngs, and de Louvois, 1999; Nasrolahei *et al.*, 2017). Nasrolahei *et al.* (2017), en un análisis cualitativo, reportaron el hallazgo de *E. coli* en manos de vendedores de productos hortofrutícolas en Sari, Irán, con una frecuencia del 41.2 %.

La calidad microbiológica en la superficie de los aguacates vendidos en mercados puede ser reflejo de una diversidad de condiciones de manejo higiénico que pueden permitir la contaminación y/o proliferación microbiana. Sin embargo, para la implementación de estos grupos microbianos como indicadores de calidad sanitaria de los aguacates adquiridos en mercados es necesario conocer ampliamente las prácticas de manejo e higiene a las que son sometidos los frutos durante su comercialización y el efecto que dichas prácticas ejerzan sobre el contenido microbiano. Es necesario reforzar las prácticas de higiene y manejo de los aguacates comercializados en mercados y promover la capacitación del manejo higiénico encaminada a reducir los riesgos de contaminación de los frutos y las oportunidades de multiplicación microbiana.

7.2 Ocurrencia de *Salmonella* spp.

La ocurrencia de *Salmonella* en el epicarpio de aguacates comercializados en mercados fue del 3.2 % que correspondieron a ocho frutos, los cuales, se adquirieron en dos mercados (C y N) equivalentes al 12.5 % de los establecimientos visitados. La contaminación de los aguacates con *Salmonella* pudo presentarse desde el cultivo y cosecha, o en cualquier punto de la cadena de comercialización.

Los aguacates en los que se aisló a *Salmonella* presentaron recuentos para BMA desde 5.0 a 7.0 log UFC/aguacate (Tabla 7), para ML de 4.4 a 7.1 log UFC/aguacate y de

Enterobacteriaceae de 3.9 a 7.4 log UFC/aguacate. Siete de las ocho muestras positivas a *Salmonella* tuvieron cifras contables de CT entre 4.0 y 7.2 log UFC/aguacate, mientras que en la muestra restante los CT estuvieron por debajo del límite mínimo de cuantificación (<3.3 log UFC/aguacate). Por lo anterior, se puede decir que estos grupos microbianos se pueden encontrar en niveles variables en el epicarpio de aguacates positivos a *Salmonella* y es probable que su contenido no guarde relación con la positividad del patógeno.

Tabla 7. Contenido de grupos microbianos en el epicarpio de aguacates Hass positivos a *Salmonella*.

Grupo microbiano ^a	Mercado C			Mercado N				
	Aguacates positivos a <i>Salmonella</i>							
	a ^b	b	c	a	b	c	d	e
Bacterias mesófilas aerobias	5.0	6.4	5.5	6.5	7.0	6.3	5.4	5.7
Mohos y levaduras	4.5	5.8	5.4	5.9	7.1	6.0	4.6	4.4
<i>Enterobacteriaceae</i>	3.9	6.1	4.0	6.3	6.8	7.4	4.0	4.4
Coliformes totales	<3.3	4.7	4.0	6.1	6.8	7.2	4.3	4.7
<i>Escherichia coli</i>	<3.3	4.7	<3.3	<3.3	<3.3	<3.3	<3.3	<3.3

^a El límite mínimo de cuantificación fue 4.3 log UFC/aguacate para bacterias mesófilas aerobias, 3.3 log UFC/aguacate para mohos y levaduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes totales y *E. coli*.

^b log UFC/aguacate.

La determinación del contenido microbiano en los alimentos puede ser de gran ayuda para conocer las condiciones de manejo del alimento o si existe la posibilidad de contaminación por patógenos, ya que en la mayoría de los casos, la detección de patógenos en alimentos es más tardada, de mayor costo, además de que las bacterias patógenas pueden estar en niveles bajos y su aislamiento sea limitado por el estrés celular, la flora competitiva o algún componente del alimento que inhiban su crecimiento en los medios de cultivo. En el caso de frutas y hortalizas frescas, el recuento de *E. coli* puede implementarse como indicador de contaminación fecal y la posible presencia de patógenos entéricos como *Salmonella* (ICMSF, 2011). En el presente estudio tanto *E. coli* como *Salmonella* estuvieron ausentes en 192 (85.3 %) de las muestras, sin embargo, en siete aguacates se detectó a *Salmonella* en ausencia de *E. coli* y únicamente en un fruto se encontró a ambos microorganismos con una concentración para *E. coli* de 4.7 log UFC/aguacate. Rodríguez-García (2011), menciona que en su investigación no observó correlación entre el contenido de altas concentraciones de *E. coli* y el hallazgo de salmonellae en aguacates recolectados durante su cultivo y cosecha. Sin embargo, en diversas investigaciones se ha demostrado que a mayor concentración de *E. coli* aumenta la probabilidad

de encontrar a *Salmonella*, por esta razón, en algunos lineamientos internacionales sobre la calidad microbiológica en frutas y hortalizas frescas se continúa implementando el recuento de *E. coli* como un indicador de las condiciones higiénicas de proceso y de la posible presencia de *Salmonella* (ICMSF, 2011).

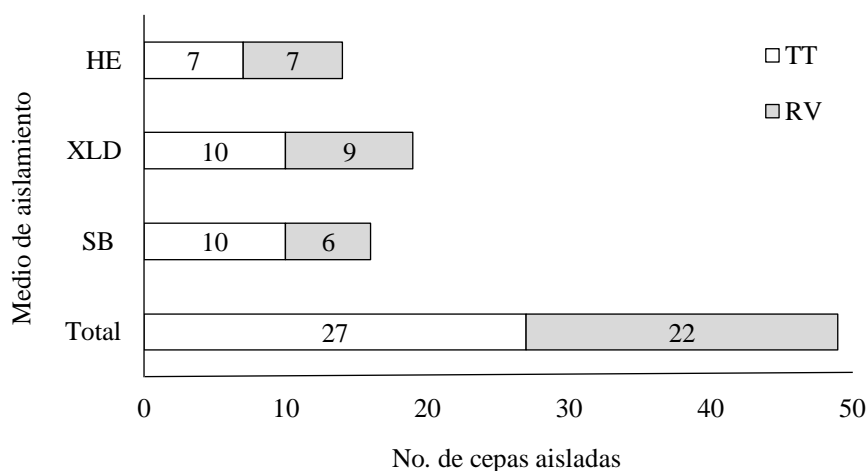
En un estudio similar a la presente investigación, Rezende *et al.* (2016) reportaron la ausencia de *Salmonella* en el epicarpio de 200 aguacates var. americana, adquiridos en mercados de Campinas, San Paulo, Brasil. Aunque, el hecho de que no las encontraron en las muestras analizadas no significa que el microorganismo no pudiera estar presente en el epicarpio de los aguacates. Es posible que las células de *Salmonella* se encontraran fuertemente adheridas al epicarpio de los frutos y se no lograron desprender por medio de la frotación manual durante su enjuague (Martínez-Chávez, 2015), a diferencia de la técnica de agitación en ultrasonido implementada en el presente estudio, la cual ha sido probada para desprender y recuperar células viables de *Salmonella* y *L. monocytogenes* del epicarpio del aguacate (Cabrera-Díaz *et al.*, 2016).

Las posibilidades de que el enteropatógeno ingrese a la superficie de los aguacates comprenden su manejo desde el cultivo, cosecha, transporte y comercialización. Estudios previamente realizados han informado la ocurrencia de *Salmonella* en la superficie de aguacate Hass durante su cultivo y cosecha (García-Sánchez, 2008; Rodríguez-García, 2011). García-Sánchez (2008) reportó la presencia de *Salmonella* en el 2.7 % de los aguacates adquiridos en huertas exportadoras de Michoacán, lo cual, fue muy similar a lo reportado por Rodríguez-García (2011) quién encontró al enteropatógeno en el 2.8 % de los frutos analizados. Por otra parte, Rodríguez-Herrera (2018) aisló a *Salmonella* en el piso de la cámara de refrigeración de un empaque de aguacate. A pesar de que no se detectó al patógeno en el fruto esté se encontró en la última área en que los aguacates son almacenados previo a su comercialización.

Parece ser que la ocurrencia de *Salmonella* en el epicarpio del aguacate suele ser baja, ya que diversas investigaciones han reportado una ocurrencia mayor del patógeno sobre la superficie de otros productos hortofrutícolas adquiridos en mercados. Martínez-González (2003) informó la presencia de *Salmonella* en 5.4 % de naranjas valencia adquiridas en mercados de Guadalajara. En otro estudio, Li *et al.* (2017) observaron una ocurrencia de *Salmonella* en el

10.9 % de muestras de tomate saladette, 18.5 % en chile morrón, 56.3 % en melón cantaloupe y 18.6 % en espinacas.

