



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

MÉTODOS DE DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE *SALMONELLA* SPP EN VEGETALES DE HOJA.

Alumna: Carpio Jiménez, Esperanza

Tutor/a: Lucas López, M^a del Rosario

Dpto: Ciencias de la Salud

Marzo, 2021

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Aspectos generales de la Seguridad Alimentaria.	9
1.1.1.- La contribución de la agricultura familiar a la Seguridad Alimentaria y la nutrición.	11
1.1.2.- Formas en que las crisis repercute en la Seguridad Alimentaria.....	11
1.1.3.- Calidad alimentaria en nuestro país.	12
1.1.4.- Importancia de la Seguridad Alimentaria en la actualidad.....	13
1.1.5.- Seguridad alimentaria de productos vegetales.	14
1.2 Vegetales.	16
1.3 Tipos de vegetales.	23
1.3.1.- Frutas y hortalizas más comúnmente implicadas.....	23
1.4 Microorganismos patógenos en vegetales.....	24
1.4.1.- Efectos económicos de los brotes de toxiinfecciones en hortalizas.	26
1.4.2.- Principales microorganismos presentes en vegetales IV Gama.	27
1.4.3.- Factores ecológicos que afectan la supervivencia/desarrollo microbiano en las frutas y hortalizas.....	28
1.5 <i>Salmonella</i> spp.....	28
1.5.1.- Reservorios y distribución.....	33

1.6 Infecciones alimentarias por <i>Salmonella</i> spp.	35
1.6.1.- Datos destacados en el mundo por brotes de <i>Salmonella</i> spp.	35
1.7 Presencia de <i>Salmonella</i> spp en alimentos.	36
1.8 <i>Salmonella</i> spp en vegetales.	38
1.9 Algunos métodos de eliminación de microorganismos.	39
1.10 Prevención y detección de cepas de <i>Salmonella</i> en vegetales.	40
1.10.1.- Rastreo del origen del microorganismo patógeno que ha dado lugar a un brote de intoxicación.	43
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1 Criterios de inclusión.	46
3.2 Estrategia de búsqueda y selección de artículos.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Extracción de datos.	48
4.2 Supervivencia de <i>Salmonella</i> en vegetales de hoja tras someterse a diferentes productos de desinfección.	49
4.2.1.- Evaluación de productos a base de ácidos orgánicos frente a <i>Salmonella</i> spp, en la desinfección de lechuga fresca.....	49
4.2.2.- Estudio de supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en superficies de acero inoxidable ensuciadas con sustancias orgánicas a base de restos de verduras de hoja.....	55
4.2.3.- Comparación de múltiples desinfectantes químicos para reducir <i>Salmonella</i> en hojas de espinaca.	61
4.3 Evaluación de bacteriófagos como antimicrobianos.	64
4.3.1.- Inactivación de diferentes cepas de <i>Salmonella</i> en melón y lechuga mediante un cóctel de bacteriófagos líticos. Estudio de comparación con alimentos como pollo y zanahoria.	65

4.4 Ensayos de detección de <i>Salmonella</i> spp en vegetales de hoja usando diferentes técnicas comerciales y experimentales.....	74
4.4.1.- Estandarización de una PCR para la detección del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp en lechuga.	75
4.4.2.- Ensayo de una PCR en tiempo real con transcriptasa inversa para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i> en lechugas y tomates.	79
5. DISCUSIÓN	87
6. CONCLUSIÓN	92
7. BIBLIOGRAFÍA	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Subnutrición en 2009, por regiones (millones de personas). Creciente aumento desde 2008. -----	10
Figura 2: Dicotomía en el consumo de vegetales. -----	15
Figura 3: Tendencia en el lanzamiento de nuevos productos de Vegetales IV Gama en los últimos 20 años.-----	17
Figura 4: Distribución en porcentaje de las frutas y hortalizas en sus diferentes modos de preparación y conservación. Informe de tendencias y nuevos productos transformados vegetales. -----	18
Figura 5: Enfoque general de prevención de riesgos microbianos durante la producción de hortalizas. -----	41
Figura 6: Diagrama de flujo del proceso de selección de los estudios.-----	48
Figura 7: Efecto lítico de los fagos sobre <i>Salmonella</i> (log UFC/ml) en muestras de pollo contaminadas experimentalmente.-----	70
Figura 8: Efecto lítico de los fagos sobre <i>Salmonella</i> (log UFC/ml) en muestras de zanahoria contaminadas experimentalmente. -----	71
Figura 9: Lechuga variedad mantequilla. -----	75
Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para análisis de reproducibilidad de <i>Salmonella</i> spp. -----	77
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de lechuga inoculada con <i>Salmonella typhimurium</i> sin enriquecimiento. ----	83
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de lechuga inoculada con <i>Salmonella typhimurium</i> después del enriquecimiento. -----	83
Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de tomates inoculados con <i>Salmonella typhimurium</i> sin enriquecimiento. --	84
Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347pb) de tomates inoculados con <i>Salmonella typhimurium</i> después del enriquecimiento durante 6 h. -----	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variedad de alimentos procesados que se usan para elaborar VMP. -----	21
Tabla 2: Especies, subespecies y serovariedades de <i>Salmonella</i> según el sistema de Kauffmann-White. -----	31
Tabla 3: Carga microbiana inicial de <i>Salmonella</i> inoculada en las hojas de lechuga antes de su proceso de desinfección, expresado en UFC/g. -----	51
Tabla 4: Comparación entre los tres desinfectantes orgánicos usados, a diferentes tiempos. -----	52
Tabla 5: Tabla comparativa en relación a la eficacia y la reducción de los diferentes ácidos orgánicos usados como desinfectantes de hojas de lechuga.-----	53
Tabla 6: Resumen de los datos de supervivencia de <i>Salmonella</i> obtenidos en superficies de acero inoxidable ensuciadas con diferentes sustratos de jugos vegetales. -----	56
Tabla 7: Resumen de los datos de supervivencia de <i>E. coli</i> obtenidos en superficies de acero inoxidable ensuciadas con diferentes sustratos de jugos vegetales. -----	58
Tabla 8: Tabla comparativa en relación a la eficacia y la reducción de los diferentes desinfectantes en hojas lechuga. -----	63
Tabla 9: Bacteriófagos utilizados en este estudio. -----	65
Tabla 10: Reducciones logarítmicas entre las diferentes matrices alimentarias con respecto al patógeno <i>Salmonella</i> spp.-----	68
Tabla 11: Cuadro resumen de los artículos usados en la revisión bibliográfica. -----	73
Tabla 12: Recuperación de <i>Salmonella typhimurium</i> de lechuga sin enriquecimiento en agar XLT4 y concentración resultante de ARN extraído. -----	81
Tabla 13: Cuadro resumen de los artículos usados en la revisión bibliográfica. -----	86

RESUMEN

Introducción. Las frutas y hortalizas frescas se constituyen como un componente esencial de la dieta de muchas personas a nivel mundial. Su consumo ha ido en aumento con el paso de los años, persiguiendo una alimentación más sana y equilibrada. *Salmonella* spp es uno de los principales patógenos que causan toxiinfección alimentaria en todo el mundo. Su transmisión a humanos generalmente se produce a través de alimentos y aguas que son usadas como riego de nuestros cultivos. *Salmonella* es un bacilo Gram negativo que se localiza en el aparato gastrointestinal del hombre. Su presencia provoca cuadros gastrointestinales agudos, debido a su capacidad de invasión celular. En consecuencia, surge la necesidad de desarrollar métodos de detección eficaces y fiables. Estos métodos se clasifican en varios grupos, como métodos de cultivo convencionales, ensayos de inmunología, y ensayos PCR. Tras su detección se debe proceder a la eliminación de tal patógeno, por ello se hace indispensable evaluar la eficacia de diferentes técnicas de desinfección como el uso de productos químicos, ácidos orgánicos e incluso la aplicación de bacteriófagos como antibacterianos. **Objetivo:** Realizar una investigación bibliográfica acerca de la presencia del género *Salmonella* en vegetales de hoja, así como los métodos de detección del patógeno y las diferentes técnicas de reducción. **Materiales y métodos:** Así, se han elegido estudios que cumplieran con una serie de parámetros para incluirlos en los resultados. **Resultados:** Gracias a la aplicación de diferentes desinfectantes, como peroxiacético, ozono, productos a base de cloro, etc, se consiguieron reducciones muy significativas de *Salmonella* en alimentos variados como lechuga, lombarda, acelga... Con el uso de ácidos orgánicos se evidenciaron reducciones superiores al 90% en las muestras de lechuga inoculadas con *Salmonella* spp. La eficacia del cóctel de bacteriófagos variaba entre cepas y en alimentos a tratar, y los resultados mostraron que el uso fagos podía reducir las poblaciones de *Salmonella* en tejidos de vegetales. En cuanto a los métodos de detección de *Salmonella*, se considera el más idóneo el uso de PCR para detectar el gen de virulencia del patógeno, llegando incluso a necesitarse una PCR-RT para mejorar su detección.

Palabras clave: Vegetales, *Salmonella*, PCR, desinfección, intoxicación.

ABSTRACT

Introduction. Fresh fruits and vegetables are an essential component of the diet of many people worldwide. The consumption has been increasing over the years, pursuing a healthier and more balanced diet. *Salmonella* spp is one of the main pathogens that cause food poisoning throughout the world. Its transmission to humans generally occurs through food and water that are used to irrigate our crops. *Salmonella* is a Gram negative bacillus found in the gastrointestinal tract of man. Its presence causes acute gastrointestinal symptoms, due to its capacity for cell invasion. Consequently, there is a need to develop efficient and reliable detection methods. These methods are classified into several groups, such as conventional culture methods, immunology assays, and PCR assays. After its detection, this pathogen must be eliminated, therefore it is essential to evaluate the effectiveness of different disinfection techniques such as the use of chemicals, organic acids and even the application of bacteriophages as antibacterials. **Objective:** To carry out a bibliographic investigation about the presence of the *Salmonella* genus in leafy vegetables, as well as the methods for detecting the pathogen and the different reduction techniques. **Materials and methods:** Thus, studies that met a series of parameters have been chosen to include them in the results. **Results:** Thanks to the application of different disinfectants, such as peroxyacetic, ozone, chlorine-based products, etc., very significant reductions of *Salmonella* were achieved in varied foods such as lettuce, red cabbage, chard ... With the use of organic acids, greater reductions were evidenced 90% in lettuce samples inoculated with *Salmonella* spp. The efficacy of the bacteriophage cocktail varied between strains and in foods to be treated, and the results showed that the use of phages could reduce *Salmonella* populations in plant tissues. Regarding *Salmonella* detection methods, the use of PCR is considered the most suitable to detect the virulence gene of the pathogen, even requiring a PCR-RT to improve the detection.

Key words: Vegetables, *Salmonella*, PCR, disinfection, intoxication.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la Seguridad Alimentaria.

Hoy día, la inocuidad alimentaria, es un concepto que implica la protección de la salud del consumidor cuando se preparan alimentos susceptibles de ser consumidos. Este concepto está asociado a todos los riesgos y probabilidades que existen sobre la presencia de patógenos microbianos, toxinas u otro tipo de contaminantes, ya sean físicos o químicos; que pueden afectar a la salud de los consumidores (Tola, J., 2016). Según Tauffer, J et al., (2018) con la aplicación de herramientas para la inocuidad de alimentos, podemos lograr reducir los posibles riesgos de contaminación por los factores mencionados anteriormente; desde el inicio de la producción, incluyendo la distribución. Tales acciones pueden afectar concretamente a la inocuidad de los productos vegetales frescos, ya que, debido al tratamiento en la cosecha, a su alto contenido hídrico y de nutrientes es susceptible a dichos factores.

El concepto de Seguridad Alimentaria surge en la década del 70, y no fue sino hasta los 90, cuando se incorpora el término de inocuidad y se tiene en cuenta la alimentación cultural, pasando la Seguridad Alimentaria a ser un derecho humano. Anteriormente, la Seguridad alimentaria solo estaba basada en la producción y disponibilidad de alimentos que hubiera en el territorio o país perteneciente (FAO, 2011).

Según la FAO, desde 1996, la Seguridad Alimentaria solo se alcanza a nivel individual, cuando todas las personas tienen acceso y disponibilidad a alimentos inocuos y nutritivos, que satisfagan su demanda alimentaria y su cultura, con el fin de desarrollarse activamente y de manera sana. Pese a esto, siempre ha habido controversia entre el derecho a estar protegidos contra el hambre y el derecho a tener una alimentación adecuada. El primero es un derecho fundamental, donde se exige una obligación al estado de asegurar que las personas no mueran de hambre; es decir, los Estados deberán proteger el acceso en todo momento a los alimentos con una

calidad adecuada para llevar una vida saludable. De todo esto nace las asociaciones no gubernamentales que luchan contra la desigualdad entre países y la lucha contra el hambre (FAO, 2011).

El año 2009 fue un año catastrófico para las personas que no podían tener acceso a los alimentos, pues desde ese año, se ha producido un empeoramiento importante de la Seguridad Alimentaria mundial sin precedentes desde 1996. La ralentización de la economía mundial privó a 100 millones de personas al acceso a una alimentación adecuada e inocua. Hubo un aumento notable del hambre en las principales regiones del mundo. En el siguiente gráfico se muestra la subnutrición en 2009:

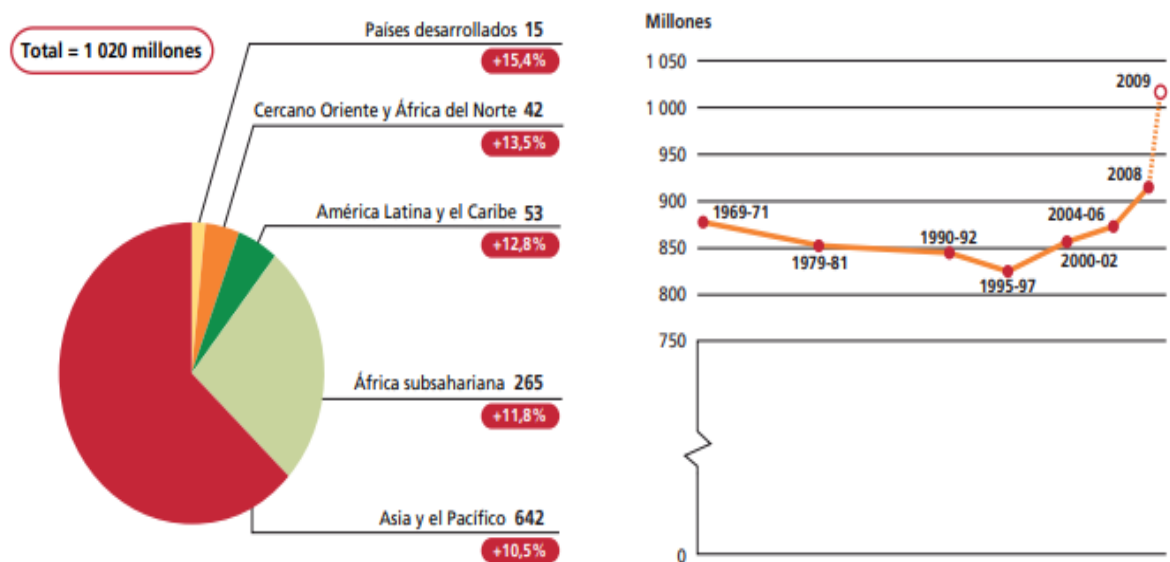


Figura 1: Subnutrición en 2009, por regiones (millones de personas). Creciente aumento desde 2008.

Fuente: FAO, 2009.

Las principales víctimas del aumento pronunciado de la inseguridad alimentaria fueron las zonas urbanas. Éstos no podían producir cosecha y por lo tanto el pago por esos alimentos era insostenible. Además, la crisis de aquel año afectó de manera

catastrófica (por el desempleo). Estos habitantes fueron víctimas de la inseguridad alimentaria. La población rural también se vio afectada en gran medida, ya que estos producían para las grandes urbes, y destinaban toda la producción a aquellos que les ofrecía una mayor compra de sus productos, pero sin obtener gran margen de beneficios (FAO, 2009).