Se recuperaron en total 49 cepas presuntivas a *Salmonella* spp. de los ocho aguacates positivos al patógeno, de acuerdo con su perfil bioquímico y aglutinación con el antígeno somático (O). Para el aislamiento de este microorganismo se siguió la metodología del BAM de la FDA, en la Figura 3 se muestran las rutas de aislamiento de las cepas de *Salmonella*, a partir del uso de dos caldos de enriquecimiento selectivo, y tres medios de aislamiento selectivo.



TT= caldo tetrionato verde brillante; RV= caldo Rappaport-Vassiliadis; HE= agar entérico de Hektoen; XLD= agar xilosa lisina desoxicolato; SB= agar sulfito de bismuto.

Figura 3. Recuperación de cepas de *Salmonella* spp. naturalmente presentes en el epicarpio de aguacates Hass, de acuerdo con la ruta de aislamiento.

La recuperación de cepas de *Salmonella* según el caldo de enriquecimiento fue similar para ambos medios. A partir del caldo TT se recuperó el 55 % de las cepas, mientras que del caldo RV se recuperó el 45 % de los aislamientos. También se observó una recuperación similar de cepas en los tres medios de aislamiento, ya que a partir del medio XLD se identificaron el 39 %, seguido de SB con 33 % y HE con el 28 %. Es recomendable utilizar más de un medio de enriquecimiento y aislamiento para la determinación de *Salmonella* en alimentos (Wallace, Jacobson, and Hammack, 2016), ya que aumenta las posibilidades de recuperar al patógeno.

La positividad de las 49 cepas de *Salmonella* aisladas del epicarpio de aguacates Hass se confirmó mediante el análisis del gen *invA* por el método de PCR. De acuerdo con el análisis de serotipificación, el InDRE informó que los 49 aislamientos de *Salmonella* pertenecieron al

serotipo Bareilly, lo cual es poco usual, ya que los aislamientos provenían de ocho muestras diferentes, adquiridas en tres puestos de dos mercados. Estos resultados son contrastantes con lo reportado por García-Sánchez (2008), quien encontró los serovares *S. Bardo*, *S. Poona*, *S. Newport*, *S. Agona*, *S. Braenderup* y *S. London* en el epicarpio de aguacate Hass adquirido en dos huertas de Michoacán. En una investigación similar a la anterior, Rodríguez-García (2011) reportó el hallazgo de *S. serogrupo B*, *S. Poona*, *S. Newport* y *S. Infantis* en aguacate cosechado y en el árbol.

De las cepas de *Salmonella* Bareilly recuperadas de aguacates, cinco (10.2 %) pertenecieron a dos aguacates comprados en el local “a” del mercado N, de los cuales no se logró conocer su proveedor y/o procedencia. Cinco (10.2 %) aislamientos más se obtuvieron de tres frutos adquiridos en el local “b” del mismo mercado N, estos tres frutos presentaban etiqueta del distribuidor y provenían del estado de Michoacán. Las 39 (79.6 %) cepas restantes se recuperaron a partir de tres aguacates adquiridos en el local “a” del mercado C y estos frutos provenían del mismo distribuidor que los aguacates comprados en el puesto “b” del mercado N. Se encontró una ocurrencia de *Salmonella* en el mercado N del 62.5 %, mientras que en el mercado C la positividad al patógeno fue del 37.5 %. Sin embargo, la mayoría de las cepas de *Salmonella* Bareilly se aislaron de los tres aguacates adquiridos en el mercado C. Es posible que la contaminación de los aguacates se haya presentado en etapas anteriores a su comercialización en mercados, ya que seis de las ocho muestras positivas a *Salmonella* provinieron del mismo distribuidor y todas las cepas aisladas pertenecieron al mismo serotipo.

Salmonella Bareilly tiene un gran número de hospederos entre los que se encuentran las tortugas, lagartos, sapos, peces, cerdos, aves y ganado bovino (Murugkar, Rahman, Kumar, and Bhattacharyya, 2005; Sharma *et al.*, 1994). Además, este serotipo ha figurado como uno de los 20 serovares más frecuentemente aislados en casos clínicos de salmonelosis en EUA (CDC, 2011). Las principales fuentes en las que se ha identificado a *S. Bareilly* son alimentos de origen animal como atún, pollo, otras especies de peces y carne de res y cerdo (Murugkar *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006), aunque también se ha reportado su hallazgo en otros alimentos como frijol mungo y germinado de soya (TUKOC, 2011).

Aunado a lo anterior, *S. Bareilly* se ha vinculado con brotes de salmonelosis asociados con el consumo de atún crudo raspado (Hoffmann *et al.*, 2016), germinados de soya (Cleary *et*

al., 2010), leguminosas, pollo con ensalada de verduras y ensaladas de vegetales frescos (TUKOC, 2011). Algunos investigadores sugieren que la presencia *S. Bareilly* en productos hortofrutícolas puede estar asociada con la implementación de estiércol de ganado bovino y porcino crudo como fertilizante para los campos de cultivo, ya que estos animales son un reservorio del serotipo y puede ingresar a las frutas y vegetales por diversos mecanismos (Cleary *et al.*, 2010; Murugkar *et al.*, 2005; TUKOC, 2011).

La determinación de serotipos de *Salmonella* ha sido la base de la vigilancia epidemiológica y la investigación de brotes de salmonelosis. Ya que, a partir de la serotipificación se puede realizar el rastreo de fuentes y mecanismos de contaminación por *Salmonella* spp. (CDC, 2002). Sin embargo, este método tiene una especificidad limitada y baja sensibilidad. Es importante realizar estudios de genotipificación o secuenciación de ADN de las 49 cepas de *Salmonella* Bareilly recuperadas en el presente para conocer si pertenecen a una misma línea clonal y/o provienen de la misma fuente de contaminación.

7.2.1 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Salmonella* sp.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* Bareilly aisladas del epicarpio de aguacates, se muestran en la Tabla 8. Se observó que al menos una cepa mostró resistencia a 12 de los 22 antimicrobianos probados, los cuales, son comúnmente utilizados para el tratamiento de salmonelosis e infecciones gastrointestinales causadas por enterobacterias (CLSI, 2014).

Las 49 (100 %) cepas analizadas presentaron resistencia ampicilina/sulbactam, seguido de carbencilina con 13 (26.5 %) cepas resistentes, amikacina 10 (20.4 %), nitrofurantoína 8 (16.3 %), fosfomicina 7 (14.3%) e imipenem con 6 (12.2 %) aislamientos resistentes. En el caso de amoxicilina/ácido clavulánico y cloranfenicol se observaron únicamente dos (4.1 %) de los aislamientos con capacidad de resistir a ambos antimicrobianos (Tabla 8). Sin embargo, cuando se probó la ampicilina sola únicamente uno de los aislamientos mostró resistencia al antibiótico, uno más presentó resistencia media, mientras que los 47 restantes fueron susceptibles al fármaco. Es probable que las cepas de *S. Bareilly* presenten resistencia al sulbactam y que la combinación de ampicilina/sulbactam genere una disminución en la eficacia de la ampicilina para inhibir el crecimiento del patógeno.

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Salmonella* Bareilly aislada del epicarpio de aguacate Hass.

Antibiótico	CMI (µg/ml) ^a	No. de cepas (%) ^b		
		R	I	S
Amikacina	16-64	10 (20.4)	20 (40.8)	19 (38.8)
Ampicilina	2-32	1 (2.0)	1 (2.0)	47 (96.0)
Carbencilina	2-33	13 (26.5)	32 (65.3)	4 (8.2)
Cefalotina	2-32	0 (0.0)	0 (0.0)	49 (100.0)
Cefotaxima	1-4	0 (0.0)	1 (2.0)	48 (98.0)
Cloranfenicol	8-32	2 (4.1)	1 (2.0)	46 (93.9)
Gentamicina	0.5-16	0 (0.0)	8 (16.3)	41 (83.7)
Netilmicina	0.5-17	1 (2.0)	14 (28.6)	34 (69.4)
Nitrofurantoína	32-128	8 (16.3)	0 (0.0)	41 (83.7)
Norfloxacino	4-16	1 (2.0)	2 (4.1)	46 (93.9)
Trimetoprima/sulfametoxazol	10-320	0 (0.0)	0 (0.0)	49 (100.0)
Fosfomicina	64-256	7 (14.3)	0 (0.0)	42 (85.7)
Amoxicilina/ácido clavulánico	8-32	2 (4.1)	2 (4.1)	45 (91.8)
Cefepima	8-33	1 (2.0)	10 (20.4)	38 (77.6)
Imipenem	1-4	6 (12.2)	16 (32.7)	27 (55.1)
Tetraciclina	4-16	0 (0.0)	1 (2.0)	48 (98.0)
Levofloxacino	0.12-2	0 (0.0)	44 (89.8)	5 (10.2)
Ampicilina/Sulbactam	8-32	49 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Ertapenem	0.5-2	0 (0.0)	1 (2.0)	48 (98.0)
Piperacilina/tazobactam	32-64	0 (0.0)	6 (12.2)	43 (87.8)
Minociclina	4-16	0 (0.0)	1 (2.0)	48 (98.0)
Ciprofloxacino	0.06-1	0 (0.0)	46 (93.9)	3 (6.1)