1.1.1.- La contribución de la agricultura familiar a la Seguridad Alimentaria y la nutrición.

Las explotaciones mundiales dirigidas por una reducida familia ascienden a más del 90 %, basándose principalmente en la mano de obra familiar. Estas explotaciones producen un 80 % del total de alimentos en el mundo. Aunque las pequeñas explotaciones agrícolas generan mejores rendimientos de cosecha, la mano de obra es menor y más cara, por lo que la mayoría de los agricultores familiares están en la pobreza y son víctimas de la inseguridad alimentaria. Esto se agrava por la amenaza del uso intensivo que se les dan a los recursos del suelo. Para poder garantizar la Seguridad Alimentaria, se necesitan acuerdos políticos que reconozcan la diversidad de las explotaciones familiares y su gran esfuerzo para formar parte de la cadena de valor. La importancia de la agricultura a pequeña escala es primordial y las políticas agrarias han establecido un objetivo de crecimiento agrícola del 6 % cada año. Los efectos esperados son principalmente la mejora de la Seguridad Alimentaria y la nutrición en todas las regiones, la reducción del desempleo y generación de riqueza (FAO, 2015).

1.1.2.- Formas en que las crisis repercute en la Seguridad Alimentaria.

Las crisis económicas prolongadas (terceros países) afectan y debilitan la Seguridad Alimentaria y la nutrición, ya que repercute en la disponibilidad y el acceso de alimentos. El acceso de las personas a los alimentos se ve alterado durante las crisis por perturbaciones cuando se expropia tierras a las familias. Por ejemplo, cuando el gobierno de un Estado no hace nada para proteger los derechos de las personas, nadie impide expropiarle las tierras a huérfanos o mujeres vulnerables. La inseguridad

alimentaria se agrava todavía más cuando las familias acaban con todas sus reservas de alimentos, y recurre a la explotación indebida y a actividades que perjudican a la tierra a fin de alimentarse inmediatamente (FAO, 2015).

Otra forma de crisis que repercute en la Seguridad Alimentaria son las catástrofes naturales y el cambio climático, es decir, la exposición a catástrofes naturales es la principal causa de la inseguridad alimentaria, problema que se va agravando década a década por el cambio climático. El dato más revelador de ello lo tenemos en la década que va entre 2003 y 2013, donde las catástrofes naturales de los países en desarrollo afectaron a millones de personas. Tras esta década, la FAO calculó que el sector agrícola había sido afectado en un porcentaje de casi el 22 % con respecto al total de las consecuencias económica de esas catástrofes, dato que arroja claramente cómo de afectada quedó la capacidad del sector para contribuir a la seguridad e inocuidad alimentaria.

El cambio climático es un desastre natural inducido por el hombre, y multiplica los riesgos al alterar los fenómenos atmosféricos de precipitaciones y temperatura, así como aumentar la frecuencia de fenómenos extremos como la sequía y las inundaciones. En conjunto, estas exposiciones catastróficas, agravada por el cambio climático, dificultan intensamente el desarrollo de los países y pone en juego su progreso hacia la consecución del objetivo de paliar el hambre. Para disminuir estos peligros naturales se necesita políticas globales para ofrecer respuestas eficaces (FAO, 2015).

1.1.3.- Calidad alimentaria en nuestro país.

El término calidad, entendido como “capacidad de un producto o servicio de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características” (ISO) comprende diferentes tipos de calidad de entre las que se

encuentran la calidad higiénica y sanitaria, la bromatológica, la sensorial u organoléptica, la tecnológica, la ética, y la calidad ligada a la salud.

Hoy día, la calidad higiénica y sanitaria constituye un elemento absoluto innegociable al considerarse esta calidad como un bien que no debe causar enfermedad en el consumidor. Es por esto que la calidad higiénica y sanitaria se defiende dentro de lo conocido como inocuidad o Seguridad Alimentaria. La calidad higiénico-sanitaria se evaluará por la ausencia en el alimento de patógenos, abióticos, etc. que supondrían un riesgo para la salud. En este contexto, los recientes escándalos alimentarios han elevado a la Seguridad Alimentaria a un primer plano en la actualidad española, debido a los últimos casos de brotes por intoxicación alimentaria (Tola, J., 2016).

Nuestra sociedad exige que los gobiernos garanticen en todo momento que los alimentos puestos en el mercado no contengan ingredientes que pongan en juego la salud del consumidor. Pese a esto, aún no se han eliminado las situaciones de crisis que influyen negativamente en el consumidor y en la imagen que éste tiene hacia el sector implicado. Por ejemplo, los recientes brotes de listeriosis y de botulismo en España aumentan la preocupación de las autoridades sanitarias y alimentarias, además de las propias empresas del sector que se han visto empujadas a mejorar e instalar nuevos sistemas de detección de peligros alimentarios, con el consecuente incremento de gastos que ello supone para la empresa (Cantarero, J., 2020).

1.1.4.- Importancia de la Seguridad Alimentaria en la actualidad.

El objetivo principal de los ministerios y consejerías de agricultura es garantizar la Seguridad Alimentaria en toda la población, convirtiéndose éste en un objetivo claro y manifiesto donde el concepto de derecho a la alimentación es un derecho humano fundamental.

De todas formas, los gobiernos no solo tienen que brindar asistencia alimentaria directa sino también deben proporcionar formación y conocimiento para mejorar paulatinamente las condiciones de salubridad alimentaria. Nunca debemos olvidar que la Seguridad Alimentaria y la inocuidad son conceptos que van unidos, no pueden separarse ya que la carencia de uno perjudica al otro (Tola, J., 2016).

Con el fin de garantizar los aspectos de calidad y seguridad, actualmente en España existen leyes y Reales Decretos que regulan la producción de alimentos. A nivel europeo, se regulan por Directivas. En estas normativas legales se exponen las especificaciones propias de cada tipo de alimento, la composición de los mismos, los tratamientos para su producción, y todo lo referido a la higiene y seguridad, así como las infraestructuras de las empresas. Por otro lado, la industria crea sus propias normas con el fin de brindar confianza a sus consumidores, así como prestigio y competitividad. Un tipo de estas normas sería la Organización Internacional de Normalización (ISO) y BRC Global Standard for Food Safety, entre otras. Con el paso del tiempo y la mejora, el sector de producción de alimentos ha crecido de manera muy significativa. Este sector opera internacionalmente y es de gran importancia debido a los constantes cambios de requisitos y modificaciones que se dan en estas empresas (Urrutia, M et al., 2018).

1.1.5.- Seguridad Alimentaria de productos vegetales.

La Seguridad Alimentaria se hace compleja por los riesgos sanitarios existentes, por lo que es indispensable implantar sistemas de trazabilidad que permitan conocer por qué etapas han pasado las distintas materias primas desde la cosecha hasta la mesa; haciéndose necesario la integración en la herramienta de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Estos sistemas existen con el objetivo de mantener siempre la misma calidad del producto que se va a vender, de modo que el consumidor identifique la marca de ese producto con un determinado nivel de calidad (Prieto, M et al., 2008).

Sin embargo, algunos productos alimentarios como son los vegetales varían mucho su calidad, debido a su heterogeneidad, esto representa un problema para la gestión de la calidad en el sector hortofrutícola. Es por esto, que el consumidor exhibe una clara división en relación con el consumo de frutas y hortalizas. Por una parte, son conscientes del efecto protector de la salud que tiene estos alimentos; y, por otra, tienen el recelo de evitar contraer alguna toxiinfección (Véase en la Figura 2).

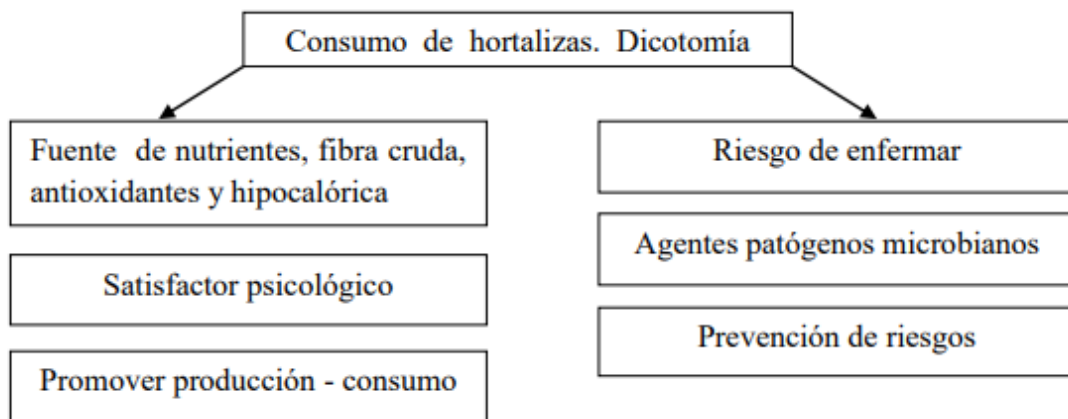


Figura 2: Dicotomía en el consumo de vegetales.

Fuente: Camponovo, M., 2012.

Los parámetros físicos, químicos y microbiológicos son variables según época, cosecha, territorio, etc, y pueden ser modificados durante el procesamiento a lo largo de la cadena productiva (Rivera Vilas, 1995 citado en Prieto, M et al., 2008). Los procedimientos de control se deben realizar en tres puntos críticos para la contaminación de estos productos: durante el cultivo, el procesamiento, y preparación para el mercado. En todos estos momentos las normas deben ser claras, así como su control (Bedregal, P et al., 2001). Sin embargo, aunque adoptemos novedosos sistemas de producción no va a disminuir la heterogeneidad, ya que persiste una variación interna entre lotes fabricados con las mismas condiciones. Es decir, el control de calidad a través de APPCC y demás herramientas no es garantía de la seguridad del producto final para las industrias de vegetales, ya que estos están expuestos a multitud de factores externos, siendo el más importante el de controlar la

refrigeración del producto y el mantenimiento de la cadena de frío; algo fundamental para preservar la estabilidad microbiológica (Prieto, M et al., 2008).

1.2 Vegetales.

Las verduras y las frutas se recomiendan como una importante fuente dietética de micronutrientes, vitaminas y fibras para los seres humanos y son vitales para la salud y el bienestar. (Silveira, J et al., 2017). El consumo de productos frescos es un componente importante de una dieta saludable y equilibrada.

Las hortalizas se consideran alimentos funcionales, puesto que poseen determinadas sustancias que, aunque no sean nutrientes como tal (no aportan energía) tienen un efecto beneficioso sobre las funciones fisiológicas del ser humano, ayudan a su salud (Barragán, P., 2010). Las verduras en general, contiene altas cantidades de nutrientes, y su contenido puede variar de un vegetal a otro, ya que existen una gran cantidad de factores (variedad, grado de madurez, tipo de suelo, uso de fertilizantes, horas de luz, atmósfera) que pueden influir en el producto final. Si bien, la concentración de los nutrientes en vegetales depende de los nutrientes que enriquezcan el suelo donde se ha cultivado el alimento. Esto hace que la composición nutricional de un mismo vegetal producido en distintas regiones sea tan diferente que haga difícil otorgar un valor real de nutrientes en dichos alimentos (Costa, S et al., 2003).

Destacamos los vegetales de hoja verde como una buena fuente de carotenoides; siendo estos pigmentos muy importantes para el metabolismo humano, ya que tienen actividad provitamínica A, son antioxidantes y con los carotenoides se consigue desactivar el oxígeno singulete (elemento mutagénico). También destaca el contenido en clorofilas, que son los pigmentos que dan el característico color verde de las hojas de los vegetales. Son elementos claves en la fotosíntesis, para asimilar energía solar y producir alimentos para si mismas, que luego sirven para alimentar a sus

depredadores. Cabe destacar que las clorofilas también se utilizan como aditivos en la industria alimentaria, para aceites, helados y bebidas azucaradas (Costa, S et al., 2003).

La gran diversidad que existe y el suministro anual de productos frescos ha aumentado en las últimas décadas, siendo los más destacados los vegetales de hoja, en particular las ensaladas preparadas y listas para su consumo (Erickson, M et al., 2019); es por esto, que han sabido ganarse un puesto en los lineales de los supermercados, así como el resto de frutas y verduras, al introducirse en muchos de estos, nuevos productos mezclados que también han ido desarrollándose hasta conseguir un gran cambio en la distribución de los últimos años, gracias a la puesta en el mercado de nuevos productos en constante crecimiento (Figura 3).

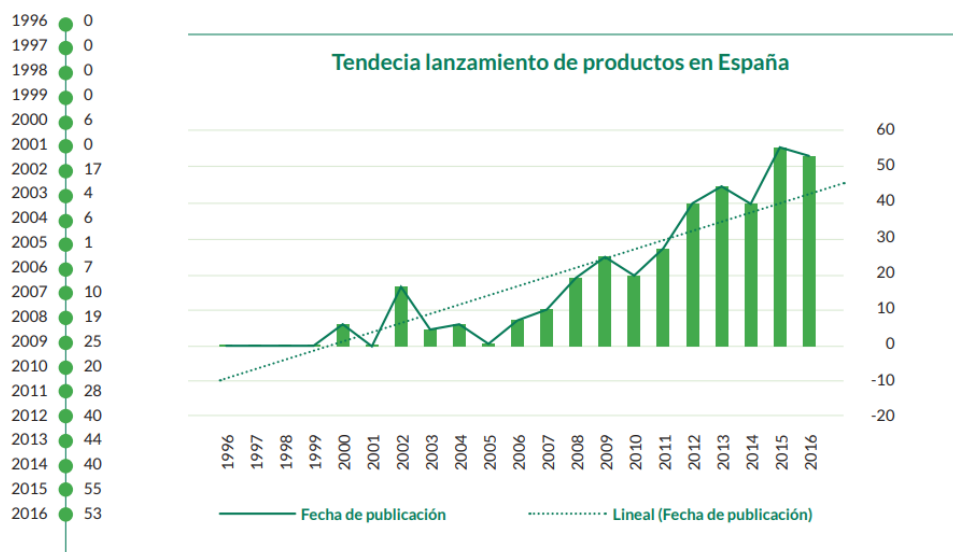


Figura 3: Tendencia en el lanzamiento de nuevos productos de Vegetales IV gama en los últimos 20 años. Informe de tendencias y nuevos productos transformados vegetales.

Fuente: Increa, 2018.

En la figura 4, se observa el reparto de los productos según su modo de preparación, en el que se refleja los diferentes porcentajes en base a lo que el consumidor está demandando.

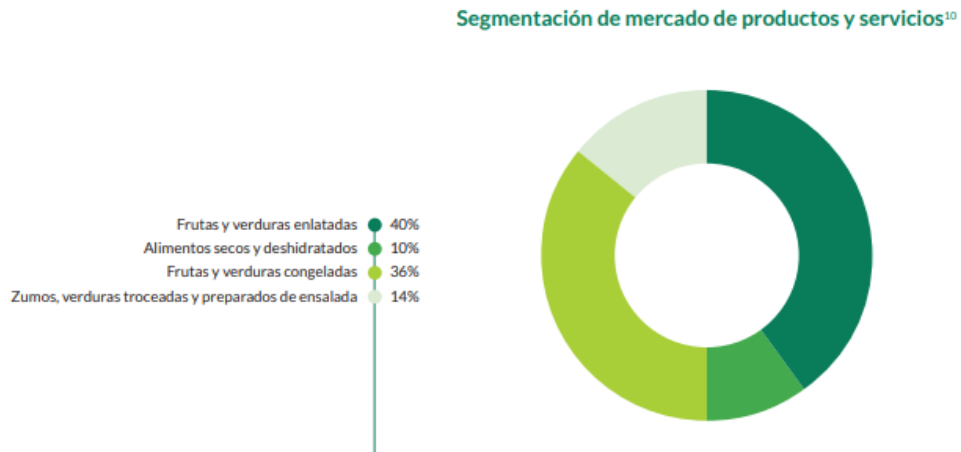


Figura 4: Distribución en porcentaje de las frutas y hortalizas en sus diferentes modos de preparación y conservación. Informe de tendencias y nuevos productos transformados vegetales.