^a Concentración mínima inhibitoria

^b R=resistente, I=intermedio y S=susceptible

El 100 % de las cepas mostró susceptibilidad a cefalotina y trimetoprima/sulfametoxazol, aunque se podría considerar que, en el caso de cefotaxima, tetraciclina, ertapenem y minociclina se podría decir que tuvieron el mismo efecto que los antibióticos anteriores, ya que 48 (98.0 %) fueron susceptibles a los cuatro antibióticos y solo una (2.0 %) presentó resistencia intermedia (Tabla 8). Particularmente, la resistencia intermedia al ciprofloxacino se observó en el 93.9 % de las cepas de *Salmonella*, lo cual es de interés, ya que cabe la posibilidad de que anteriormente las cepas pudieron entrar en contacto con este fármaco y estén desarrollando dicha resistencia.

En particular, la resistencia a un antibiótico de *S. Bareilly* fue menos común que la resistencia múltiple, es decir el 36.7 % de los aislamientos presentó resistencia a un solo antibiótico (Tabla 9), en tanto que, el 63.3 % de los aislamientos fue resistente a dos o más de

los antimicrobianos. De los cuales, el 32.5 % de las cepas presentó resistencia al menos a dos antibióticos, 24.7 % a tres antibióticos, el 4.1 % a cuatro antibióticos y solo el 2.0 %, que correspondió a una cepa, presentó resistencia a cinco antibióticos, los cuales fueron ampicilina/sulbactam + amikacina + ampicilina + carbencilina + imipenem.

Tabla 9. Resistencia múltiple a antibióticos de *Salmonella* Bareilly aislada del epicarpio de aguacates Hass.

Antibióticos ^a	No. de cepas (%)
SAM	18 (36.7)
SAM+AK	1 (2.0)
SAM+CB	8 (16.3)
SAM+FOS	1 (2.0)
SAM+IPM	2 (4.1)
SAM+NF	3 (6.1)
SAM+AK+AMC	1 (2.0)
SAM+AK+CB	1 (2.0)
SAM+AK+CL	1 (2.0)
SAM+AK+IPM	1 (2.0)
SAM+AK+NET	1 (2.0)
SAM+CB+CL	1 (2.0)
SAM+CB+IPM	2 (4.1)
SAM+FEP+FOS	1 (2.0)
SAM+NF+FOS	2 (4.1)
SAM+NOF+FOS	1 (2.0)
SAM+NF+AK+AMC	1 (2.0)
SAM+AK+NF+FOS	2 (4.1)
SAM+AK+AM+CB+IPM	1 (2.0)
Total	49 (100.0)

^a AK= amikacina; AM= ampicilina; CB= carbencilina; CL= cloranfenicol; NET= netilmicina; NF= nitrofurantoina; NOF= norfloxacin; FOS= fosfomicina; FEP= cefepima; IPM= imipenem; AMC= amoxicilina/ácido clavulánico; SAM= ampicilina/sulbactam.

Zhao *et al.* (2006) reportaron la resistencia a múltiples antibióticos de una cepa de *S. Bareilly* recuperada de pescado gudgeon congelado (pez pequeño de agua dulce), proveniente de Vietnam. La combinación de antimicrobianos a los cuales fue resistente *S. Bareilly* fue ampicilina + cloranfenicol + trimetoprima/sulfametoxazol + tetraciclina. Otros autores han encontrado un patrón similar de resistencia (Abatcha, Effarizah, and Rusul, 2018; Murugkar *et al.*, 2005), lo que sugiere un aumento a nivel mundial de la resistencia a los antibióticos comúnmente indicados para el tratamiento de salmonelosis. Algunos autores atribuyen el hallazgo de aislamientos de *Salmonella* resistentes a antibióticos en suelo agrícola o diversos

cultivos a la implementación de heces de animales, a los cuales se les administran antibióticos para la engorda de ganado, sobre todo pollo y cerdos (Abatcha, Effarizah, and Rusul, 2018; Zhao *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Abatcha *et al.* (2018) obtuvieron los siguientes resultados de la prueba de susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de hortalizas de hoja y canales de pollo. La mayor resistencia a los antibióticos fue a la estreptomicina (66.6%), seguida de tetraciclina (44.4%), sulfonamidas (44.4%), ampicilina (26.7%), cloranfenicol (29.1%) y trimetoprima/sulfametoxazol (16.6%). Además, todos los aislamientos de fueron susceptibles a la cefalotina, lo cual fue similar a lo observado por Zhao *et al.* (2006). Estos resultados son contrastantes con los observados en el presente estudio, ya que solo una de las 49 cepas de *S. Bareilly* presentó resistencia a tetraciclina, al igual que para ampicilina y en el caso de cloranfenicol se tuvieron dos aislamientos resistentes. Mientras que, trimetoprima/sulfametoxazol fue uno de los fármacos que inhibió el crecimiento de todas las cepas.

7.3 Ocurrencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Listeria spp. y *L. monocytogenes* se aislaron del 12.4 (31/225) y 8 % (18/225) respectivamente, de los aguacates adquiridos en 16 puestos (35.5 %) del 68.8 % (11/16) de los mercados visitados. Esta ocurrencia es similar a la reportada en otros estudios en frutas y hortalizas como melón cantaloupe, naranja, pepino, zanahoria, así como en otros alimentos comercializados en mercados como carne de res troceada, jugo de naranja recién hecho y queso no pasteurizado estilo mexicano, en los que la frecuencia de aislamiento para *Listeria* spp. osciló entre 12.5-36.0 % y para *L. monocytogenes* del 7.1–33.0 % (Martínez-González *et al.*, 2016; Ponniah *et al.*, 2010).

Se logró identificar cuatro especies de *Listeria*, y se aisló con mayormente a *L. monocytogenes* con una frecuencia del 60 % (18/30), seguido de *L. innocua* con el 53.3 % (16/30), *L. welshimeri* 10 % (3/30) y *L. grayi* con el 6.7 % (2/30) (Tabla 10). La frecuencia de aislamiento de una sola especie de *Listeria* fue del 71.0 % en comparación con aislamientos múltiples que se obtuvieron en el 29.9 % de las muestras positivas (Tabla 11). *Listeria monocytogenes* se recuperó individualmente del 35.5 % (11/31) de las muestras positivas y de

manera simultánea con *L. innocua* en el 22.6 % (7/31); ésta fue la combinación más frecuente. Conocer la distribución de *Listeria* spp. puede ser útil como indicador de condiciones que favorecen la presencia, supervivencia y multiplicación de *L. monocytogenes*, aunque la frecuencia de aislamiento de *Listeria* sp. suele ser mayor que los aislamientos múltiples, se ha reportado la multiplicidad del patógeno con otras especies de *Listeria* en diversos alimentos y al igual que en el presente estudio, la combinación más frecuentemente encontrada fue *L. monocytogenes* + *L. innocua* (Martínez-González *et al.*, 2016).

Tabla 10. Distribución de *Listeria* spp. en el epicarpio de aguacates Hass.

Especies de <i>Listeria</i>	No. de muestras positivas (%) n= 31
<i>L. monocytogenes</i>	18 (58.0)
<i>L. innocua</i>	16 (51.6)
<i>L. welshimeri</i>	3 (9.7)
<i>L. grayi</i>	2 (6.4)

Tabla 11. Multiplicidad de especies de *Listeria* en el epicarpio de aguacates Hass adquiridos en mercados.

Especies de <i>Listeria</i>	No. de muestras positivas (%)
<i>L. monocytogenes</i>	11 (35.5)
<i>L. innocua</i>	8 (25.8)
<i>L. welshimeri</i>	2 (6.4)
<i>L. grayi</i>	1 (3.2)
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	7 (22.6)
<i>L. innocua</i> + <i>L. welshimeri</i>	1 (3.2)
<i>L. innocua</i> + <i>L. grayi</i>	1 (3.2)
Total	31 (100.0)

Diversas investigaciones han demostrado que la presencia de una mayor población de *Listeria innocua* puede enmascarar a *L. monocytogenes*, lo que podría conducir a un resultado falso negativo para la presencia del patógeno (Cornu, Kalmokoff, and Flandrois, 2002; Curiale and Lewus, 1994; Petran and Swanson, 1993). Se han propuesto diferentes explicaciones para esto, como una ventaja de crecimiento más rápido de *L. innocua* comparado con *L. monocytogenes* (Beumer, Te Giffel, Anthonie, and Cox, 1996; Cornu *et al.*, 2002), en contraste con las interacciones inhibitoras entre especies que se han atribuido a la producción de agentes similares a bacteriocinas (Cornu *et al.*, 2002; Gnanou Basse, Audinet, Kérouanton, Colin, and Kalmokoff, 2005). La identificación de *Listeria* spp. a menudo es utilizada por la industria alimentaria como un marcador para detectar condiciones que permiten presencia, crecimiento y persistencia de *L. monocytogenes* (Orsi and Wiedmann, 2016).

La presencia de una o varias especies de *Listeria* en la superficie de los aguacates podría estar influida por la fuente de contaminación y el nivel de saneamiento durante la producción y el manejo del fruto. Durante la presente investigación se observó que los aguacates se mantienen expuestos a temperatura ambiente en los mercados, por lo que, esta práctica podría favorecer el crecimiento de los números iniciales de *Listeria* spp. (Buchanan, Gorris, Hayman and Whiting, 2017; Rodríguez-Correa, 2007) a niveles detectables, y puede aumentar el riesgo de adquirir listeriosis por los consumidores, particularmente cuando se usa aguacate sin un tratamiento que inactive al patógeno.

La contaminación cruzada de los alimentos es otro problema que puede ser causado por el manejo de aguacates contaminados con patógenos en diferentes sitios durante la preparación de alimentos. Strydom *et al.* (2013) mencionan que, durante el procesamiento del aguacate los microorganismos que se encuentran en la superficie del fruto pueden ser una fuente de contaminación de las manos de los trabajadores, mesas de trabajo, utensilios e indumentaria, ya que lograron aislar a *L. monocytogenes* desde la materia prima hasta el producto final, por lo que señalaron que el epicarpio del fruto es una de las principales fuentes de contaminación de la pulpa del aguacate, lo cual sugiere un grave peligro para los consumidores, ya que la pulpa de aguacate o guacamole se comercializa lista para el consumo y no reciben un tratamiento de cocción que contribuya a eliminar patógenos del alimento.

Se obtuvieron un total de 479 aislamientos que presentaron hidrólisis de esculina en los medios MOX y PCOM, de los cuales, el 31.1 % (149/479) fueron confirmados como *Listeria* spp. La proporción de aislamientos que presentaban hidrólisis de esculina no correspondientes al género *Listeria* después de probarlos bioquímicamente (falsos positivos), fue mayor ($P>0.05$) para el medio MOX (71.3 %) en comparación con el medio PCOM (65.7 %) (Tabla 12).

Tabla 12. Aislamientos de *Listeria* spp. de aguacates Hass vendidos en mercados, utilizando agar Oxford modificado (MOX) y Oxford modificado adicionado con polimixina y ceftazidima (PCOM).

No. de aislamientos confirmados a <i>Listeria</i> spp. en ambos medios/Total de aislamientos (%)	No. de aislamientos en MOX			No. de aislamientos en PCOM		
	Confirmados a <i>Listeria</i> spp. (%)	No confirmados a <i>Listeria</i> spp.	Total	Confirmados a <i>Listeria</i> spp. (%)	No confirmados a <i>Listeria</i> spp.	Total
149/479 (31.1)	78 (28.7)	194 (71.3)	272 (56.8)	71 (34.3)	136 (65.7)	207 (43.2)

La selección de colonias con características morfológicas de *Listeria* fue más sencilla en el medio PCOM después de 48 h de incubación a 35 °C, ya que la hidrólisis de esculina en este medio se observó de un color más oscuro y menos difusa en comparación con el MOX, esta característica redujo la confusión entre colonias que hidrolizaban la esculina y aquellas que no y favoreció la selección e identificación de *Listeria* spp. presentes en los aguacates (Figura 4).

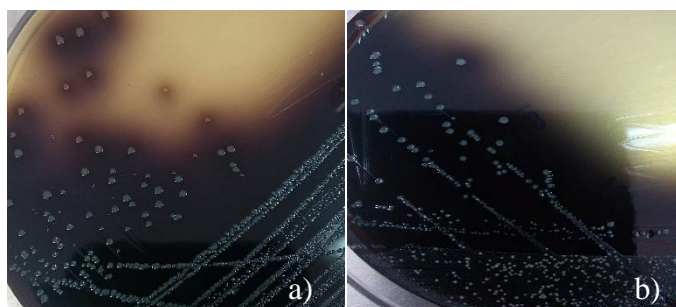
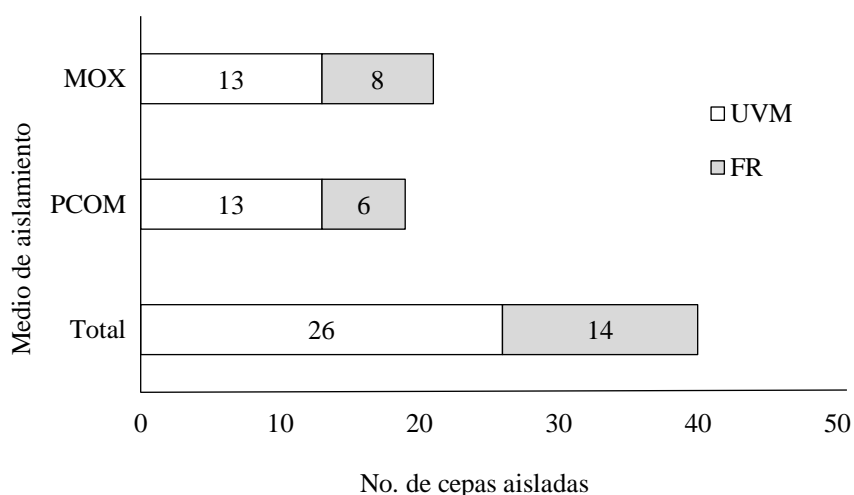


Figura 4. Morfología de colonias de *Listeria*, sembradas por estría a partir de caldo Fraser después de 48 h de incubación. a) agar Oxford modificado (MOX), b) agar Oxford modificado adicionado con polimixina y ceftazidima (PCOM).

Martinez-González *et al.* (2016) compararon la recuperación de *Listeria* spp. en los medios MOX y PCOM en muestras de carne, jugo de naranja no pasteurizado, queso estilo mexicano no pasteurizado y col. Ellos no observaron diferencia significativa ($P>0.05$) entre los medios, de acuerdo con el número de aislamientos falsos positivos. También, el número de aislamientos seleccionados en ambos medios de cultivo confirmados como *Listeria* fue mayor (86.9 %), en comparación con el del presente estudio (31.1 %). Es posible que la microbiota contenida en los aguacates esté conformada por un mayor número de microorganismos con capacidad de hidrolizar la esculina, lo que pudo ocasionar que se tuviera una mayor cantidad de colonias no correspondientes a *Listeria*, aunque la capacidad para identificar la morfología de las colonias presuntivas a *Listeria* dependerá siempre de la experiencia y capacidades de cada analista.

De las 18 muestras positivas a *L. monocytogenes* se recuperaron 40 cepas que fueron confirmadas por PCR. La recuperación de cepas de esta especie fue similar en ambos medios de aislamiento con el 52.5 % para MOX y 47.5 % para PCOM. Además, para ambos medios de aislamiento la frecuencia de recuperación del patógeno fue significativamente mayor ($P>0.05$) en la etapa de enriquecimiento primario en el caldo UVM (65.0 %) (Figura 5), lo cual difiere

con lo esperado al emplear la metodología del USDA, ya que se comúnmente se ha reportado una mayor recuperación del patógeno posterior al enriquecimiento selectivo secundario en caldo Fraser. Al-Zeyara *et al.* (2011), realizaron un estudio en ensalada fresca mixta de hojas mixtas, queso Brie francés, queso Camembert, queso de cabra, salami italiano, paté de pollo pasteurizado, carne picada fresca y salmón ahumado envasado, en donde observaron que durante el enriquecimiento selectivo el crecimiento de *L. monocytogenes* fue inhibido por la microbiota de los alimentos, sobre todo aquellas bacterias que comparten características morfológicas como los bacilos ácido lácticos, enterococos y algunas enterobacterias.