Fuente: Increa, 2018.

Según el Informe del consumo alimentario en España 2019 publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, fuera del hogar se consumieron en España 10,6 kilos de verduras con una disminución del 3,7% con respecto al año anterior. La lechuga fue una de las más consumidas, con una ingesta de 1,7 kilos/persona.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es recomendable consumir como mínimo 400 gramos de productos vegetales por día (OMS, 2003). De hecho, existe evidencia científica de que quién consume esta cantidad de verduras al día tienen menor probabilidad de presentar alguna cardiopatía y tiene menor riesgo de padecer algún tipo de cáncer (Restrepo, L et al., 2013). Sin embargo, hay que tener especial precaución, ya que según la FAO y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el consumo de estos vegetales se asocia continuamente con múltiples casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), debido a la falta de seguridad e

inocuidad alimentaria, destacando las ETA de origen microbiano (Zúñiga, I et al., 2017 citado en Giménez, V et al., 2020).

Por contraste, en nuestro país, el consumo de vegetales no supone ni la mitad de lo recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Es por esto que la industria se ha visto empujada a la revalorización de esos vegetales para promover su consumo (Parzanese, M., 2012).

Debido a esta falta de consumo, nacen los vegetales mínimamente procesados (VMP), promovida también por la falta de tiempo en las familias para cocinar durante mucho tiempo, con estos vegetales se suprime el tiempo que se dedica a la preparación y cocción de estos alimentos (Parzanese, M., 2012). La definición de VMP queda establecida claramente en el artículo de Aguerri-Esparza, I. (2014): son vegetales que sin sufrir modificaciones de las características sensoriales, físico-químicas, y nutricionales aumentan su funcionalidad y facilidad de uso, proporcionando a los consumidores un alimento listo para consumir. Las principales características son (Aguerri-Esparza, I., 2014):

- ✓ Frescura: ya que conservan las propiedades de las frutas y hortalizas en fresco.
- ✓ Comodidad: ya que son productos listos para su consumo sin necesidad de limpieza ni lavado.
- ✓ Salud: al contribuir a llevar una vida sana y equilibrada, debido a las aportaciones positivas de las frutas y hortalizas.

Dentro de los factores más destacables que se espera de este tipo de productos están: que sean de fácil preparación, con una gran vida útil y en formatos de gran variedad de productos y cantidades que se puedan adaptar a los nuevos estilos de vida (Aguerri-Esparza, I., 2014), por último, pero no el menos importante que sean seguros. En

resumen, le pedimos todas las cualidades de un producto fresco junto a las ventajas de los productos industrializados.

Estos productos presentan características organolépticas y nutricionales similares a las frutas y hortalizas frescas y la ventaja de ser fáciles de utilizar por el consumidor. Su mínimo procesamiento consiste en operaciones de clasificación, lavado, pelado, reducción de tamaño, etc., por lo cual se comercializan como productos para consumo directo o para preparaciones culinarias rápidas. Esas características hacen que el tiempo de elaboración ya no resulte un obstáculo para incorporar o aumentar la proporción de vegetales en la dieta. Los VMP son productos que agregan valor a la materia prima, con el objetivo de facilitar su consumo y aumentar su tiempo de vida útil. A diferencia de los vegetales frescos, los VMP pueden comercializarse en grandes volúmenes y tienen la ventaja de que se abastece rápidamente a establecimientos como restaurantes, hoteles, comedores, etc. (Parzanese, M., 2012).

Aunque presenta innumerables ventajas, hay que destacar que dentro de la categoría sigue habiendo vegetales frescos dañados por manipulación poscosecha (lavado, seleccionado, envasado). Por lo que, aunque facilite la vida del consumidor, estos productos no se libran de la susceptibilidad propia de un vegetal fresco.

En la siguiente tabla, (Tabla 1) se muestra la amplia variedad de alimentos procesados que se usan para elaborar VMP.

Tabla 1: Variedad de alimentos procesados que se usan para elaborar VMP.

Producto	Materia prima	Operaciones involucradas en el proceso
Ensaladas	<ul style="list-style-type: none"> • Zanahoria • Lechuga (distintas variedades) • Repollo (distintas variedades) • Escarola • Rúcula • Espinaca 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavado • Pelado • Reducción de tamaño • Picado/rallado • Mezclado • Envasado
Vegetales para sopa	<ul style="list-style-type: none"> • Perejil • Apio • Zanahoria • Papa • Cebolla 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavado • Pelado • Reducción de tamaño • Picado o rallado • Mezclado • Envasado
Vegetales para sándwich	<ul style="list-style-type: none"> • Tomate • Lechuga • Cebolla • Berenjena 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavado • Pelado • Cortado en rodajas • Envasado

<p>Vegetales para salsas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pimientos (morrones) • Cebolla • Tomates 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavado • Pelado • Picado • Mezclado • Envasado
<p>Vegetales para purés</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Patatas • Calabaza • Calabacín 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavado • Pelado • Reducción de tamaño

Fuente: Parzanese, M., 2012.

Por todo ello, destacamos la importancia nutricional y para la salud que tienen los alimentos de origen vegetal, entre los que destaca los vegetales de hoja. Debido a esto, es de interés social evitar los posibles problemas de salud que derivan del consumo de vegetales, que podrían haber sido contaminados por microorganismos. Pese a que los alimentos vegetales de manera natural, siempre presentan cierta carga microbiana, hay que asegurarse que esta no sea peligrosa, mediante análisis y control de los diferentes tipos de microorganismos que las contienen y la realización de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y Buenas Prácticas de Distribución (BPD) para poder minimizar ese riesgo de contaminación (Gil, M et al., 2005). La implantación de estos programas de higienización resulta necesaria para garantizar la seguridad de las hortalizas de hoja.

1.3 Tipos de vegetales.

1.3.1.- Frutas y hortalizas más comúnmente implicadas.

Los vegetales por su naturaleza son muy susceptibles a estos ataques microbianos. A continuación, detallamos cuál es su clasificación según su consideración alimentaria y otros factores relevantes (Martín, P et al., 2008).

Los vegetales son plantas herbáceas, nombradas indistintamente como hortalizas, legumbres y verduras entre otras:

- **Hortaliza.** Es la planta herbácea producidas como cultivo, de la cual una o más partes es el alimento en su forma natural, sin necesidad de transformaciones industriales.
- **Verduras.** Son las plantas de color más verde tales como lechuga, col, repollo, acelga, etc.
- **Legumbres.** Son las semillas y frutos de las leguminosas comestibles.

Existe otro tipo de clasificación, según el punto de vista botánico:

- *Raíces:* zanahoria, nabos, cebollas, remolachas y rábanos.
- *Hojas:* espinacas, lechugas, acelgas y berros.
- *Yema:* espárragos, alcachofas, coles, cebollas y ajos.
- *Frutas:* calabaza, tomates, pepinos, berenjena y pimientos.
- *Tallos:* apio, ajo y tallo de acelgas.
- *Flores:* coliflor y brócoli.

Los vegetales son alimentos con elevado contenido hídrico y bajo valor energético (poca grasa), ricos en celulosa y vitaminas, escasos en carbohidratos sencillos y casi nulos en proteínas, se acostumbra a consumir frescos al igual que las frutas, pero en ocasiones se pueden realizar una pequeña transformación para un consumo más cómodo. Por todo ello, continuamente estamos teniendo problemas de Seguridad Alimentaria. Un ejemplo es nuestro país; siendo España un exportador significativo de productos vegetales a potencias como Estados Unidos no es de extrañar que aparezcan de manera esporádica problemas en las aduanas por rechazo de las hortalizas que se exportan, ya que no cumplen con los requisitos higiénicos-sanitarios impuestos por el país receptor; e incluso la aparición de brotes de alguna ETA (Camponovo, M., 2012).

1.4 Microorganismos patógenos en vegetales.

A pesar de las buenas prácticas, el consumo de vegetales de hoja está dramáticamente relacionado con varios brotes de infecciones alimentarias debido a sus características físicas y de cultivo, que constituyen un riesgo para la adquisición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Además de las características del cultivo, existen otros factores que contribuyen a la contaminación de frutas y hortalizas, como son: el uso de agua de riego procedente de ríos contaminados con heces de humanos y animales; prácticas inadecuadas en el campo, desinfección deficiente, condiciones inapropiadas de transporte y almacenamiento. La más extendida como fuente de contaminación de las hortalizas es el estiércol utilizado como abono y el agua de riego contaminada. También, se ha descrito el uso de pesticidas mezclados con agua contaminada como posible fuente de contaminación (Guan et al, 2005 citado en Tola, J., 2016).

Una vez que se contamina el producto por microorganismos, estos logran sobrevivir por largos periodos de tiempo en las hortalizas frescas suponiendo un riesgo extremo para la salud. Algunos microorganismos son capaces de sobrevivir tras procesos tales como la desinfección, e incluso logran multiplicarse durante el almacenamiento del producto (Tola, J., 2016). La contaminación microbiana presente en los vegetales se reduce tradicionalmente mediante procedimientos de lavado y desinfección, que corresponden a los principales puntos críticos del procesamiento, (Silveira, J et al., 2017) además de los otros factores que afectan a la calidad microbiológica final del producto.

Las ETA, desde hace décadas, son consideradas como un problema de salud pública global, siendo el agua y los alimentos las principales fuentes de ETA. Estas enfermedades se caracterizan por la adquisición de un cuadro gastrointestinal, con algunos síntomas como: náuseas, diarrea, dolor abdominal y fiebre; y en casos más graves se puede dar sepsis, meningitis o abortos. (Soto, Z et al., 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes que sufren las personas a diario. Afectan sobre todo a niños, mujeres embarazadas, personas de tercera edad y personas de riesgo; además de afectar a la salud de las personas, también afecta al terreno socioeconómico, debido a que una alerta sanitaria por infección microbiana repercute sobre la productividad y el comercio, ya que las personas por prejuicios dejan de consumir esos productos y se genera un impacto negativo (Soto, Z et al., 2016).

Entre las ETA más frecuentes en Europa de la última década se encuentran *Salmonella*, toxinas bacterianas, virus y *Campylobacter*, siendo los principales *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. De entre los alimentos que tradicionalmente se han visto implicados en brotes ETA han sido, tomate, perejil, lechuga, espinacas y apio. (Rincón, G et al., 2010). Los hongos generalmente no representan un peligro para los vegetales, pero sí, las micotoxinas que producen. Pero

para que una contaminación por hongos ocurra, tiene que haber transcurrido un largo tiempo para que se desarrolle. En una campaña de recogida bien manejada es poco probable que ocurra, pues a través de los controles se detectan y eliminan antes de que llegue al consumidor (Tola, J., 2016).

Existen otro grupo de microorganismos que se asocian rara vez a los vegetales: los virus. Los virus entéricos pueden ser transmitidos mediante agua y alimentos contaminados (virus hepatitis A, enterovirus, adenovirus, rotavirus, astrovirus, etc.). Existen estudios que arrojan que los enterovirus y rotavirus pueden sobrevivir de 1 a 4 meses en vegetales durante almacenamiento en refrigeración. El grupo de enterovirus es el que se encuentra más comúnmente en aguas de desecho; los enterovirus son muy peligrosos porque causan infecciones respiratorias, meningitis o incluso la muerte, en casos más graves (Tola, J., 2016).

El informe de la EFSA del año 2012 arrojó un total de 5.262 brotes de origen alimentario en la UE, con casi 5.000 casos humanos y llegando a costarle la vida a 25 personas; estos datos se mantuvieron en la línea a los reportados en el 2009. El informe de EFSA subraya a *Salmonella* como el microorganismo con mayor incidencia, (en torno al 30.5% de todos los casos en vegetales) (EFSA, 2012). Los vegetales de hojas se han visto involucrados en numerosos brotes durante los últimos años. De ahí viene que la preocupación sobre la Seguridad Alimentaria de estos productos es cada vez más relevante (Posada, G., 2013).

1.4.1.- Efectos económicos de los brotes de toxiinfecciones en hortalizas.

Es innegable que cuando aparece un brote de toxiinfecciones alimentarias, el sector afectado se ve dañado y en productos como las hortalizas, las consecuencias son aún mayores ya que para el consumidor es fácil renunciar a ese producto, promovido por la pérdida de confianza en el sector y por tanto, el consumo experimenta un fuerte descenso. Un ejemplo de esto ocurrió en EE. UU, donde un brote en 2006 provocó la

reducción de las ventas de ensaladas llegando a rozar el 70% (Todd, E et al., 2009). Tras este desastre, se necesitó mucho tiempo para recuperar, de nuevo, la confianza del consumidor, obteniendo posteriormente, porcentajes de ventas inferiores a los de antes del brote (Posada, G., 2013).

1.4.2.- Principales microorganismos presentes en vegetales IV Gama.

Dentro de los vegetales de hojas frescos, destacan los productos IV Gama. Estos pueden albergar multitud de patógenos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio* y *Staphylococcus aureus* (FAO/OMS, 2009). La contaminación de los productos IV Gama puede ocurrir tanto en la superficie como en los tejidos internos (internalización de las bacterias) (Ibarra, L et al., 2004; Moyne, A et al., 2011). Estos microorganismos son muy resistentes, siendo capaces de sobrevivir en diversas superficies, y pueden someterse a condiciones de estrés, entrando en un estado latente; una vez encuentren unas mejores condiciones para su crecimiento vuelven a colonizar el medio y se desarrollan. Por ello han surgido muchos estudios enfocados a investigar estos productos para ver el comportamiento de los microorganismos sobre materia como el abono y agua; y su nivel de patogenicidad responsable de comprometer la seguridad microbiológica de los alimentos (Beuchat, L et al., 2004).

Esta resistencia provoca que los métodos para controlarlos dejen de ser efectivos para inhibir la carga microbiana. (Møretre, T et al., 2012). En el desarrollo de este trabajo, nos centramos específicamente en el género *Salmonella* debido al creciente aumento de toxiinfecciones asociadas a vegetales de hojas y a IV Gama.

1.4.3.- Factores ecológicos que afectan la supervivencia/desarrollo microbiano en las frutas y hortalizas.

Los factores ecológicos son clave para el comportamiento de los microorganismos patógenos en los alimentos en general, y de las hortalizas particularmente. Estos factores pueden ser decisivos para que el microorganismo contaminante sobreviva, se inhiba o se multiplique. Destacan entre ellos, la temperatura, el pH, la actividad de agua, la humedad relativa, y la disponibilidad de nutrientes susceptibles de colonización de una bacteria u otra.

Cuando las hortalizas están expuestas a la contaminación, los patógenos tienden a adherirse en la totalidad de la superficie. Esta adhesión puede llegar a ser tan profunda que resulte difícil su eliminación mediante lavado ordinario. El problema se agrava cuando el agua juega un papel negativo en la desinfección, ya que puede iniciarse un proceso de síntesis de polímeros que se traducirán en la formación de biopelículas, actuando como reservorios del patógeno. Y son estas biopelículas las que se liberan periódicamente contaminando todo el entorno del vegetal en cuestión. En casos extremos, los microorganismos desarrollan resistencias a la acción de los germicidas, propiciando su supervivencia en hortalizas lavadas y desinfectadas (Ronner, A et al., 1993). Por último, la supervivencia al factor desecación es ambigua, ya que depende del patógeno y de la carga microbiana, si puede ser eliminado o no; pero en general los microorganismos patógenos tienden a eliminarse bajo los efectos de la desecación (Camponovo, M., 2012).

1.5 *Salmonella* spp.