UVM= caldo Universidad de Vermont modificado; FR= caldo Fraser; MOX= agar Oxford modificado; PCOM= agar Oxford modificado adicionado con polimixina y ceftazidima.

Figura 5. Recuperación de cepas de *L. monocytogenes* naturalmente presentes en el epicarpio de aguacates Hass, de acuerdo con la ruta de aislamiento.

En tres de las siete muestras en las que se aisló *L. monocytogenes* en conjunto con *L. innocua* en la etapa del enriquecimiento primario, no se logró recuperar a *L. monocytogenes* después del enriquecimiento secundario en caldo Fraser. Se conoce que *L. innocua* tiene una ventaja sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en muestras en las que el contenido de *L. innocua* es más elevado que la especie patógena, y debido a la competencia de nutrientes es probable que *L. monocytogenes* no se desarrolle adecuadamente para lograr su detección por el método tradicional (Beumer *et al.*, 1996; Curiale and Lewus, 1994).

7.3.1 Perfil de susceptibilidad a antibióticos de *L. monocytogenes*

Los resultados de la susceptibilidad a 19 antibióticos de las cepas de *L. monocytogenes* se muestran en la Tabla 13. Se observó resistencia a 16 de los 19 agentes antimicrobianos probados, los cuales son empleados en el tratamiento de toxiinfecciones causadas por *Staphylococcus* y *Enterococcus*, ya que no se cuentan con especificaciones de la resistencia a antibióticos por *L. monocytogenes*.

El 100 % (40) de los aislamientos fue resistente a penicilina, seguido de dicloxacilina con el 97.5 % (39) y oxacilina con el 92.5 % (37) de los aislamientos. Troxler *et al.*, (2000), informaron que *L. monocytogenes* puede presentar una resistencia natural a oxacilina ya que algunas de las cepas del microorganismo no poseen en su membrana la proteína de unión para las penicilinas con una prevalencia del 42 %, lo que explica también la resistencia de las 40 cepas a la penicilina, por lo que son más efectivos para el tratamiento de listeriosis los beta-lactámicos, las cefalosporinas y monobactámicos (Hof, Nichterlein, and Kretschmar, 1997). Aunque se tuvieron algunos aislamientos de *L. monocytogenes* resistentes a los antimicrobianos de uso común para el tratamiento de listeriosis, el 97.5 % de estos presentó susceptibilidad a otros antibióticos como tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, kanamicina, norfloxacino y doxiciclina (Tabla 13).

En el caso de la ampicilina el 72.5 % de los aislamientos presentó resistencia a este antimicrobiano. Estos resultados son mayores a los informados por Rahimi *et al.* (2010), quienes encontraron que el 26.3 % de los aislamientos de *L. monocytogenes* de leche y productos lácteos en Irán fueron resistentes a la ampicilina. Por otra parte, la aparición de *L. monocytogenes* resistentes a la gentamicina, como se observó en este estudio (2 cepas resistentes), ha sido reportado por otros investigadores y esto es de particular importancia, ya que, el antimicrobiano se ha utilizado con éxito para pacientes con listeriosis y la capacidad de resistir este antibiótico podría atribuirse al uso excesivo de aminoglucósidos en medicina veterinaria para el tratamiento de mastitis en ganado lechero (Rahimi *et al.*, 2010; Ebrahim Rahimi, Yazdi and Farzinezhadizadeh, 2012).

Tabla 13. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de *L. monocytogenes* aislada del epicarpio de aguacate Hass.

Antibiótico	CMI (µg/ml) ^a	No. de aislamientos (%) ^b		
		R	I	S
Ampicilina	2-32	29 (72.5)	0 (0.0)	11 (27.5)
Cefalotina	2-32	1 (2.5)	3 (7.5)	36 (90.0)
Cefotaxima	1-4	32 (80.0)	3 (7.5)	5 (12.5)
Ciprofloxacino	1-4	2 (5.0)	1 (2.5)	37 (92.5)
Clindamicina	0.25-8	11 (27.5)	18 (45.0)	11 (27.5)
Dicloxacilina	4-16	39 (97.5)	0 (0.0)	1 (2.5)
Eritromicina	0.25-8	6 (15.0)	1 (2.5)	33 (82.5)
Gentamicina	0.5-16	2 (5.0)	0 (0.0)	38 (95.0)
Penicilina	0.03-0.5	40 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Tetraciclina	1-16	1 (2.5)	0 (0.0)	39 (97.5)
Trimetoprima/sulfametoxazol	10-320	1 (2.5)	0 (0.0)	39 (97.5)
Vancomicina	1-32	9 (22.5)	0 (0.0)	31 (77.5)
Kanamicina	16-64	0 (0.0)	1 (2.5)	39 (97.5)
Linezolid	0.5-8	6 (15.0)	0 (0.0)	34 (85.0)
Oxacilina	1-4	37 (92.5)	1 (2.5)	2 (5.0)
Azitromicina	1-8	2 (5.0)	2 (5.0)	36 (90.0)
Norfloxacino	1-9	1 (2.5)	0 (0.0)	39 (97.5)
Amikacina	16-64	0 (0.0)	0 (0.0)	40 (100.0)
Doxiciclina	1-16	0 (0.0)	0 (0.0)	39 (97.5)

^a Concentración mínima inhibitoria

^b R=resistente, I=intermedio y S=susceptible

Ninguna de las cepas de *L. monocytogenes* presentó resistencia solo a un antibiótico. Los 40 aislamientos presentaron múltiple resistencia, el 37.5 % de las cepas fue resistente a cuatro antibióticos, 30.0 % a cinco antibióticos, 12.5 % a seis antimicrobianos y el 20 % presentó resistencia de 7 a 13 antibióticos (Tabla 14).

Algunas investigaciones han reportado resultados similares de la resistencia de *L. monocytogenes* a la tetraciclina (de Vasconcelos-Byrne *et al.*, 2016; Gómez *et al.*, 2014). De Vasconcelos-Byrne *et al.* (2016), recuperaron una cepa de *L. monocytogenes* de una ensalada de vegetales lista para el consumo. Por su parte, Gómez *et al.* (2014) también lograron aislar una (0.5 %) cepa de *L. monocytogenes* de una superficie de acero inoxidable en una industria de alimentos, la cual presentó resistencia a la tetraciclina y ocho cepas (3.9%) recuperadas de productos cárnicos que presentaron susceptibilidad reducida a la penicilina G. Según los autores, la efectividad de la tetraciclina disminuyó en las últimas décadas debido a la existencia generalizada de genes de resistencia, probablemente debido al uso prolongado de estos

antimicrobianos en la medicina humana y además de su implementación como promotores del crecimiento en animales.

Tabla 14. Resistencia múltiple a antibióticos de *Listeria monocytogenes* aislada del epicarpio de aguacates Hass.

Antibióticos ^a	No. de cepas (%)
PE+DC+FCX+AM	3 (7.5)
PE+OX+DC+AM	3 (7.5)
PE+OX+CFX+AM	1 (2.5)
PE+OX+DC+CFX	8 (20.0)
PE+OX+DC+CFX+AM	9 (22.5)
PE+OX+DC+CLM+CFX	1 (2.5)
PE+OX+VA+DC+CFX	1 (2.5)
PE+OX+LZD+DC+CFX	1 (2.5)
PE+OX+DC+CLM+CFX+AM	2 (5.0)
PE+OX+VA+DC+CFX+AM	1 (2.5)
PE+OX+GE+DC+CFX+AM	1 (2.5)
PE+NOR+OX+DC+CFX+AM	1 (2.5)
PE+OX+VA+DC+CLM+CFX+AM	1 (2.5)
PE+OX+DC+CLM+CPF+CFX+AM	1 (2.5)
PE+OX+LZD+VA+E+DC+CLM+AM	3 (7.5)
PE+AZM+OX+LZD+VA+E+DC+CLM+AM	2 (5.0)
PE+ST+OX+VA+TE+GE+E+DC+CLM+CFP+CFX+CF+AM	1 (2.5)
Total	40 (100.0)

^a AM= ampicilina; CF= cefalotina; CFX= cefotaxima; CPF= ciprofloxacina; CLM= clindamicina; DC= dicloxacilina; E= eritromicina; GE= gentamicina; PE= penicilina; TE= tetraciclina; STX= trimetopina/sulfametoxazol; VA= vancomicina; OX= oxacilina; AZM= azitromicina; NOR= norfloxacin.