La primera vez que se habló del género *Salmonella* fue a través del científico Daniel E. Salmon, el cuál detectó por aislamiento la primera cepa de *Salmonella* en cerdos en 1885 y llamó al patógeno con el nombre de *Bacterium choleraesuis*, hoy conocida como *Salmonella enterica* serovariedad *choleraesuis* (Bhunia, A., 2008). El género *Salmonella* causa la salmonelosis, enfermedad de amplia distribución mundial que afecta a seres de sangre caliente y fría, presentando una diferencia en la morbilidad y mortalidad según la especie, región y huésped afectado. Posee una distribución ubicua

y su excreción al medio da como resultado la contaminación del agua, alimentos y medio ambiente (Tunes, M et al., 2007).

Entre los múltiples peligros microbianos asociados con los brotes de lechuga y otros vegetales de hoja, los microorganismos patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* y *norovirus* humana son los que más se asocian a enfermedades por el consumo de productos frescos. Estos patógenos pueden situarse en la superficie de productos frescos y/o en su interior y sobrevivir por largos períodos de tiempo. La lechuga se corona como el vector más importante para los patógenos transmitidos por los alimentos (Min, S et al., 2016). Es por esto que la seguridad microbiana de estos alimentos es un tema de preocupación para las autoridades y para los empresarios del sector, ya que si no mejora la higiene, las personas tienen mayor probabilidad de comer productos frescos contaminados y así ser víctimas de un brote.

La infección por Salmonelosis está muy ligado al factor edad del paciente y su susceptibilidad. Los brotes provocados por *Salmonella* conllevan periodos cortos de incubación. Los síntomas que se suelen presentar son diarrea, cefalea, vómito, fiebre, escalofríos, dolor abdominal o malestar general, desarrollados con posterioridad a la ingestión de alimentos contaminados (Chávez de la Peña, M et al., 2001). El cuadro se manifiesta a las 6-48 horas después de la ingestión de alimentos o agua contaminada. Los síntomas persisten unos 7 días, pero pueden prolongarse por semanas; aunque el cuadro gastroentérico desaparezca, el patógeno puede aparecer en las heces y durar unas 5 semanas, convirtiendo a esa persona en portador de *Salmonella*. (Ellermeier, C et al., 2006 citado en Spricigo, D et al., 2012). Las bacterias del Género *Salmonella* son anaerobias facultativas, es decir, son capaces de crecer con bajas concentraciones de oxígeno, concentración que se usa para la conservación de los vegetales IV Gama. Su crecimiento se ralentiza a los 15 ° C, y por debajo 7 ° C no son capaces de crecer (Carrasco, E et al., 2012). Crece a un pH de entre 4 y 9, siendo el pH óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan sin problema a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94; pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con una actividad de agua inferior a 0.2

(González, J et al., 2014). El género *Salmonella* se caracteriza por su habilidad para sobrevivir en el hábitat intestinal y fuera de él, multiplicándose dentro de numerosas condiciones ambientales. Debido a su naturaleza ambigua, su erradicación de la tierra de cultivo es prácticamente imposible (Creus, E., 2005). La capacidad que tiene *Salmonella* para sobrevivir en vegetales unas 4 semanas, se ha convertido en un problema que debería ser considerado para explicar el porqué de la aparición de brotes a pesar de protocolo de eliminación (Dawson, D., 2005). La dosis infectiva mínima que produce problemas en humanos está entre 10^5 y 10^6 células de *Salmonella*; por el contrario, esta horquilla se reduce para aquellas personas con factores de riesgo (avanzada edad, inmunodepresión, etc.) siendo de 10^3 (Gray, 1995; Miller et al., 1997 citado en Spricigo, D et al., 2012).

Su presencia en los alimentos es un problema de salud pública importante que no debe ser extendido en países desarrollados puesto que la mayoría de los serotipos de este género son patógenos para el hombre, convirtiéndose en una de las principales zoonosis para la salud pública en todo el mundo (Sakugawa, N et al., 2007). *Salmonella* está comúnmente asociado al consumo de carne de pollo y carne de ternera contaminada, productos lácteos, frutas, vegetales, ovoproductos, etc. (Caballero, A., 2008). En el año 2010 se notificaron en la Unión Europea, 99.020 casos en humanos (EFSA, 2012). Además, los datos de los Estados Unidos son preocupantes, ya que se estima que cada año enferman por salmonelosis 1,5 millones de personas (CAC, 2005) Por el contrario, el continente asiático notifica unas 38.000 muertes anuales, datos menores que los reportados por Estados Unidos, pero no menos preocupantes (Majowicz, S et al., 2010).

Salmonella spp es un bacilo Gram negativo, no esporulado y móvil, pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Mide 0,7 a 1,5 μm de ancho y 2 a 5 μm de largo, son organismos móviles por flagelos peritricos (Tunes, M et al., 2007). Antes de 1983 se tenía constancia de la existencia de múltiples especies de *Salmonella* (Parra, M et al., 2002). En la actualidad se reconocen dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, y a su vez *S. enterica* se compone de seis subespecies: *enterica*, *arizonae*,

salamae, *houtenae*, *diarizonae* e *indica*; dentro de cada subespecie describimos distintos serotipos identificados en función de la respuesta inmunitaria del cuerpo a una infección. Con la serotipificación de *Salmonella* se han caracterizado 2.579 serotipos, gracias al esquema de Kauffmann-White que reconoce 46 antígenos O y 119 antígenos H (Tabla 2). Gracias a este esquema se identifica con facilidad los serovares prevalentes en cada región y la etiología de los brotes e infecciones que se producen en humanos y animales (Acero, D et al., 2011).

Tabla 2: Especies, subespecies y serovariedades de *Salmonella* según el sistema de Kauffmann-White.

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de la especie	Habitat usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
Total	2579	

Fuente: Grimont et al., 2007.

Los epidemiólogos Terragno, R et al., (2008) clasificaron las cepas del género *Salmonella* en 3 grupos:

- Las que afectan tanto al hombre como a los animales (engloba a las serovariedades más comunes).
- Las que están adaptadas a especies animales (*S. abortusovis*, *S. abortusequi*, *SG*, *SP*).
- Las que afectan sólo al hombre (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *C*).

Los genes de virulencia de un patógeno se localizan en las llamadas islas de patogenicidad. En el caso de *Salmonella* se encuentran localizados en 12 islas. Se cree que algunas islas son adquiridas según el microorganismo se va adaptando y mutando para su supervivencia (transferencia horizontal), mientras que otros genes son conservados en su origen. Los genes de virulencia que, concretamente, están implicados en la dolencia intestinal se localizan en las islas 1 y 2 (Bhunja, A., 2008).

La adherencia de la bacteria a la superficie del hospedador es un factor muy importante en la patogénesis de *Salmonella*, y esta se lleva a cabo por la existencia de adhesinas, entre las que se incluyen: Fimbrias (codificadas en el gen fim) y Fimbrias codificadas en plásmidos denominados pSLT. Este plásmido es muy importante pues se encuentra en todas las cepas patógenas de la bacteria. (Salyers, A et al., 2002 citado en Parra, M et al., 2002).

El género *Salmonella* es el que más problemas genera; según datos epidemiológicos, la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son los que más se dan en el mundo y ocurren tanto en países desarrollados como en subdesarrollados. Según un estudio de Forshell, L et al (2006), los cuadros de gastroenteritis aguda que se produce en su mayoría se deben principalmente por *Salmonella*. Los serotipos de *Salmonella entérica* son las que se relacionan con intoxicaciones de tipo alimentario. Destaca *S. typhimurium* y *S. enteritidis* como las cepas que afectan con mayor frecuencia a humanos (Hendriksen, R et al., 2011). En el hombre se dan dos tipos principales de infección: (a) infecciones con malestar general que afectan el sistema retículo-endotelial con fiebre alta y cuyo cuadro sintomatológico característico son las fiebres entéricas (fiebre tifoidea producidas por *Salmonella typhi*). (b) Infecciones centradas en el tubo digestivo, tipo gastroenteritis debido a toxiinfección por alimentos (producidas por la mayoría de serotipos). La primera infección proviene de una enfermedad humana y se puede erradicar resolviendo los problemas con la potabilidad del agua y la eliminación de excretas, mientras que en el segundo tipo de infección se relaciona con la producción y preparación de los alimentos, cuya frecuencia de aparición va en aumento (Acero, D et al., 2011).

La resistencia a antibióticos es un problema en auge en la salmonelosis. Desde la década de los 90, han ido emergiendo algunas cepas de *Salmonella* resistentes a grupos de antibióticos que son claves para el tratamiento clínico de infecciones humanas (Peña, Y et al., 2014). En estudios realizados en varios países se encontraron una alta proporción de cepas de *Salmonella* spp con resistencia a múltiples antibióticos. Esto sucede sobre todo en países industrializados, donde la principal causa de resistencia es el excesivo uso de antibióticos en el pienso de animales, usados como promotores de crecimiento y también el uso masivo e indiscriminado de estos medicamentos en humanos. Un estudio en Korea reportó una alta incidencia de resistencia de *S. enteritidis* a las sulfonamidas, estreptomicina y tetraciclinas (Uribe, C et al., 2006).

1.5.1.- Reservorios y distribución.

Salmonella spp se encuentra formando reservorios en múltiples animales. Los reservorios más comúnmente descritos incluyen animales domésticos y silvestres como cerdos, ovejas, aves silvestres y de corral, roedores, perros y gatos. En los animales la multiplicación se realiza en los sistemas digestivos, mientras que los reservorios secundarios como aguas y suelo, los microorganismos sobreviven durante períodos muy largos sin llegar a multiplicarse. Asimismo, pueden sobrevivir en alimentos con altas cantidades de proteína y grasas (Uribe, C et al., 2006). Algunos de estos animales son transportadores pasivos a través de sus extremidades; otros los expulsan a través de la materia fecal, ya se hayan enfermado o no. Las aves migratorias tales como pájaros y gaviotas, pueden ser vehículo de *Salmonella*, ya que a través de sus excretas contaminan la tierra de cultivo y directamente las hortalizas (Camponovo, M., 2012).

Salmonella se distribuye por todo el mundo, pero existen variaciones en la frecuencia de presentación de las diversas serovariedades. El predominio de una u otra puede variar con el tiempo. Así, *S. enteritidis* y *S. typhimurium* se aíslan en todo el mundo; en cambio *S. weltevreden* aparece aislada solo en Asia. El que se consiga aislar una serovariedad u otra depende del área, ya que existen lugares que no cuentan con las condiciones de higiene adecuadas ni con medidas de salud pública óptimas. También la serotipificación se ve influenciada por las limitaciones económicas de muchos países; algunos territorios no son capaces de informar de todas las serovariedades probablemente porque no cuentan con los reactivos necesarios para ello. Es por esto que, la Organización Mundial de la Salud considera importante la ejecución global de un sistema de aislamiento y detección de *Salmonella*, el cuál beneficie a todos los países y se requiere de programas y actividades de protección de las hortalizas contra toda fuente de contaminación indeseable desde el cultivo hasta su venta al público. (Uribe, C et al., 2006).

Actualmente, los métodos para la detección de esta bacteria se basan en su aislamiento por cultivo microbiológico, pero se hace difícil su detección porque existen otras células que están presentes en el alimento y la inhibición de *Salmonella* por otros microorganismos presentes en los vegetales. Por ello, los métodos moleculares como la PCR se escogen como los más idóneos debido a su límite de detección, alta sensibilidad y especificidad (Soto, Z et al., 2016).

1.6 Infecciones alimentarias por *Salmonella* spp.

1.6.1.- Datos destacados en el mundo por brotes de *Salmonella* spp.

Las infecciones por *Salmonella* que son de origen alimentario son frecuentemente asociadas al serotipo *enteritidis*, y tienen una amplia distribución mundial. El brote más destacado en Estados Unidos fue en 2006, cuando se notificaron un total de 121 brotes de *Salmonella* spp, causando más de 3.300 casos de salmonelosis describiendo *Salmonella enteritidis* como la causante. Este brote fue promovido por el consumo de alimentos a base de huevo u ovoproductos. Para erradicar este problema de salud pública, el centro para control de enfermedades de EE. UU implementó programas de prevención, sin embargo, no obtuvieron datos positivos ya que *Salmonella* prevaleció años después, reportando en el 2010 un total de 1.953 casos de salmonelosis asociada a contaminación por huevo (Acero, D et al., 2011).

En la Unión Europea, *Salmonella* spp es la segunda causante de ETAs, según informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), y aunque ha descendido de manera significativa, en los últimos años sigue la tendencia al alta. Un ejemplo de este brote fue el notificado en 2008, donde el número de casos fue de 131.468 infectados. En Europa los alimentos implicados en los brotes de salmonelosis siguen siendo los huevos y los ovoproductos (23%), la carne de porcino y derivados (10%) y comidas en restaurantes tipo buffet (9%) (Acero, D et al., 2011).

En Colombia y países latinos las enfermedades transmitidas por *Salmonella* son estudiadas por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS). En los años que estudiaron esta infección, destaca el 2007, año donde el INS confirmó un total de 450 brotes de *Salmonella* spp. La identificación de los serotipos culpables reveló que los más prevalentes fueron *typhimurium* (45,8%), *enteritidis* (21,3%) y *typhi* (8,4%). México destaca como uno de los países más afectado por la presencia de salmonelosis, ya que su Secretaria de Salud reporta una cifra muy comprometedor de

infecciones por las bacterias de *Salmonella*, una media de 68.000 casos anuales. Estos países no cuentan con una epidemiología rigurosa de las toxiinfecciones alimentarias para poder lograr una notificación rápida y seguimiento. Esto es debido a que los hospitales y los centros de salud carecen de la infraestructura, así como de laboratorios necesarios para determinar el origen etiológico de los brotes. Además, en estos países latinos existen un número incalculable de casos subregistrados, por la falta de asistencia del enfermo al hospital para ser tratado (Acero, D et al., 2011).

En general el incremento de Salmonelosis se ha extendido por todo el mundo. Esto se vio acentuado a finales de la década de 1980 y principios de la década de 1990 cuando incrementó la salmonelosis en humanos. Se encontró que 76.1% de los brotes correspondieron a la serovariedad *enteritidis*, *typhimurium*, y *typhi*. Este incremento ha venido como consecuencia de nuevos problemas en la higiene alimentaria a nivel industrial, ya que se origina una fácil diseminación de *Salmonella* spp (Uribe, C et al., 2006).

1.7 Presencia de *Salmonella* spp en alimentos.

Como hemos visto, la Salmonelosis se encuentra relacionada con el consumo de alimentos de diversos orígenes y está extendida por todo el mundo. *Salmonella* se detecta mucho en productos derivados de la carne de ave. Se sabe que los productos de origen avícola, tales como huevos, carne de pollo o de pavo, son una fuente importante de contaminación por *Salmonella* en humanos (USDA, 2008). Destacan también los productos de la pesca, leche, vegetales como ensaladas, etc. Además del agua como vehículo de transmisión de *Salmonella*, así como también la mala higiene de las personas que trabajan en el procesado de alimentos (Yousef, A et al., 2006). La principal desventaja de las explotaciones alimentarias son las contaminaciones ambientales que allí se producen y que provoca que la contaminación con *Salmonella* sea de forma accidental causando salmonelosis (Soria, M., 2012).

Otro factor importante para que el alimento se contamine por *Salmonella* es la exposición a vectores como la mosca doméstica, se describió en un estudio realizado por Olsen, A et al., (2000) donde se analizaron especies de moscas domésticas provenientes de granjas avícolas que habían sido relacionadas con brotes de *S. enteritidis* en EE. UU. Olsen encontró en un muestreo de 15 caldos de moscas domésticas, que 2 caldos eran positivos a *Salmonella enteritidis* (Olsen, A et al., 2000 citado en Parra, M et al., 2002). Por otra parte, está ampliamente extendido el origen de contaminación fecal-oral de persona a persona y han ocurrido brotes en centros de atención primaria por la falta de lavado de las manos. En adición, existe un alto riesgo de Salmonelosis por los trabajadores que manipulan alimentos y la transmisión a lactantes a través de madres (Ovalle, Y et al., 1999 citado en Parra, M et al., 2002).

La contaminación de los alimentos crea, en general, un riesgo potencial. Los errores cometidos en el sector alimentario, y a lo largo de toda la cadena alimentaria (preparación de las comidas, transformación, transporte..) convierten el riesgo potencial en una verdadera multiplicación bacteriana (Parra, M et al., 2002).

Por todo ello, el control de *Salmonella* spp a lo largo de la cadena alimentaria supone una alta dificultad debido a las múltiples interrelaciones que existen entre la contaminación que pueda llegar del medioambiente, los animales de abasto y el hombre. La tendencia de infecciones por Salmonelosis en humanos es creciente y los recientes brotes de *Salmonella enteritidis* en un producto tan primordial como son huevos, carne o vegetales de hoja, subrayan la necesidad de una mayor vigilancia en todas las fases de la producción de alimentos. Dicha vigilancia deberá reflejarse en los controles oficiales del gobierno y los propios de la industria; incluyendo un sistema de seguridad APPCC, el cual se convierte en la herramienta idónea para controlar el procesado y la manipulación de los alimentos (Acero, D et al., 2011).

1.8 *Salmonella* spp en vegetales.

En los últimos años en países occidentales, *Salmonella* fue relacionados con ETA, asociándose los brotes de salmonelosis al consumo de vegetales como lechuga, perejil, cebollas, tomates, coles y de frutas como sandía y melón. En España, durante el 2015 se registraron 4 brotes por consumo de vegetales, con 400 casos de salmonelosis confirmados en ese año, mientras que en el año 2016 se registraron unos 121 brotes. En los países europeos, los años 90 fueron alarmantes por las toxiinfecciones; *Salmonella* fue la principal responsable de los brotes de ETA registrados. Los alimentos a los que estaban asociados fueron vegetales frescos de exportación (lechugas, albahaca, tubérculos, etc.). Por lo que se considera a *Salmonella* como uno de los patógenos más persistentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo (Barrantes, K et al., 2011). Estos productos que son de consumo crudo, como la lechuga, presentan un mayor riesgo para la transmisión de *Salmonella* y otros patógenos, ya que presentan el inconveniente de que no existe una etapa de procesamiento posterior o tratamiento térmico que elimine la carga bacteriana contenida.

Los alimentos de consumo crudo (vegetales y hortalizas) son susceptibles de contener *Salmonella* debido a que se pueden infectar por contaminación fecal: la irrigación con aguas residuales es el principal factor de contaminación de este producto, así como el uso de abono a base de heces animales o la manipulación/almacenamiento inadecuado (Barrantes, K et al., 2011). En aquellos abonos donde el compostaje tiene un proceso térmico deficiente pueden persistir patógenos (Lemunier, M et al., 2005). Este proceso afecta directamente la calidad del abono obtenido, convirtiéndose en un riesgo para aquellos cultivos que lo usen y luego esos productos sean de consumo directo, conteniendo el patógeno *Salmonella* (Rodríguez, D et al., 2008).

1.9 Algunos métodos de eliminación de microorganismos.

Son muchas las técnicas que se usan para reducir la contaminación microbiana de los vegetales de hoja. Lo más extendido es el uso de varios agentes desinfectantes para el lavado de frutas y verduras, con esto se previene las enfermedades provocadas por microorganismos pre y poscosecha (Zagori, 1999; Ramos et al., 2013 citado en García, J et al., 2017). Evaluar la eficacia de la desinfección con diferentes tecnologías es una tarea muy complicada ya que depende de varios factores, tales como las propiedades fisicoquímicas del producto, el agua de lavado y el tipo de técnica desinfectante (Gil et al., 2009 citado en García, J et al., 2017). Además de los métodos de aplicación de tratamientos de descontaminación y el procedimiento.

Hay que tener en cuenta que el lavado de los productos vegetales con agua puede contribuir al deterioro de ciertos vegetales. (Gil, S et al., 2009 citado en Alegre, I et al., 2020). Es por ello que el uso de desinfectantes químicos aporta en los consumidores una percepción negativa de los mismos, ya que algunos pueden producir compuestos tóxicos, y no se degradan con facilidad provocando contaminación ambiental (Faleiro, 2010 citado en Alegre, I et al., 2020). Por ese motivo cada vez más, surgen alternativas al lavado con desinfectantes para el incremento de la Seguridad Alimentaria.

Entre las alternativas disminuir la carga microbiana de los vegetales, encontramos muchos métodos físicos como la luz ultravioleta, las altas presiones, los ultrasonidos, entre otros (Ramos, et al., 2013 citado en Alegre, I et al., 2020). Sin embargo, los más extendidos a día de hoy son el envasado en atmósfera modificada y la refrigeración, ya que al combinar ambos, se evita el desarrollo de microorganismos y se alarga la vida útil de las frutas y hortalizas. Una alternativa que va creciendo en investigación es el uso de bioconservantes, es decir, el uso de microorganismos o sus metabolitos. Estos microorganismos ocupan el sitio de los patógenos y son competidores (por espacio y nutrientes), produciendo sustancias antimicrobianas y sustancias probióticas, que actúan sobre el intestino humano inhibiendo la adhesión de patógenos (Fliss et al., 2011 citado en Alegre, I et al., 2020).

1.10 Prevención y detección de cepas de *Salmonella* en vegetales.

Es importante destacar que la implantación de medidas preventivas en el procesamiento y manejo comercial de los productos alimenticios, junto a una educación sanitaria de la población para la manipulación de los alimentos, hace posible la reducción significativa del grado de contaminación por *Salmonella* spp. De la misma manera, la salmonelosis también se puede prevenir a nivel de consumidor aplicando sencillas medidas de control que pueden reducir la adquisición de la infección. Dentro de estas medidas se incluye: no consumir vegetales en estado de descomposición o demasiado sucios, conservación en refrigeración (a menos de 4°C); y por último para garantizar la destrucción de los patógenos, lavar los vegetales justo antes de utilizarlos (Camponovo, M., 2012).

La experiencia en el sector hortofrutícola muestra que en muchos casos el criterio usado para garantizar la inocuidad de las frutas y hortalizas durante el cultivo y la cosecha se ha basado en la observación directa y el cumplimiento de requisitos provenientes del protocolo. Pero esto no es suficiente a nivel de industria, ya que se convierte en fundamental valorar individualmente las limitaciones que podrían tener determinadas acciones de una empresa, aunque tales acciones resulten apropiadas en otras (Camponovo, M., 2012).

Para proteger la inocuidad microbiana de las frutas y hortalizas se requieren dos perspectivas complementarias: algunas acciones preventivas y otras, correctivas. En general, siempre hay que destacar que el riesgo cero no existe. Lo más sensato es pretender la reducción de riesgos tanto como el desarrollo científico lo permita. De ahí que surjan las acciones preventivas, para poder impedir el desarrollo de microorganismos patógenos en hortalizas; y, para eliminarlos o inactivarlos se hace necesario el uso de aquellas que son correctivas (Camponovo, M., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de biopelículas sobre las superficies de los alimentos genera obstáculos para lograr inactivar estos microorganismos, aun cuando el tratamiento de lavado y desinfección se aplique de acuerdo con el protocolo establecido. Es primordial hacer hincapié en que la prevención de la contaminación de las hortalizas es necesario para contribuir a minimizar el riesgo de enfermar entre los consumidores, aunque sea imposible garantizar la ausencia de patógenos durante el cultivo. Por todo ello la industria de frutas y hortalizas y algunos gobiernos están desarrollando estrategias para minimizar el riesgo de enfermedad asociado al consumo de vegetales. Estas estrategias incluyen la prevención de la contaminación a través de buenas prácticas agrícolas y la desinfección del producto previo al envasado. La mala praxis de las consideraciones mencionadas en relación con los riesgos microbianos de contaminación en las hortalizas, provoca la aparición inmediata de problemas, sobre todo en las condiciones de trabajo agrícola (Camponovo, M., 2012).

En la Figura 5 se esquematiza un enfoque general de prevención de riesgos microbianos durante la producción de hortalizas.

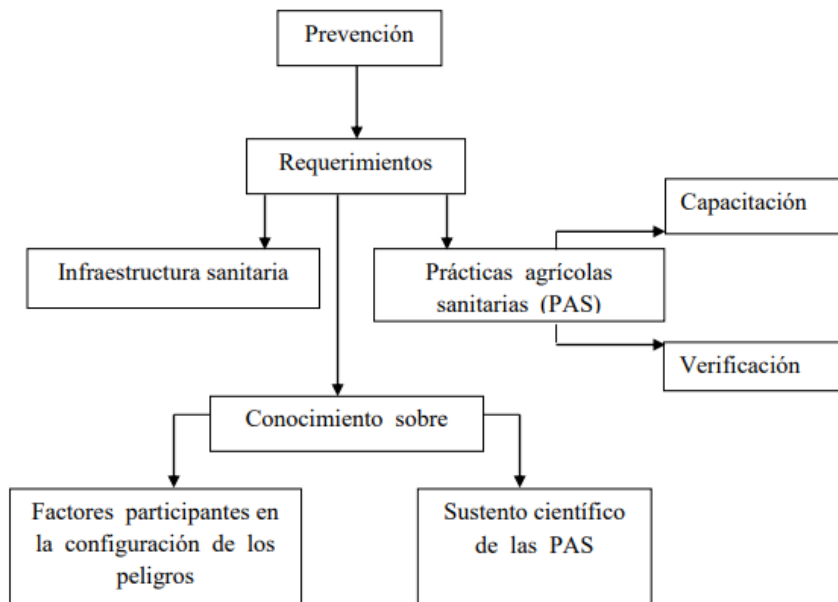


Figura 5: Enfoque general de prevención de riesgos microbianos durante la producción de hortalizas.

Fuente: Camponovo, M., 2012.

Pero para conseguir una buena prevención se necesita de dos requerimientos fundamentales (Camponovo, M., 2012):

A) La disponibilidad de una buena infraestructura que proteja tanto como sea posible de contaminación a las que se encuentran expuestos estos alimentos durante su producción en cualquier etapa. Y en segundo lugar, el ejercicio sistemático de prácticas agrícolas. En el primer caso nos referimos a la selección de un buen sitio que asegure las condiciones idóneas para la producción de alimentos. Se incluyen entre estas condiciones la disponibilidad de agua suficiente y de buena calidad, apoyo con barreras para evitar la aparición de animales silvestres o de explotación, el acceso restringido a personas ajenas a la explotación o empresa y facilidades para la higiene personal.

B) La observación de Prácticas Agrícolas Sanitarias (PAS) se refiere al funcionamiento sanitario del sitio de producción y envasado: se hace necesario evitar la aparición de personas enfermas al lugar de trabajo; se hace obligatorio el lavado permanente de las manos al manejar las hortalizas, así como un uso de utensilios higienizados.

Por último, para la prevención del desarrollo de *Salmonella*, se hace muy útil el uso de explotaciones agrarias a través del empleo de invernaderos. Con esto se reduce de manera significativa el ingreso de microorganismos patógenos a las hortalizas. Constituye una barrera física contra la roedores o animales silvestres y se prescinde del uso de la tierra (foco de microorganismos). Pese a las ventajas de los invernaderos, las hortalizas no quedan exentas al 100% a la contaminación por patógenos (Camponovo, M., 2012).

1.10.1.- Rastreo del origen del microorganismo patógeno que ha dado lugar a un brote de intoxicación.

El asunto más difícil de tratar viene dado cuando se presenta un brote por consumo de algún vegetal (en general cualquier alimento), y ha de investigarse la fuente de contaminación del patógeno causante de la infección. Esta identificación y localización se hace indispensable para controlar lo más rápido posible el brote. A modo de ejemplo consideremos un brote de gastroenteritis entre personas que asistieron a un restaurante. En primer lugar, hay que diagnosticar el agente y el alimento responsable. Mediante pruebas de laboratorio pueden diagnosticar la etiología del brote. El problema consiste ahora en identificar el alimento que supuso la fuente de contaminación. Si se rastrea un ingrediente vegetal se investigará el agua de riego como fuente posible, los trabajadores (cosechadores, envasadores), equipo y utensilios, y cualquier fuente pertinente. Como es posible detectar al microorganismo implicado en más de una fuente, se hace necesario identificar a todas las cepas de *Salmonella* que puedan estar implicadas, lo que es posible mediante pruebas serológicas y moleculares (Camponovo, M., 2012). Gracias al desarrollo de estas pruebas podemos conocer el origen de una infección y detectar a los implicados, para poder implementar o mejorar las acciones que hayan fallado a lo largo de toda la cadena alimentaria.

En resumen, como consecuencia de la propagación mundial de toxiinfecciones alimentarias y su sinergia con la desnutrición de la población vulnerable, principalmente en países subdesarrollados, aumenta la necesidad de realizar estudios de control y prevención de esta enfermedad, en los sectores de alimentación y en la distribución y comercialización de diversos alimentos; todo esto con el fin de perseguir la salud pública, además de la seguridad e inocuidad alimentaria. La identificación de las características de *Salmonella* y su detección temprana prevendría la aparición de brotes y permitiría implementar controles de seguridad.

Es innegable que, en la producción de cualquier alimento destinado al consumo humano, debe atenderse a la calidad comercial, su capacidad nutricional y a los factores económicos en la producción. La cuestión de inocuidad no puede ser pasado por alto. Como se ha mencionado a lo largo del presente trabajo, con el paso de los años han surgido numerosos registros de brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas contaminadas con microorganismos patógenos. El riesgo existe incluso en empresas que cuentan con infraestructura, servicios, sustento económico, y condiciones sanitarias adecuadas y supervisadas permanente (Camponovo, M., 2012).

Los brotes de ETA en vegetales de hojas verdes se han venido sucediendo década tras década detectándose casos por todo el mundo. *Salmonella* es una de las bacterias más detectadas en estos productos, interviniendo en brotes en numerosos países, desde el continente asiático, pasando por Europa y llegando a todas las regiones americanas. Para facilitar la prevención y detección, se deben favorecer los sistemas de alerta temprana de los sistemas sanitarios de los distintos países, sin perder de vista el perjuicio que supone estas alarmas en relaciones comerciales entre los países, se convierte en una rotura de mercado irreversibles a corto plazo. Pero es necesaria la comunicación de toxiinfecciones para poner en marcha medidas correctivas y preventivas para evitar el riesgo de aparición de otros brotes por microorganismos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

-Iniciar una investigación bibliográfica acerca de las intoxicaciones alimentarias producidas por cepas del género *Salmonella* en vegetales de hoja.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

-Realizar la búsqueda de distintos artículos científicos e identificar los más acordes al tema investigado y discutir el contenido de unos con respecto otros.

-Obtener información sobre la situación de brotes de salmonelosis asociadas a vegetales y su impacto en el mundo y en las industrias alimentarias.

-Conocer los diferentes métodos de eliminación o reducción de *Salmonella* inoculada intencionalmente en hojas de vegetales.

-Comparar los métodos de desinfección entre ellos para valorar el más eficaz, así como la diferencia desinfectante en otros alimentos.

-Identificar y conocer los métodos más novedosos en la detección de las distintas cepas de *Salmonella*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El método de investigación aplicado en este estudio corresponde a un método bibliográfico, sustentado en fuentes principales de información (el análisis de datos corresponde a una investigación de varios artículos) Se destaca el análisis del modelo de prevención y detección de *Salmonella* en vegetales de hoja, así como métodos para su reducción y eliminación (aplicación de ácidos orgánicos, técnicas inhibitorias, desinfección química, etc.).

3.1 Criterios de inclusión.

Se tuvieron en cuenta artículos referidos a estudios de *Salmonella* como patógeno asociado al consumo de vegetales de hoja verde entre los años (2010-2020), y brotes en los que estuvieran involucrados *Salmonella* spp. La elección de este microorganismo para la revisión está basado en la identificación y relación de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo.