La multi-resistencia mayormente observada para los aislamientos fue penicilina + oxacilina + dicloxacilina + cefotaxima + ampicilina, el cual se observó en el 22.5 % de las cepas de *L. monocytogenes*. La ampicilina y la penicilina más gentamicina siguen siendo el tratamiento de elección para la mayoría de los padecimientos de listeriosis. La asociación de trimetoprima y sulfametoxazol se considera una terapia de segunda elección. La vancomicina y la eritromicina también se usan, respectivamente, para tratar la bacteriemia y las mujeres embarazadas con diagnóstico de listeriosis (Charpentier and Courvalin, 1999).

Resulta preocupante que los aislamientos de *L. monocytogenes* recuperados del aguacate vendido en mercados presenten resistencia a diversos antibióticos utilizados comúnmente para el tratamiento de listeriosis en humanos (ciprofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol y la

combinación trimetoprima/sulfametoxazol) (CLSI, 2014), ya que este patógeno puede transmitirse a través del consumo de alimentos, lo que podría implicar un riesgo mayor para los consumidores y complica el manejo clínico de la enfermedad causada por el patógeno.

8. CONCLUSIONES

El epicarpio de aguacates Hass comercializados en mercados contiene niveles variables de grupos microbianos, los cuales son un reflejo de las fuentes y mecanismos de contaminación del fruto en las diferentes etapas de la cadena productiva. Los niveles elevados de los grupos indicadores también pueden estar relacionados con las facilidades para la multiplicación durante el almacenamiento del fruto. En particular, durante la venta de los aguacates se observó que los frutos se conservaban a temperatura ambiente (22.5 ± 6.0 °C) de 8 a 12 h. Además, los aguacates eran colocados en contenedores con rastros de suciedad en ocasiones o en cercanía con productos hortofrutícolas como la lechuga romana, tomate saladette, zanahoria y nopal, los cuales, podrían ser una fuente de microorganismos para los aguacates. Es necesario implementar y desarrollar prácticas sanitarias por el vendedor y comprador durante el manejo del fruto, que contribuyan a reducir los riesgos de contaminación del aguacate.

La ocurrencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* con capacidad de resistir a diversos antibióticos empleados comúnmente en el tratamiento de salmonelosis y listeriosis, sugiere la necesidad de regular el uso de los antibióticos en la producción de alimentos para reducir el riesgo a los consumidores del fruto. También, es importante fomentar campañas para educar al consumidor sobre el manejo higiénico del aguacate en el sitio de uso y consumo con el propósito de reducir su exposición y reducir el riesgo de salmonelosis y listeriosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatcha, M. G., Effarizah, M. E., and Rusul, G. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of Salmonella serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. *Food Control*, 91, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.039>
- Aguilar, G. A. F., Ramírez, M. G., García, A. M., González, R. Y., Navarrete, J. E., Escutia, M. C. S., and Madrigal, J. C. (2005). Identificación de Salmonella spp en agua, melones cantaloupe y heces fecales de iguanas en una huerta melonera. *Medicina Interna de Mexico*, 21(4), 254–258.
- Al-Zeyara, S. A., Jarvis, B., and Mackey, B. M. (2011). The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of Listeria monocytogenes in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.036>
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., and Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177–208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>
- Allen, K. J., Kovacevic, J., Cancarevic, A., Wood, J., Xu, J., Gill, B., ... Mesak, L. R. (2013). Microbiological survey of imported produce available at retail across Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.010>
- Arvizu-Medrano, S. M., Iturriaga, M. H., and Escartín, E. F. (2001). Indicator and pathogenic bacteria in guacamole and their behavior in avocado pulp. *Journal of Food Safety*, 21(4), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2001.tb00322.x>
- Aycicek, H., Oguz, U., and Karci, K. (2006). Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.07.006>
- Bañuelos-Gutiérrez, J. A., Hernández-Padilla, D. B., Martínez-Chávez, L., Martínez-González, N. E., Pérez-Montaña, J. A., Rodríguez-García, M. O., Cabrera-Díaz, E. (2017). Eficiencia De Tratamientos De Descontaminación En La Remoción De Células De Listeria monocytogenes Adheridas Al Epicarpio De Aguacate (Persea americana var. Hass). In *Congreso Latinoamericano del Aguacate*. (pp. 212–219). Ciudad Guzmán, Jalisco.
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4), 413–423. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1)
- Beuchat, L. R. (2006). Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal*,

108(1), 38–53. <https://doi.org/10.1108/00070700610637625>

- Beuchat, L. R., and Ryu, J. H. (1997). Produce Handling and Processing Practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 459–465. <https://doi.org/10.3201/eid0304.970407>
- Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., Anthonie, S. V. R., and Cox, L. . (1996). No TitleThe effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *Food Microbiol. Food Microbiology*, 16, 137–148.
- Brackett, R. E. (1999). Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15(3), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00096-9)
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., C., T. J., and Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Cabrera-Díaz, E., Sandoval-Solano, E. B., Martínez-Chávez, L., Martínez-González, N. E., Gutiérrez-González, P., and Castillo, A. (2016). Effect of Ultrasound in the Recovery of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. Adhered to the Avocado Epicarp (*Persea americana* var. Hass) Stored at Different Temperatures. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 23(Suplement), S154–S155. Retrieved from <https://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authType=crawler&jrnl=01214004&AN=121239234&h=T2GOocnOceNLhVn7aE%2B5BHTt3uVHEYBVU2zYL4sezR%2B0Hii%2BCdTrqFjBsm2MaXuXdViybP0NzmTtrruVy hITzw%3D%3D&andcrl=fandresultNs=AdminWebAuthandresultLo>
- CDC, C. for D. C. and P. (2002). Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Retrieved September 20, 2017, from <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5146a2.htm>
- CDC, C. for D. C. and P. (2011a). *Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en los EE. UU. en el 2011*. Atlanta, Georgia EUA. Retrieved from <https://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/>
- CDC, C. for D. C. and P. (2011b). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado (FINAL UPDATE). Retrieved August 3, 2017, from <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>
- CDC, C. for D. C. and P. (2011c). *National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2011*. Atlanta, Georgia EUA. Retrieved from file:///C:/Users/Ramón/Dropbox/TESIS MAESTRÍA/ARTÍCULOS/CDC, Salmonella-annual-report-2011.pdf
- Charpentier, E., and Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2103–2108. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.10.007>

- Chen, Y., Evans, P., Hammack, T. S., Brown, E. W., and Macarisin, D. (2016). Internalization of *Listeria monocytogenes* in Whole Avocado. *Journal of Food Protection*, 79(8), 1440–1445. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-075>
- Clark, C. G., Farber, J., Pagotto, F., Ciampa, N., Dor, K., Nadon, C., ... Ng, L. K. (2010). Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004. *Epidemiology and Infection*, 138(4), 559–572. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990914>
- Cleary, P., Browning, L., Coia, J., Cowden, J., Fox, A., Kearney, J., ... outbreak control team. (2010). A foodborne outbreak of *Salmonella* Bareilly in the United Kingdom, 2010. *Euro Surveillance*, 15(48), 5–7.
- CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24)*. (CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Ed.). Wayne, PA. EUA: january.
- Cornu, M., Kalmokoff, M., and Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 261–274. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00658-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00658-4)
- Curiale, M., and Lewus, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 57, 1048–1051.
- de Vasconcelos Byrne, V., Hofer, E., Vallim, D. C., and de Castro Almeida, R. C. (2016). Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.033>
- Donnelly, C. W. (2001). *Listeria monocytogenes*: A continuing Challenge. *Nutrition Reviews*, 59(6), 183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07011.x>
- Enríquez-Hernández, S. I. G. (2007). *Detección y cuantificación de Listeria monocytogenes en aguacates (Persea americana, var. Hass) y muestras ambientales de huertas exportadoras de Michoacán*. Universidad de Guadalajara.
- FAO, O. de las N. U. y la A. para la A. (2017). FAOSTAT. Retrieved July 25, 2017, from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Fernández-Escartín, E. (2008a). *Escherichia coli* patógena. In U. A. de Querétaro (Ed.), *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos* (2nd ed., pp. 201–2017). Querétaro, México.
- Fernández-Escartín, E. (2008b). *Listeria monocytogenes*. In U. A. de Querétaro (Ed.), *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos* (2nd ed., pp. 220–245). Querétaro, México.
- Flynn, D. (2018). Hellman recuerda pulpa de aguacate para *Listeria*. Retrieved from file:///C:/Users/Ramón/Documents/TESIS AGUACATES/ARTÍCULOS/Hellman recuerda pulpa de aguacate para *Listeria* _ Noticias de seguridad alimentaria.html#.W-sGR5NKjIU