3.2 Estrategia de búsqueda y selección de artículos.

Para la revisión se hizo una búsqueda de artículos que describieran diferentes técnicas para detectar y prevenir brotes de infección o intoxicación alimentaria en humanos por *Salmonella* spp asociados al consumo de vegetales, así como otras técnicas para su reducción o eliminación. Se utilizaron las bases de datos de Medline, Pubmed, Science Direct, SCIELO, repositorio TAUJA y Google SCHOLAR; la búsqueda se hizo en idioma español e inglés, y no hubo ningún filtrado en cuanto a zona geográfica de prevalencia del microorganismo, hábitos de consumo o preparación del vegetal. Para la búsqueda de artículos se utilizó una combinación de palabras y términos clave: "*Salmonella* spp", "infection", "illness", "foodborne", "detection", "lettuce", "vegetables", "disinfection", "prevention".

Para seleccionar los artículos, se revisaron los títulos y los resúmenes de cada uno de los documentos. Tras evaluar la calidad de esos resúmenes, se pasó a la revisión del texto completo; por último, se tomaba la decisión de incluirlo o excluirlo. Se excluyeron: los artículos que fueran demasiado antiguos, los que describían el brote pero no proporcionaron estrategias para eliminar o reducir la carga, y los artículos en los cuales el vegetal estaba implicado en la aparición de *Salmonella* pero asociado a otros parámetros y factores diferentes a los comentados a lo largo del estudio.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de datos.

Tras la búsqueda de literatura científica se encontró un total de 30 artículos. De estos, 9 cumplieron los criterios para poder ser usados en este estudio y 21 fueron excluidos. En la figura 6 se presentan los motivos de exclusión de los artículos. Durante la búsqueda se encontraron 7 artículos de investigación de *Salmonella* asociada a brotes por consumo de vegetales previamente contaminados. Además, se incluyeron también artículos que trataban en conjunto con *Salmonella* otros patógenos como *Escherichia coli*, *Campilobacter*, etc; se consideraron aptos para esta revisión. Los estudios incluidos fueron: Gómez, L et al., (2013); Tola, J., (2016); Posada, G., (2013); Neal, J et al., (2012); Wong, C et al., (2020); Kumar, R et al., (2020); Chacón, L et al., (2010); Luigi, T et al., (2015) y Miller, D et al., (2011). Es importante señalar que se encontraron muchos estudios donde los brotes de salmonelosis estaban asociados a otros alimentos como pollo, huevos y agua; los cuáles se tuvieron en cuenta para comparar en la discusión estos estudios con los de vegetales.

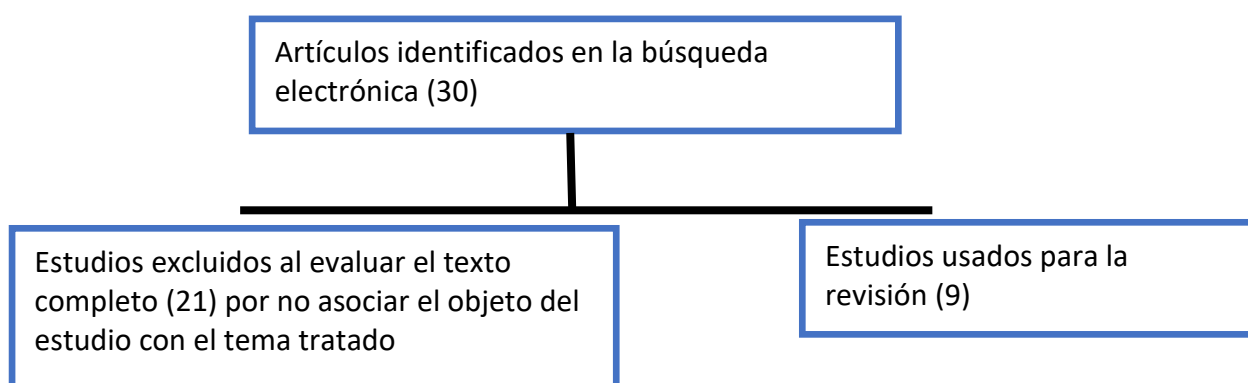


Figura 6: Diagrama de flujo del proceso de selección de los estudios.

Fuente: Elaboración propia.

4.2 Supervivencia de *Salmonella* en vegetales de hoja tras someterse a diferentes productos de desinfección.

4.2.1.- Evaluación de productos a base de ácidos orgánicos frente a *Salmonella* spp, en la desinfección de lechuga fresca.

En el siguiente punto se describen los resultados obtenidos en la determinación de la carga microbiana en hojas de lechuga inoculadas con cepas de *Salmonella*, cómo de eficaz es el tratamiento de la lechuga con mezclas de ácidos orgánicos y su reducción. Esta investigación basada en el estudio de hojas de lechuga tratadas con mezclas de ácidos orgánicos arrojó un buen resultado, confirmando a la mezcla de ácidos como un buen inhibidor microbiano.

De los artículos analizados en esta investigación destacamos dos muy interesantes que arrojan resultados esclarecedores en cuanto al uso de ácidos orgánicos como desinfectante. Así, Gómez, L et al., (2013) querían determinar la reducción de *Salmonella* spp en lechuga Batavia, utilizando un producto a base de ácidos orgánicos (Citrosan®). Estos autores inocularon muestras de lechuga con concentraciones conocidas de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, posteriormente estas colonias fueron expuestas a soluciones del ácido orgánico a distintas concentraciones (1000, 1200 y 2000 ppm) a 3 tiempos de exposición. Para el control se tomaron muestras contaminadas de lechuga sin desinfectar. La eficacia de la desinfección se midió mediante la reducción logarítmica de la población microbiana durante los tiempos de exposición al desinfectante y a las diferentes concentraciones del ácido orgánico.

La eficacia del desinfectante se midió a 4 tiempos de contacto: 0, 3, 5 y 7 minutos (mismos tiempos usados en el estudio de Tola, J., 2016). Se realizaron diluciones seriadas en agua peptona para obtener un inóculo de 10^5 UFC/ml.

Para la realización del estudio se realizaron 3 réplicas y 3 repeticiones en días diferentes. Se tomaron series de cada una de las repeticiones y se realizó la detección de *Salmonella* spp, con el fin de tener una caracterización de este microorganismo.

Para la elección de la concentración del desinfectante, se tomaron tres tubos con 2 ml de cada concentración del ácido orgánico usado como desinfectante (1000, 1200 y 2000 ppm) Citrosan® y un último tubo que contenía un tampón fosfato estéril como control. A cada uno de estos se les adicionaron 0.2 ml del inóculo de *Salmonella*. Tras el paso de los 4 tiempos señalados se incubaron los tubos por 24 horas y posteriormente se realizó la lectura por turbidez. Se observó que el método más efectivo en la inactivación del patógeno fue a 2000 ppm y 5 minutos. Tras esto *Salmonella* se inoculó en la superficie de los trozos de hoja lechuga. Se cogieron series de 10 trozos de hoja de lechuga (5 x 5 cm). A cada trozo se le inoculó una cantidad de 50 µml de la suspensión del patógeno. Como muestra control se aplicó el mismo procedimiento de inoculación a una serie de 10 trozos de hojas de lechuga, pero estas no tuvieron ningún tratamiento con desinfectante. Las muestras inoculadas se sumergieron en el desinfectante orgánico los tiempos descritos y se sembraron en placas de agar SS (*Salmonella- Shigella*); 37 ° C /48 horas.

La diferencia con el estudio de Tola, J., (2016) fue en la obtención de un inóculo de *Salmonella* de 10³ UFC/ml, siendo el mismo método de inoculación en la lechuga el reportado en ambos estudios (directamente en la superficie de los trozos de hoja de lechuga por el método de gota). El estudio de Tola, J., (2016), coincide también en la obtención de series de hojas de lechuga de 10, con un diámetro de 5 x 5 cm; así como la inoculación con una cantidad de 50 µml de la suspensión del patógeno. Y como control positivo se aplicó el mismo procedimiento de inoculación a una serie de 10 muestras sin la aplicación de ningún tratamiento con desinfectante.

Otra de las diferencias con el anterior estudio fue el uso de ácido orgánico; en el estudio de Tola, J., (2016) se eligieron 3 de las 10 mezclas de ácidos orgánicos que se usaron, así se escogieron las llamadas N° 5, 9 y 10. La N° 5 es una mezcla de ácido cítrico y acético al 50%; la N° 9 mezcla cítrico, acético y láctico en porcentajes de 16, 16 y 66 respectivamente; y la N° 10 mezcla estos mismos ácidos, pero en porcentajes cambiados con respecto al anterior.

Como resultados de estos estudios, se comprobó que había ausencia de *Salmonella*/25 g para todas las muestras de lechuga analizadas con el desinfectante más eficaz para cada estudio. En la tabla 3, se aprecia la cantidad inicial de *Salmonella* expresadas en log (UFC) que se inocularon en las hojas de lechuga para las pruebas.

Tabla 3: Carga microbiana inicial de *Salmonella* inoculada en las hojas de lechuga antes de su proceso de desinfección, expresado en UFC/g.

Estudio	log (UFC/g)
Gómez, L et al., (2013)	5.40
Tola, J., (2016)	6,6

Fuente: elaboración propia usando los datos de Gómez, L et al., 2013 y Tola, J., 2016.

Los resultados del estudio de Gómez, L et al., (2013) arrojaron una mejor actividad como desinfectante (Citrosan©) a una concentración de 2000 ppm y 5 minutos de contacto, respecto a concentraciones inferiores (1000 y 1200 ppm). Gracias a este tratamiento se redujo los inóculos a 0.98 ± 0.19 Log UFC/g. Esto significa una reducción del 90% en *Salmonella* spp. Por último, se determinó que 5 minutos de desinfección con Citrosan© es el tiempo idóneo para ser usado como antimicrobiano.

El estudio de Tola, J., (2016) muestra diferencias entre los tres desinfectantes orgánicos usados (Tabla 4). Se observa cómo hay una reducción logarítmica de las colonias a diferentes tiempos de exposición y con diferentes ácidos orgánicos. Así, el desinfectante N° 5, obtiene una disminución logarítmica de 3.72 lo que se traduce en una desinfección bacteriana del 99.9% de colonias y con el tiempo mínimo de exposición. Asimismo, al aumentar el tiempo de exposición, también lo hace la inhibición, consiguiéndose un 100% de eliminación de colonias. Para *Salmonella* podemos observar que los desinfectantes N° 9 y N° 10 son los que mejores resultados de desinfección bacteriana poseen. Con N° 9, la desinfección es completa (100% de colonias bacterianas) para todos los tiempos de exposición al desinfectante. Al igual ocurre con N° 10, con una reducción bacteriana de prácticamente el 100%.

Tabla 4: Comparación entre los tres desinfectantes orgánicos usados, a diferentes tiempos.

Patógeno: *Salmonella enteritidis*.

TIEMPO	EXP N° 5	% INHIBICIÓN	EXP N° 9	% INHIBICIÓN	EXP N° 10	% INHIBICIÓN
0	3.72	> 99%	2.41	100%	3.18	> 99%
3	2.3	100%	2	100%	2.32	100%
5	2.3	100%	2	100%	1.3	100%
7	2	100%	1.85	100%	0	100%

Fuente: Tola, J., 2016.

Efecto de la mezcla de ácidos orgánicos frente a *Salmonella* spp en lechugas inoculadas.

En la siguiente tabla, se muestra la comparativa en relación a la eficacia y la reducción de los diferentes ácidos orgánicos usados como desinfectantes de hojas lechuga. Los datos que se muestran corresponden a los valores positivos de los tratamientos. Se puede observar como la reducción es significativa y todos los ácidos orgánicos son eficaces para combatir al patógeno, obteniéndose altos porcentajes de reducciones. Se pone en evidencia por lo tanto que el uso de ácidos orgánicos como desinfectantes, logran inhibir de manera total la presencia de *Salmonella* en las lechugas. En el estudio de Tola, J., (2016) concretamente, se observa que hay una mayor reducción con respecto al otro estudio, ya que se debe tener en cuenta que éste parte de un inóculo de trabajo superior al usado en Gómez, L et al., (2013).

Tabla 5: Tabla comparativa en relación a la eficacia y la reducción de los diferentes ácidos orgánicos usados como desinfectantes de hojas de lechuga.

Estudio	Control positivo (Log UFC/g)	Tratamiento realizado	Reducción con el tratamiento	Reducción logarítmica
Gómez, L et al., (2013)	2,33	Citrosan©	1,35	0,98
Tola, J., (2016)	6,6	Nº 5	4,45	2,15
		Nº 9	5,3	1,3
		Nº 10	3,18	3,42

Fuente: elaboración propia con los datos de Gómez, L et al., (2013) y Tola, J., (2016).

En conclusión, ambos estudios arrojaron buenos datos sobre el poder desinfectante de sus ácidos orgánicos para eliminar el patógeno *Salmonella*. En el estudio de Tola, J., (2016) la mezcla N° 10 compuesta por Ácido cítrico 66 ml, Ácido láctico 16 ml, Ácido acético 16 ml, fue la que mejor resultados de desinfección bacteriana obtuvo frente *Salmonella*, resaltando este poder de desinfección incluso en el tiempo de exposición mínimo de 0 minutos.

Por otro lado, en el estudio de Gómez, L et al., (2013), gracias al tratamiento de lechuga fresca con el desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan© se redujeron inóculos altos (10^5 UFC/g) de *Salmonella* spp en 0.98 ± 0.19 Log UFC/g. Esto supone una reducción del 90% en *Salmonella* spp. Esta reducción se llevó a cabo a dosis de uso elevadas de Citrosan© (concentración de 2000 ppm), y a un tiempo de exposición de 5 minutos de contacto con el desinfectante. Este es el tiempo que produce la mejor acción antimicrobiana. Por tanto, en este estudio se observó como el desinfectante a base de ácidos orgánicos Citrosan© supone una alternativa efectiva y segura para ser usado como tratamiento frente a microorganismos patógenos en vegetales crudos y frescos.

Aunque el uso de ácidos orgánicos se corone como un buen antimicrobiano, siempre hay que tener en cuenta la prevención como mecanismo para reducir el riesgo microbiológico en vegetales frescos, que, asociado a los tratamientos de desinfección, supone la erradicación de la totalidad de los riesgos para ese producto.

4.2.2.- Estudio de supervivencia de *Salmonella* spp en superficies de acero inoxidable ensuciadas con sustancias orgánicas a base de restos de vegetales de hoja.

El estudio de Posada, G., (2013) evalúa la supervivencia de diferentes cepas de *Salmonella* spp usando como sustrato restos líquidos de vegetales de hoja. Así, en el estudio se toman cinco cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Como sustrato se eligieron cinco vegetales de hoja muy consumidos por la zona del mediterráneo: espinacas, repollo, lechuga iceberg, lechuga romana y perejil; con estos se elaboraron diferentes jugos vegetales para ser utilizados como sustrato en el experimento de supervivencia en superficies de acero inoxidable.

Para la inoculación de superficies de acero inoxidable se esterilizó esta superficie y se añadieron 0,1 ml de zumo vegetal con 10^9 UFC/ml del microorganismo de ensayo, distribuyéndose uniformemente en las superficies con la ayuda de la punta de una micropipeta, alcanzando una concentración final en superficies de 10^7 - 10^8 UFC/cm², aproximadamente. Una vez realizada la inoculación, las muestras que se iban a analizar se recogieron de la superficie de acero con ayuda de un hisopo y en diferentes tiempos de recogida (0'; 60'; 120'; 240'; 6h; 24h; 36h; 48h; 72h; 96h; 120h; 144h; 168h; 192h). Cabe destacar que las superficies de acero inoxidable que fueron inoculadas se almacenaron bajo refrigeración (alrededor de 6,5 ° C) y una humedad relativa 60- 70 %. Para el análisis microbiológico se usaron placas de medio de agar selectivo (agar Xylose-Lysine-Desoxycholate) para *Salmonella* spp. Después de la incubación a 37 ° C durante 24 h, se determinó el número de colonias características cultivadas en las placas de agar inoculadas.

Se analizaron los resultados obtenidos en el momento 0 (condiciones de humedad) y a las 2 horas (condiciones secas) con el fin de evaluar la capacidad de recuperación del método utilizado para el muestreo de superficies inoculadas. Las tasas de recuperación se calcularon como porcentajes de células recuperadas con respecto al inóculo inicial depositado en las superficies. Las tasas de recuperación de *Salmonella* spp fueron muy

bajas, oscilando entre el 3 y el 32 %, con el valor más bajo en solución salina, y el mayor porcentaje de recuperación, en lechuga Iceberg. En condiciones secas, las tasas de recuperación mostraron una enorme disminución en comparación con las condiciones húmedas, con valores inferiores al 0,3 % para *Salmonella* spp.

Tabla 6: Resumen de los datos de supervivencia de *Salmonella* obtenidos en superficies de acero inoxidable ensuciadas con diferentes sustratos de jugos vegetales.

Sustrato	Log UFC/cm² a las 0 horas	Log UFC/cm² a las 192 horas	Reducciones logarítmicas (log UFC/cm²)	Hora de finalización
Acelga	7.68	0.87	6.26	168 h
Lombarda	7.74	0.73	6.52	168h
Espinacas	7.80	0.89	6.53	48h
Lechuga iceberg	7.76	1.48	6.46	168h
Perejil	7.47	0.86	6.61	48h
Lechuga romana	7.57	0.68	7.68	168h
Solución salina	7.04	0.90	6.14	120h

Fuente: Posada, G., 2013.

En la tabla 6 se observa que, en los tiempos más destacados para cada vegetal, la mayor reducción del registro de *Salmonella* se dio en lechuga romana (7.68 log UFC/cm²), seguida de un grupo homogéneo compuesto por perejil, sustratos de lechuga y espinacas, así como solución salina (con una reducción de 6.14 log UFC/cm²); y finalmente la reducción más baja del grupo de vegetales correspondía a la obtenida en acelga (6.26 log UFC/cm²) (P≤0.05). Estos datos se escogieron principalmente alrededor de las 168h en casi todas las muestras vegetales, puesto que a este tiempo es cuando se ve la reducción máxima del microorganismo.

El estudio también arrojó resultados a las 24 h, los resultados mostraron un patrón similar al observado a las 2 h, con la mayor disminución en perejil y espinacas (6,17-6,58 log UFC/cm²), seguida de lechuga romana (5,63 log UFC/cm²), solución salina (5,15 log UFC/cm²), lechuga iceberg (4,43 log UFC/cm²), acelgas (3,93 log UFC/cm² y finalmente, lombarda con la reducción más baja (3,28 log UFC/cm²) (P≤0,05).

Así mismo, en el estudio también se incluyó el género *E. coli* para hacer una comparativa con *Salmonella*. La siguiente tabla (tabla 7) muestra un resumen comparativo en los tiempos y la reducción de ambos microorganismos para cada sustrato. Como se observa en la tabla, en general, las reducciones de ambos microorganismos son similares y la hora de finalización de la recogida de la muestra es similar para cada sustrato y microorganismo. Destaca la diferencia de 1 punto en la reducción de los patógenos usando el sustrato solución salina para el mismo tiempo de finalización; quizás esta diferencia se halle en las variaciones de la concentración de solución salina usada en cada experimento y con cada microorganismo (7,14 *E. coli* y 6.14 *Salmonella*)

Tabla 7: Resumen de los datos de supervivencia de *E. coli* obtenidos en superficies de acero inoxidable ensuciadas con diferentes sustratos de jugos vegetales.

Sustrato	Reducción <i>E. coli</i> (log UFC/cm ²)	Tiempo de finalización	Reducción <i>Salmonella</i> (log UFC/cm ²)	Tiempo de finalización
Acelga	6.22 ± 0,72	192h	6,26 ± 0,43	168h
Lombarda	5.19 ± 0.23	192h	6,52 ± 0,90	168h
Espinacas	6,47 ± 0,20	32h	6,53 ± 0,15	48h
Lechuga Iceberg	6,30 ± 0,83	192h	6,46 ± 0,89	168h
Perejil	7,90 ± 0,51	48h	6.61 ± 0.08	48h
Lechuga romana	8.24 ± 0.38	144h	7,68 ± 0,34	168h
Solución salina	7.14 ± 0.09	120h	6.14 ± 0,27	120h

Fuente: elaboración propia con los datos de Posada, G., 2013.

Si tenemos en cuenta la hora de finalización, las reducciones totales más altas y más bajas correspondieron a $8,24 \pm 0,38$ y $5,19 \pm 0,23$ log UFC/cm² para lechuga romana (144h) y lombarda (192h), respectivamente, en *E. coli*. Para sustratos con 192 h como hora de finalización, es decir, acelga, lombarda y lechuga iceberg, las reducciones totales fueron de 6,22, 5,19 y 6,30 UFC/cm², respectivamente. El tiempo de supervivencia más corto correspondió a espinaca y perejil con tiempos finales de 32h y 48h y reducciones totales de 6,47 y 7,90 log UFC/cm², respectivamente. Como hemos mencionado, los resultados de *Salmonella* spp se mantuvieron en concordancia con los patrones de supervivencia encontrados para *E. coli* O157:H7, obteniendo las reducciones totales más altas y más bajas en lechuga romana con $7,68 \pm 0,34$ log UFC/cm² y solución salina $6.14 \pm 0,27$ log UFC/cm² con 168h y 120h de tiempo de finalización, respectivamente. El tiempo de supervivencia más corto correspondió a espinaca y perejil con tiempos finales de 48h y reducciones totales de $6,53 \pm 0,15$ y 6.61 ± 0.08 log UFC/cm², respectivamente.

Con lo observado en las tablas 6 y 7, el perejil y la espinaca fueron los sustratos que más redujeron la capacidad de supervivencia de ambos microorganismos, con un tiempo final de 48 horas. Este resultado se hace especialmente relevante cuando se compara con solución salina (simulando las condiciones de limpieza en este estudio), que mostró una hora de finalización de 120 h y valores de reducción más bajos que los mostrados por los sustratos de jugo vegetal. Hay que tener en cuenta que la solución salina solo se compone de NaCl (0,85 %) y agua, y no hay materia orgánica. A su vez, se supone que los jugos vegetales contienen una alta carga de materia orgánica liberada de las células vegetales durante el proceso de homogeneización. Como se menciona en el estudio de Posada, G et al., (2013) se espera que las superficies sucias mejoren la capacidad de supervivencia, que también ha sido observada por otros autores que estudiaron la supervivencia de *E. coli* y *Salmonella* spp en superficies sucias con sustratos que contenían proteínas y glucosa. Sin embargo, los resultados del estudio hacen pensar que ciertos jugos vegetales ejercen un efecto negativo sobre la capacidad de supervivencia de ambos patógenos entéricos. En este sentido, hay estudios que reportan que los sueros alimentarios reducen la capacidad de supervivencia bacteriana en superficies de acero inoxidable, como la carne de cerdo

para *Salmonella* spp (Vogel, B et al., 2010). Por ello, se sugiere como posible explicación, la existencia de compuestos en las verduras que una vez liberados debido a los procesos de elaboración, serían capaz de ejercer cualquier tipo de efecto antimicrobiano sobre los microorganismos inoculados en la superficie (Tajkarimi, M et al., 2010). El estudio de Wong, P et al., (2006), informó que los extractos de perejil obtenidos en agua y metanol dieron lugar a daños celulares en *E. coli*, sugiriendo que los compuestos polifenólicos podrían afectar la función y la integridad de la membrana celular bacteriana.

En conclusión, este estudio confirmó que *Salmonella* spp es capaz de sobrevivir en acero inoxidable ensuciado con diferentes jugos vegetales de 1 a 8 días. Los sustratos de perejil y jugo de espinaca redujeron la capacidad de supervivencia con sólo 1-2 días, en comparación con el resto de sustratos, particularmente, con respecto a la solución salina, que simula las condiciones de limpieza. Este hallazgo sugeriría que estos jugos vegetales podrían contener ciertas sustancias antimicrobianas que afectan a la viabilidad celular en las superficies. Estas sustancias podrían ser compuestos polifenólicos y otras moléculas provenientes del sistema de defensa de las plantas contra las infecciones. No obstante, para obtener datos y conclusiones más precisos, deben llevarse a cabo experimentos específicos para determinar dichas sustancias y sus mecanismos de acción.

4.2.3.- Comparación de múltiples desinfectantes químicos para reducir *Salmonella* en hojas de espinaca.

Este estudio fue realizado por Neal, J et al., (2012) con el objetivo de comparar la eficacia de múltiples desinfectantes químicos en la reducción de *Salmonella* spp. Así, se quiso probar la eficacia de desinfectantes como ácido láctico, ácido peroxiacético, agua clorada, agua ozonada y dióxido de cloro gaseoso. Para facilitar el desarrollo de patógenos en espinacas, se utilizaron cepas de *Salmonella* resistente a la rifampicina (Rif⁺). El inóculo inicial de *Salmonella* en las hojas de espinaca fue de 7.0 UFC/g. Para proceder al lavado con el desinfectante, se usaron: ácido láctico al 2%, agua clorada (200 mg/L), solución de ácido peroxiacético (80 mg/L), inmersión en agua ozonada (1 mg/L) y tratamiento con dióxido de cloro gaseoso (1,2 y 2,1 mg/L). El tratamiento de control fue un lavado con agua.

Los resultados arrojaron resultados muy positivos sobre la eficacia de los diversos desinfectantes en la reducción de *Salmonella* inoculada en las espinacas. Como se observa en la tabla 8, el ácido láctico al 2% produjo la mayor reducción en *Salmonella* (2,3 log UFC/g), y fue muy diferente de las reducciones obtenidas por el lavado solo con agua, lo que resultó en sólo una reducción de 0,7 log UFC/g. Del mismo modo, en un estudio de Lin et al., (2002) se obtuvo una reducción de 4 log UFC/g de *Salmonella enteritidis* en lechuga con aplicación de ácido láctico al 1,5%, pero negativamente se afectó a las hojas de lechuga porque produjo un pardeamiento con este tratamiento.

El ácido peroxiacético redujo *Salmonella* en sólo 0,8 log de UFC/g. Esto va en concordancia con el estudio de Buchholz, A et al., (2010), donde también informaron que el ácido peroxiacético al 1-3% utilizado para tratar las semillas de alfalfa contaminadas con *Salmonella* producía sólo una reducción de 1 log UFC/g, independientemente de la concentración. En contraposición, un estudio de Posada, G., & Carpio, E., (2019) reportaron al peroxiacético como el desinfectante más eficaz en vegetales IV Gama, con una reducción decimal de UFC/g bastante mayor en

comparación con los otros dos métodos usados en ese estudio: hipoclorito de sodio y agua. Además, se vio como con este desinfectante se consiguió lesionar a los microorganismos impidiendo su supervivencia con el paso de los días.

El agua clorada arrojaba datos similares al tratamiento solo con agua, con una reducción de 0,7 log de UFC/g. En contraste con Suslow, T et al., (2002), que encontraron que el tratamiento de semillas de alfalfa con agua clorada fue eficaz para eliminar *Salmonella*. Sin embargo, Niemira, B., (2007) encontró que un desinfectante clorado a base de hipoclorito de sodio a concentraciones de 300 o 600 ppm no era diferente de la desinfección con agua en la reducción de *E. coli* O157:H7 en espinacas.

El ozono durante 15 minutos redujo *Salmonella* en 0,9 log UFC/g, y el tratamiento del ozono durante 30 minutos redujo el patógeno 1.0 log UFC/g. Se ha demostrado que el ozono reduce la *Salmonella* de melones inoculados con el patógeno (Selma, M et al., 2008). Por último, las muestras de espinacas expuestas al gas clorado durante 30 minutos lograron menos reducción que el lavado con agua, y 1 h de exposición redujo *Salmonella* sólo 0,6 UFC/g. Sin embargo, cuando se utilizó dióxido de cloro en tomates inoculados con *Salmonella*, se obtuvieron reducciones de 3,86 log con 8 mg/L en 60 segundos (Trinetta, V et al., 2010). Al igual que el estudio de Bhagat, A et al., (2010), donde se observó resultados similares, con una reducción de más de 5 log UFC/ g en *Salmonella* en superficies de piel de tomate, usando un tratamiento con 0,5 mg/L de gas clorado durante 12 minutos.

Tabla 8: Tabla comparativa en relación a la eficacia y la reducción de los diferentes desinfectantes en hojas lechuga.

Tratamiento	Reducción logarítmica UFC/g
Lavado con agua	0.7
Ácido láctico	2.7
Agua clorada	1.0
Ácido peroxiacético	1.1
Agua ozonada (15 minutos)	1.1
Agua ozonada (30 minutos)	0.6
Gas dióxido de cloro (30 minutos)	0.7
Gas dióxido de cloro (60 minutos)	0.7

Fuente: Neal, J et al., 2012.

En conclusión, el desinfectante más eficaz para obtener una reducción bacteriana significativa en hojas de espinacas frescas fue el ácido láctico al 2% pulverizado durante 30 segundos. Aunque las hojas de espinaca tratadas con ácido láctico a temperatura alta mostraron signos iniciales de decoloración después del tratamiento. Este problema organoléptico no se produjo con los otros desinfectantes químicos utilizados en este estudio. Por ello es vital la realización de más estudios para determinar la concentración óptima de ácido láctico y la temperatura idónea para fijar los atributos sensoriales de las hojas de espinaca. Gracias a este estudio se pudo comprobar que el ácido láctico usado como antimicrobiano para el tratamiento de las espinacas frescas parece proporcionar una medida adicional de seguridad al reducir los niveles de patógenos, en los vegetales de hoja (Neal, J et al., 2012).

4.3 Evaluación de bacteriófagos como antimicrobianos.

Como se ha visto, existe innumerables métodos de reducción y/o eliminación de múltiples patógenos, especialmente *Salmonella* spp en vegetales de hoja verde. Desafortunadamente, los tratamientos desinfectantes no pueden eliminar completamente los patógenos bacterianos entéricos debido a la formación de biopelículas, la inaccesibilidad del sitio de unión, la fuerza de unión o la internalización del patógeno (Burnett, S et al., 2000).

El uso de bacteriófagos como medio para inactivar bacterias se propuso hace años, tras su descubrimiento. Son múltiples las ventajas de utilizar bacteriófagos como agentes antimicrobianos en los alimentos: alta especificidad, autorreplicación, ausencia de efectos secundarios y no provoca toxicidad en humanos. La alta especificidad de bacteriófagos permite que la microbiota natural permanezca intacta, evitando así efectos indeseables debidos a alteraciones en los patrones de deterioro o la inactivación de microorganismos deseables para el sector alimentario (Sillankorva, S et al., 2012). Además, los bacteriófagos son insípidos y su adición no altera las características o atributos sensoriales de los alimentos, factor que preocupa a las empresas alimentarias (Moye, Z et al., 2018).

En los últimos años, ha habido algunos intentos de usar bacteriófagos para el control de *S. enterica* en vegetales y vegetales de hoja. Los resultados de estas investigaciones han demostrado que los bacteriófagos reducen las poblaciones de *Salmonella* spp en estos alimentos (Spricigo, D et al., 2013; Zhang, X et al., 2019).

4.3.1.- Inactivación de diferentes cepas de *Salmonella* en melón y lechuga mediante un cóctel de bacteriófagos líticos. Estudio de comparación con alimentos como pollo y zanahoria.

Este estudio fue llevado a cabo por Wong, C et al., (2020) con el objetivo de determinar la eficacia de un cóctel de bacteriófagos contra varias cepas de *S. enterica* en tejidos de hojas de lechuga romana y melón.

Para la preparación de la muestra se usaron trozos de lechuga romana y melón, cortados en secciones de hojas de 2 x 2 cm y de pulpa de melón (2 x 2 x 0,2 cm). Se utilizaron cinco bacteriófagos de *Salmonella* aislados de una variedad de fuentes (Tabla 9) para formular un cóctel. Los aislados se seleccionaron en función de su capacidad para lisar al menos 35 de las 43 cepas de *S. enterica*.