- FRÖDER, H., GERALDES MARTINS, C., OLIVEIRA DE SOUZA, K. ., LANDGRAF, M., B.D.G.M, F., and DESTRO, M. . (2007). Minimally Processed Vegetable Salads : Microbial Quality Evaluation. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1277–1280. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1277>
- Fulgoni, I. V. L., Dreher, M., and Davenport, A. J. (2013). Avocado consumption. *Nutrition Journal*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-1>
- García-Sánchez, K. R. (2008). *Contaminación por Salmonella y concentración de Escherichia coli en aguacate y muestras del ambiente de huertas exportadoras en Michoacán*. Universidad de Guadalajara.
- Gliessman, S. (2002). *Agroecología. Procesos ecológicos en agricultura sustentable*. (CATIE, Ed.). Turrialba, Costa Rica.
- Gnanou Basse, N., Audinet, N., Kérouanton, A., Colin, P., and Kalmokoff, M. (2005). Evolution of Listeria populations in food samples undergoing enrichment culturing. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 123–134.
- Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J. J., Rota, C., Ariño, A., and Yangüela, J. (2014). Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes and Listeria innocua from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology*, 42, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.017>
- Graça, A., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., and Quintas, C. (2017). Microbiological quality and safety of minimally processed fruits in the marketplace of southern Portugal. *Food Control*, 73, 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.046>
- Grimont, P. A. D., and Weill, F.-X. (2007). *Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 9 th revision*. (Institut Pasteur, Ed.) (9 th). Paris, France.
- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, M. B. N., Guillén-Andrade, H., and Chávez-Bárcenas, A. T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35(9), 647–653. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23-2.11>
- Hoagland, L., Ximenes, E., Ku, S., and Ladisch, M. (2018). Foodborne pathogens in horticultural production systems: Ecology and mitigation. *Scientia Horticulturae*, 236(August 2017), 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.040>
- Hof, H., Nichterlein, T., and Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clinical Microbiology*, 10, 345–357.
- Hoffmann, M., Luo, Y., Monday, S. R., Gonzalez-Escalona, N., Ottesen, A. R., Muruvanda, T., ... Brown, E. W. (2016). Tracing origins of the salmonella bareilly strain causing a food-borne outbreak in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 213(4), 502–508. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv297>
- ICMSF. (2011). *Verification of Environmental Control. Microorganisms in Foods 8*.

- ITURRIAGA, M. H., ARVIZU-MEDRANO, S. M., and ESCARTÍN, E. F. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* in Avocado Pulp and Processed Guacamole. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1745–1749. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1745>
- Iturriaga, M. H., and Fernández-Escartín, E. (1999). Perfil de Contaminación de *Listeria monocytogenes* en una Planta Procesadora de Guacamole Congelado. In Universidad de Guadalajara (Ed.), *I Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos y XVI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos* (p. 1). Guadalajara, Jalisco.
- Kadam, S. S., and Salunkhe, D. K. (1995). Avocado. In *Handbook of fruit science and technology* (1st ed., pp. 363–375). Marcel Dekker, New York.
- Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S. (2005). Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat Samples. *Journal of Food Protection*, 68(3), 551–556. <https://doi.org/15771181>
- Kearney, T. E., Larkin, M. J., and Levett, P. N. (1993). The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(1), 86–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03000.x>
- Kendall, M. E., Mody, R. K., Mahon, B. E., Doyle, M. P., Herman, K. M., and Tauxe, R. V. (2013). Emergence of Salsa and Guacamole as Frequent Vehicles of Foodborne Disease Outbreaks in the United States, 1973–2008. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(4), 316–322. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1328>
- Korir, R. C., Parveen, S., Hashem, F., and Bowers, J. (2016). Microbiological quality of fresh produce obtained from retail stores on the Eastern Shore of Maryland, United States of America. *Food Microbiology*, 56, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.003>
- LEAL-CERVANTES, M. G., ARVIZU-MEDRANO, S. M., MARTÍNEZ-PENICHE, R., MARTÍNEZ-GONZÁLES, N. E., and HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M. (2018). Microbiological Quality and Incidence of *Salmonella* on Cherry Tomatoes at Retail in Querétaro, México. *Journal of Food Protection*, 81(4), 614–618. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-377>
- Lee, J. H., Hwang, J., and Mustapha, A. (2014). Popular ethnic foods in the United States: A historical and safety perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 2–17. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12044>
- Li, K. W., Weidhaas, J., Lemonakis, L., Khouryieh, H., Stone, M., Jones, L., and Shen, C. (2017). Microbiological quality and safety of fresh produce in West Virginia and Kentucky farmers' markets and validation of a post-harvest washing practice with antimicrobials to inactivate *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 79, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.031>
- Little, C., Roberts, D., Youngs, E., and de Louvois, J. (1999). Microbiological quality of retail

imported unprepared whole lettuces: a PHLS Food Working Group Study. Public Health Laboratory Service. *Journal of Food Protection*, 62(4), 325–328. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.325>

Marler, B. (2014). Aguacates retirados después de la prueba positiva de Salmonella. Retrieved July 18, 2018, from http://www.marlerblog.com/case-news/avocados-recalled-after-positive-salmonella-test/#.WW7e14g1_IU

Martínez-Chávez, L. (2015). *Efecto del almacenamiento en la adhesión, colonización y transcripción de genes de respuesta al estrés, virulencia y formación de biopelículas de Listeria monocytogenes y Salmonella sp. en el epicarpio de aguacate (persea americana var. Hass)*. Universidad de Guadalajara.

Martínez-González, N. E. (2003). *Riesgos a la salud por Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp y Listeria monocytogenes asociados a la preparación y consumo de jugo de naranja fresco*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Martinez-Gonzales, N. E., Hernandez-Herrera, A., Martinez-Chavez, L., Rodriguez-Garcia, M. O., Torres-Vitela, M. R., Mota de la Garza, L., and Castillo, A. (2003). Spread of bacterial pathogens during preparation of freshly squeezed orange juice. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1490–1494. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1490>

Martínez-González, N. E., Martínez-Chávez, L., Cabrera-Díaz, E., Martínez-Cárdenas, C., Gutiérrez-González, P., and Castillo, A. (2016). Use of a novel medium, the Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium, for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw or non-pasteurized foods. *Food Microbiology*, 55, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.015>

Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B. N., Greiner, R., and Roohinejad, S. (2018). Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control*, 85, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.006>

Molins, R. (2007). El costo invisible de las enfermedades transmisibles por alimentos. *Comuniica*, 1(11), 40–46.

Murugkar, H. V., Rahman, H., Kumar, A., and Bhattacharyya, D. (2005). Isolation, phage typing and antibiogram of *Salmonella* from man and animals in northeastern India. *Indian Journal of Medical Research*, 122(3), 237–242.

Nasrolahei, M., Mirshafiee, S., Kholdi, S., Salehian, M., and Nasrolahei, M. (2017). Bacterial assessment of food handlers in Sari City, Mazandaran Province, north of Iran. *Journal of Infection and Public Health*, 10(2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.03.006>

NORS-CDC. (2017). *National Outbreak Public Data Tool*. Atlanta, Georgia EUA. Retrieved from <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>

Nousiainen, L. L., Joutsen, S., Lunden, J., Hänninen, M. L., and Fredriksson-Ahomaa, M.

- (2016). Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.020>
- Orsi, R. H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Ortega Tovar, M. Á. (2003). Valor Nutritional De La Pulpa Fresca De Aguacate Hass. *Actas V Congreso Mundial Del Aguacate*, 741–748.
- Pérez, R., Villanueva, S., and Cosío, R. (2005). Introducción En los últimos años , el desarrollo de las propiedades nutricionales de las grasas dietéticas ha creado un. *E-Gnosis*, 3, 0–11.
- Petran, R. L., and Swanson, K. M. J. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 56(7), 616–618.
- Ponniah, J., Robin, T., Paie, M. S., Radu, S., Ghazali, F. M., Kqueen, C. Y., ... Malakar, P. K. (2010). *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. *Food Control*, 21(5), 774–778. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.09.008>
- Quansah, J. K., Kunadu, A. P. H., Saalia, F. K., Díaz-Pérez, J., and Chen, J. (2018). Microbial quality of leafy green vegetables grown or sold in Accra metropolis, Ghana. *Food Control*, 86, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.001>
- Ragaert, P., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.001>
- Rahimi, E., Ameri, M., and Momtaz, H. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of 325 *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*, 2(11), 1448–1452.
- Rahimi, E., Yazdi, F., and Farzinezhadizadeh, H. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from different types of raw meat in Iran. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2223–2227. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-565>
- Reardon, J. (2008). *Chiles jalapeños y serranos: porque cocinarlos si vienen de México*. Retrieved from <http://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/PHYlosAlimentos.pdf.pdf>
- Rezende, A. C. B., Crucello, J., Moreira, R. C., Silva, B. S., and Sant’Ana, A. S. (2016). Incidence and growth of *Salmonella enterica* on the peel and pulp of avocado (*Persea americana*) and custard apple (*Annona squamosa*). *International Journal of Food Microbiology*, 235, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.034>
- Rodríguez-Correa, N. M. (2007). *Sobrevivencia de Listeria monocytogenes, Salmonella y grupos microbianos nativos en el epicarpio de aguacate (Persea americana, var. Hass)*.

Universidad de Guadalajara.

Rodríguez-García, M. O. (2011). *Bases experimentales para el diseño de prácticas agrícolas sanitarias durante el cultivo y la cosecha del aguacate (Persea americana, var. Hass)*. Universidad de Guadalajara.

Rodríguez-García, M. O. (2017). CONTAMINACIÓN MICROBIANA DURANTE LA PRODUCCIÓN Y COSECHA DE AGUACATE (Persea americana CV. HASS) Y TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN DEL EPICARPIO. In *MEMORIAS DEL V CONGRESO LATINOAMERICANO DEL AGUACATE 2017* (pp. 198–211). Ciudad Guzmán, Jalisco.

Rodríguez-Herrera, D. L. (2018). *Determinación de grupos indicadores, Salmonella spp., Listeria spp. y Listeria monocytogenes en un empaque de aguacate según zonas de muestreo*. Universidad de Guadalajara.

Roth, L., Simonne, A., House, L., and Ahn, S. (2018). Microbiological analysis of fresh produce sold at Florida farmers' markets. *Food Control*, 92(May), 444–449. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.030>

SAGARPA. (2015). Michoacán Aporta El 85.9% Del Aguacate En El País. *Boletín Núm: 034*, (034), 2. Retrieved from <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/2015/marzo/Documents/B0342015.PDF%0Ahttp://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/Paginas/B0342015.aspx>

SAGARPA, S. de A. G. D. R. y A. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, Aguacate Mexicano (2017) – SAGARPA Mexico*. Ciudad de México.

Salazar-Arriaga, H. ., and González-Sánchez, R. . (1999). GUÍA DE INOCUIDAD ALIMENTARIA Y SUS IMPLICACIONES PARA LA PRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL AGUACATE 'HASS' MEXICANO H. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 375–387.

Salazar-garcía, S., Experimental, C., Ixcuintla, S., Postal, I. A., Autor, M., Zamora-cuevas, L., ... Vega-lópez, R. J. (2005). Actualización sobre la Industria del Aguacate en Michoacán , México. *Society*, 45–54.

Seow, J., Ágoston, R., Phua, L., and Yuk, H.-G. (2012). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.017>

Sharma, N. C., Bhatia, R., Singh, S., John, P. C., Kumar, S., and Singh, H. (1994). Bacteriophage typing in Salmonella bareilly. *Epidemiology and Infection*, 112(1), 45–49. <https://doi.org/10.1017/S095026880005740X>

SIAP, S. de I. A. y P. (2017). *Atlas Agroalimentario*. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Ed.) (2017th ed.). Ciudad de México: 2017. Retrieved from

<http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/#p=3>

- Simonne, A. H., Nille, A., Evans, K., Marshall, M. R., Toulouse, A. De, Agrobiopole, A. De, ... Cedex, C. (2004). in the United States Based on CDC Foodborne Illness. *Food Protection Trends*, 24(8), 590–604. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Amarat_Simonne/publication/235900696_Ethnic_food_safety_trends_in_the_United_States_based_on_CDC_foodborne_illness_data/links/0deec516ee4bd0b9e6000000/Ethnic-food-safety-trends-in-the-United-States-based-on-CDC-foodbor
- SNIIM, S. N. de I. e I. de M. (2017). Precios del día de hoy (o los más recientes) Aguacate. Retrieved December 7, 2017, from <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PreciosHoy.asp?Cons=DandprodC=9002>
- Solórzano-Alvarado, M. (2014). *Validación del proceso de higienización durante el corte y cosecha de aguacate (Persea americana, variedad Hass)*. Universidad de Guadalajara.
- Ssemanda, J. N., Reij, M., Bagabe, M. C., Muvunyi, C. M., Joosten, H., and Zwietering, M. H. (2017). Indicator microorganisms in fresh vegetables from “farm to fork” in Rwanda. *Food Control*, 75, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.031>
- Strydom, A., Bester, I. M., Cameron, M., Franz, C. M. A. P., and Witthuhn, R. C. (2013). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolated from a South African avocado processing facility using PCR-RFLP and PFGE. *Food Control*, 31(2), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.029>
- Strydom, A., Vorster, R., Gouws, P. A., and Witthuhn, R. C. (2016). Successful management of *Listeria* spp. in an avocado processing facility. *Food Control*, 62, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.043>
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., and Stock, I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(10), 525–535. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00168.x>
- TUKOC, T. U. kindom O. C. T. (2011). *FOODBORNE OUTBREAK OF SALMONELLA BAREILLY IN THE UNITED KINGDOM , 2010 REPORT OF THE UK OUTBREAK CONTROL TEAM AUTHORS : THE UNITED KINGDOM OUTBREAK CONTROL TEAM Specialist Registrar in Public Health*. United Kindom. Retrieved from https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acm1039bareilly.pdf
- U.S. FDA. (2001). Outbreaks traced to FDA-Regulated Foods, 1990–2000. Retrieved July 20, 2018, from <https://www.fda.gov/food/recallsoutbreaksemergencies/outbreaks/ucm272351.htm>
- U.S. FDA. (2008). *Grande Produce, LTD.CO Recalls Jalapeno Peppers, Serrano Peppers, and Avocados Because of Possible Health Risk. Firm Press Release*. Retrieved from

<https://wayback.archive-it.org/7993/20170406122114/https://www.fda.gov/Safety/Recalls/ArchiveRecalls/2008/ucm112470.htm>

- U.S. FDA. (2014). *Information from FDA related to FDA Avocado Sampling*. Silver Spring, MD. Retrieved from <http://www.fda.gov/ForIndustry/ImportProgram/ucm319216.htm>.
- U.S. FDA. (2017a). Expanded Voluntary Recall for Casa Sanchez Foods “Real Guacamole” and to also Include “Spicy Guacamole” Because of Possible Health Risk. Retrieved December 17, 2018, from <http://wayback.archive-it.org/7993/20180126101429/https://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm585795.htm>
- U.S. FDA. (2017b). Import Alert 21-12. Retrieved July 18, 2017, from https://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_65.html
- U.S. FDA. (2018). *FDA Sampling Fresh Herbs, Guacamole and Processed Avocado*. Retrieved from <https://www.fda.gov/Food/NewsEvents/ConstituentUpdates/ucm597356.htm>
- USDA, U. S. D. of A. (2017). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry and egg products, and environmental samples. In USDA (Ed.), *Laboratory Guidebook* (p. 22). Georgia. Retrieved from <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>.
- Viswanathan, P., and Kaur, R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203(3), 205–213. [https://doi.org/10.1078/S1438-4639\(04\)70030-9](https://doi.org/10.1078/S1438-4639(04)70030-9)
- Wade, W. N., and Beuchat, L. R. (2003). Proteolytic fungi isolated from decayed and damaged raw tomatoes and implications associated with changes in pericarp pH favorable for survival and growth of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 66(6), 911–917. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.6.911>
- Wade, W. N., Vasdinnyi, R., Deak, T., and Beuchat, L. R. (2003). Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00250-2)
- Wallace, H. ., Jacobson, A., and Hammack, T. (2016). Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5. *Salmonella*. Retrieved July 15, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
- Wallace, H., and Hammack, T. S. (2013). Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate. Retrieved July 15, 2017, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
- Wang, G., Zhao, T., and Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2567–2560.

- Wang, H., Feng, H., Liang, W., Luo, Y., and Malyarchuk, V. (2009). Effect of surface roughness on retention and removal of *Escherichia coli* O157:H7 on surfaces of selected fruits. *Journal of Food Science*, 74(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00998.x>
- Xu, W., Cater, M., Gaitan, A., Drewery, M., Gravois, R., and Lammi-Keefe, C. J. (2017). Awareness of *Listeria* and high-risk food consumption behavior among pregnant women in Louisiana. *Food Control*, 76, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.009>
- Zhao, S., McDermott, P. F., Friedman, S., Qaiyumi, S., Abbott, J., Kiessling, C., ... White, D. G. (2006). Characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from imported foods. *Journal of Food Protection Food Prot*, 69(3), 500–507. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.3.500>