Tabla 9: Bacteriófagos utilizados en este estudio.

Bacteriófago	Fuente	Ubicación	Cepa hésped de <i>Salmonella</i> para aislamiento	Cepa hésped de <i>Salmonella</i> para propagación
Φ 3	Lodos pretratados	Montreal	Enteritidis S7	Enteritidis S7
Φ 6	Lodos pretratados	Montreal	Javiana S1297	Javiana S1297
Felix 01	Colección de virus Felix d'herell	Quebec	Typhi	Paratyphi B
HER 20	Colección de virus Felix d'herell	Quebec	Newport C487-69	Newport C487-69
SE13	Aguas residuales después del primer tratamiento	Vancouver	Newport S195	Newport S195

Fuente: Wong, C et al., 2020.

El cóctel de bacteriófagos se aplicó 24 h antes de la inoculación con *S. entérica*, a una concentración de aproximadamente $2,5 \cdot 10^8$ PFU/cm², con el objetivo de examinar la capacidad del fago para inactivar los patógenos que aparezcan en los tejidos de las plantas durante el manejo poscosecha. El cóctel de bacteriófagos (100 µL) se aplicó a los trozos de hoja de lechuga y pulpa de melón. Como control negativo, se aplicó una solución de CaCl₂ (1,0 mM) a diferentes trozos de las muestras. Tras la inoculación, las muestras pasaron a incubación en placas de Petri. Se incubaron a una temperatura de

8° C a modo de simulación de los frigoríficos domésticos. Después de 24 h de incubación, se aplicaron 100 µl de cada inóculo de *S. enterica* a la superficie de cada trozo de muestra con una concentración de 10⁵ UFC/ml. Las poblaciones de *Salmonella* se midieron inmediatamente después de la inoculación (día 0) y después a las 24 y 48 horas. Paralelamente, se midieron las poblaciones mesofílicas aeróbicas totales del tejido vegetal que no recibieron tratamiento antes de la incubación. Las poblaciones aeróbicas se midieron los días 0, 1 y 2.

El estudio de Kumar, R et al., (2020) siguió el mismo protocolo de inoculación, pero esta vez en muestras de pollo y zanahorias. A cada muestra, se le inoculó 25 µl de *Salmonella* (2 × 10⁵ UFC/ml). Tras un secado, se adicionó 25 µl de fagos (8 × 10⁸ PFU/ml). El efecto de los fagos sobre las bacterias se controló mediante el recuento de colonias bacterianas en placas de agar XLD después de 0, 2, 4, 6 y 24 h de tratamiento con fagos. A diferencia del estudio de Wong, C et al., (2020), que midió el efecto de los fagos a las 24 y 48 horas. Además, otra de las diferencias con el primer estudio fue que Kumar, R et al., (2020) inocularon la muestra con el patógeno y luego adicionaron los fagos; en cambio, Wong, C et al., (2020), primero adicionaron los fagos y tras un día de incubación inocularon *Salmonella* a las muestras.

En el experimento de Kumar, R et al., (2020) también se estudiaron muestras de ensalada de zanahoria, donde se inoculó 25 µl de *Salmonella* y posteriormente se añadió el cultivo de fagos. Para el control negativo, se añadió la misma cantidad de (25 µl) de un tampón en lugar de la suspensión de fagos. Posteriormente, las muestras de zanahoria se incubaron en placas de agar XLD a 37 ° C durante 24 h.

En la siguiente tabla se muestra los resultados de ambos estudios en cuanto a reducción logarítmica del patógeno en las diferentes muestras de alimentos y la comparativa entre ambos estudios (Tabla 10).

Tabla 10: Reducciones logarítmicas entre las diferentes matrices alimentarias con respecto al patógeno *Salmonella* spp.

	<u>WONG, C ET AL., (2020)</u>		<u>KUMAR, R ET AL., (2020)</u>	
	Lechuga romana	Melón	Pollo	Ensalada de zanahoria
REDUCCIONES LOGARÍTMICAS	4 log UFC/cm ² <u>Cepas:</u> S3, S200, S203	2-3 log UFC/cm ² <u>Cepas:</u> S3, S200, S203	1 log UFC/ml	1 log UFC/ml
	1-2 log UFC/cm ² <u>Cepas:</u> S2, S193, S194	0.5-1.5 log UFC/cm ² <u>Cepas:</u> S2, S193, S194		
	<i>S. Newport:</i> sin reducción logarítmica			

Fuente: elaboración propia con los datos de Wong, C et al., 2020 y Kumar, R et al., 2020.

Los resultados del estudio de Wong, C et al., (2020) mostraron que seis de las siete cepas de *S. enterica* que se inocularon individualmente en la superficie de la hoja de lechuga romana y en tejidos de melón tratados con un cóctel de cinco bacteriófagos, se vieron significativamente afectadas ($P < 0,05$) por el tratamiento con fagos. Las seis cepas de *Salmonella* fueron: S3, S200, S203, S2, S193 y S194. En lechugas, las poblaciones de S3, S200 y S203 se redujeron hasta en 4 log UFC/cm²; y las reducciones de población de las cepas S2, S193 y S194 fueron menores, oscilando entre 1 y 2 log UFC/cm². En tejidos de melón, las poblaciones de las cepas S3, S200 y S203 se redujeron en 2-3 log UFC/cm²; y las de S2, S193 y S194 en 0,5–1,5 log UFC/cm². Por el

contrario, no hubo un cambio significativo ($P > 0.05$) en las poblaciones de la cepa *S. Newport S195*. Estos datos se obtuvieron en el momento 0, inmediatamente después de la inoculación de tejidos de lechuga y melón.

Las diferencias entre el recuento poblaciones de *S. enterica* en las muestras de control y las tratadas se observaron durante la incubación posterior de 1 y 2 días en el tejido de lechuga inoculado con las cepas S3, S200, S203, S2; sin embargo, las poblaciones de las cepas S193 y S194 no fueron significativamente diferente después de 1 o 2 días de incubación a 8 ° C. Las poblaciones de las cepas S3, S200, S203, S2 y S193 también permanecieron más bajas en el tejido de melón tratado con los fagos con respecto al control, pero las poblaciones de la cepa S194 aumentaron de 2,97 a 4,80 log UFC/cm² entre el día 1 y 2.

Las mayores reducciones en *S. enterica* medidas en el presente trabajo ocurrieron el día 0 contra las cepas *S. enteritidis* S3, *S. Javiana* S200 y S203 y *S. thompson* S194. Sin embargo, el patógeno en la lechuga disminuyó después del día 1 y 2, independientemente del tratamiento aplicado, probablemente en respuesta a la disminución de la actividad del agua.

Se puede afirmar en este estudio que un cóctel formulado a partir de cinco bacteriófagos líticos eficaces contra un amplio rango de patógenos aplicados antes de *S. enterica*, pudieron reducir las poblaciones de varias cepas inoculadas en hojas de lechuga romana y tejidos de melón, ya que la aplicación del cóctel de cinco fagos a una densidad de 10⁸ PFU/cm² resultó en una reducción de las poblaciones de *Salmonella* de 4 log UFC/cm², un grado aparentemente alto de inactivación dado que las reducciones de bacterias basadas en bacteriófagos en los alimentos sólidos en general oscilan entre 1 y 3 log UFC/g.

Además, se vio que el coctel de fagos fue más eficaz contra *S. enterica* inoculada en lechuga romana que en tejidos de melón. La variación de las reducciones de patógenos en los alimentos de origen vegetal se ha atribuido a numerosos factores, incluidas las diferencias en la composición química y las superficies colonizadas por bacterias diana (Sharma, M et al., 2009).

El estudio de Kumar, R et al., (2020) mostró unos resultados algo distintos entre sus muestras de alimentos y con respecto al primer estudio. Las muestras de pollo que se habían contaminado con 2×10^5 UFC/cm² de *S. enteritidis* y luego tratadas con bacteriófagos mostraron una reducción significativa (1 log UFC/ml) del patógeno después de 5 h de incubación a temperatura ambiente en comparación con el control no tratado (Figura 7).

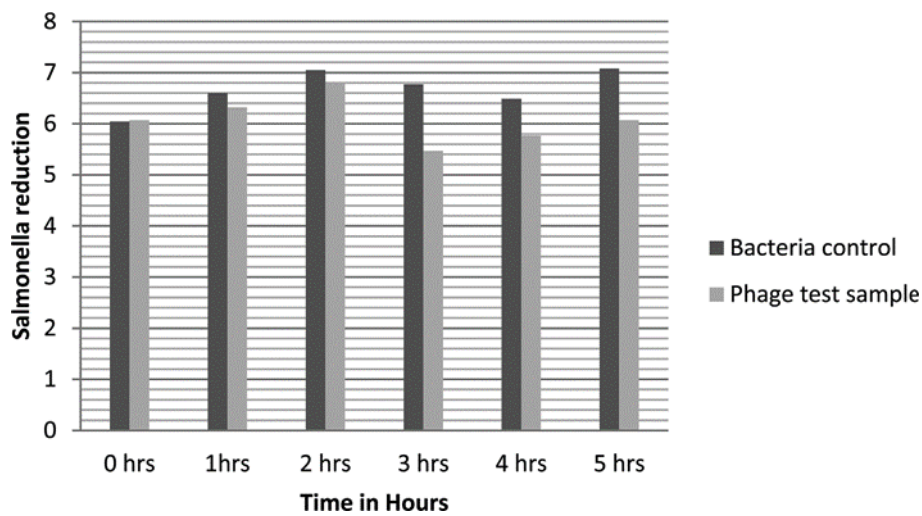


Figura 7: Efecto lítico de los fagos sobre *Salmonella* (log UFC/ml) en muestras de pollo contaminadas experimentalmente.

Fuente: Kumar, R et al., 2020.

Los resultados del experimento sobre las muestras de zanahoria arrojaron una reducción significativa en la población de *Salmonella* (1 log UFC/ml) después de 4 h de incubación. El grupo de control sin fagos mostró un aumento en la población de *Salmonella* pasando el tiempo. El experimento se realizó tres veces, y los valores en el gráfico representan los valores medios a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h (Figura 8). Se puede decir que la capacidad del bacteriófago usado para reducir la contaminación por *Salmonella* en zanahoria se demostró con una reducción significativa de 1 log UFC/ml.

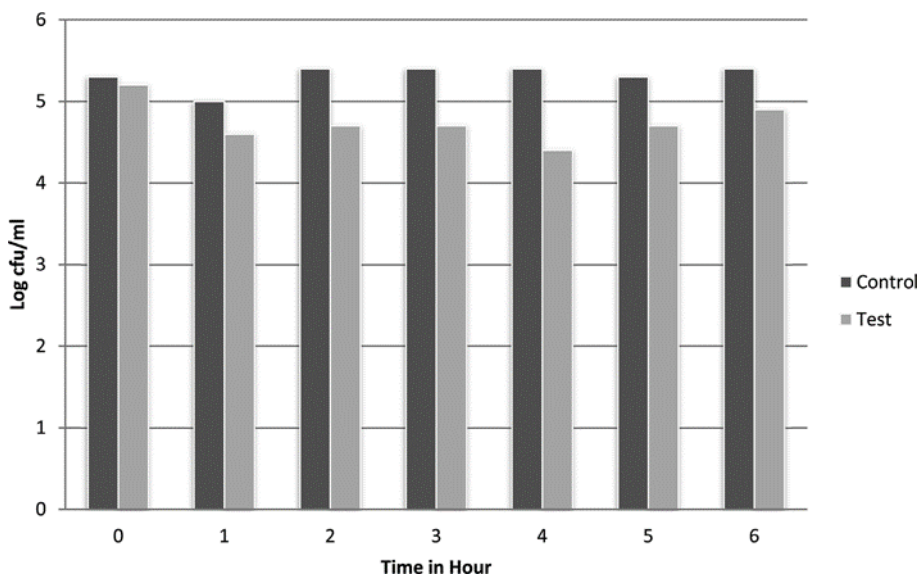


Figura 8: Efecto lítico de los fagos sobre *Salmonella* (log UFC/ml) en muestras de zanahorias contaminadas experimentalmente.

Fuente: Kumar, R et al., 2020.

Como se observa en ambos estudios, la aplicación del cóctel de bacteriófagos puede inactivar varias cepas de *Salmonella*, la eficacia dependerá tanto de la cepa como del alimento que se trate. Varios estudios han informado de una eficacia variable contra diferentes cepas de *S. enterica*. Por ejemplo, Spricigo et al., (2013) mostraron que un cóctel de bacteriófagos podría reducir las poblaciones de *S. typhimurium* en 3,9 log UFC/g en lechuga recién cortada, pero solo 2,2 log UFC/g de *S. enteritidis*. A pesar de la formulación del cóctel de bacteriófagos, el cóctel utilizado en el estudio de Wong, C et al., (2020), fue ineficaz contra una de las siete cepas (*S. Newport S195*) en ambos

tejidos vegetales, un resultado inesperado ya que supuestamente, la cepa era susceptible a la lisis por los bacteriófagos del cóctel (Fong, K et al., 2017).

Los autores que han estudiado los fagos como antimicrobianos coinciden en que la disminución de los patógenos varía en diferentes matrices de alimentos debido a las diferencias en la actividad del agua (Moye, Z et al., 2018; Spricigo et al., 2013). Se cree que el agua libre en matrices de alimentos húmedos, como melones en rodajas, facilita el transporte de bacteriófagos y favorece la eliminación de las bacterias diana (Moye, Z et al., 2018). Dadas estas averiguaciones, Wong, C et al., (2020) pensaron que iba a haber una mayor eficacia contra *S. enterica* en melón en lugar de la superficie de la lechuga seca. Sin embargo, los tejidos cortados de melón pueden liberar una gran cantidad de nutrientes, como azúcares de fácil asimilación, que están presentes en concentraciones más altas (0,079 g/g) que en los tejidos de lechuga romana (0,011 g/g) y por ello perjudica más al fago a la hora de ejercer su efecto antimicrobiano.

En resumen, los resultados de estos estudios han indicado que la eficacia de un cóctel de bacteriófagos depende de varios factores, incluida la cepa huésped y la matriz del alimento. La susceptibilidad puede deberse a la diferencia de cócteles preparados a partir de varios bacteriófagos. Es por ello que, en el estudio de Wong, C et al., (2020) las diferencias en las reducciones de población obtenidas con las siete cepas de *S. enterica* inoculadas en hojas de lechuga y pulpa de melón pueden haber sido una consecuencia de la susceptibilidad de los hospedadores y la concentración del cóctel de bacteriófagos aplicado a la matriz alimentaria. La eficacia del cóctel de bacteriófagos fue dependiente de la cepa, reduciendo las poblaciones de 1 a 4 log UFC/cm² en lechuga y melón. El cóctel no fue eficaz contra *S. Newport S195* en ambos productos frescos. Por otro lado, el estudio de Kumar, R et al., (2020) demostró que los bacteriófagos líticos son eficaces como agente de biocontrol natural de patógenos transmitido por alimentos, pero dependiendo del alimento a tratar y su composición química. Por lo tanto, las aplicaciones industriales aún pueden requerir tratamientos y estudios adicionales para reducir aún más las poblaciones de *Salmonella* usando fagos.

A continuación, se expone una tabla donde se resumen los estudios usados en esta revisión bibliográfica y sus diferencias en relación a las muestras y métodos de reducción y eliminación del patógeno *Salmonella*.

Tabla 21: Cuadro resumen de los artículos usados en la revisión bibliográfica.

Autor	Muestra alimentaria	Tratamiento desinfectante	Cepa de <i>Salmonella</i> estudiada
Gómez, L et al., (2013)	Lechuga fresca	Ácidos orgánicos (Citrosan®)	<i>S. enteritidis</i> y <i>S. typhimurium</i>
Tola, J et al., (2016)	Lechuga	Ácidos orgánicos: Nº 5: ácido cítrico y acético Nº 9: ácido cítrico, acético y láctico Nº 10: ácido cítrico, acético y láctico	<i>S. enteritidis</i>
Posada, G., (2013)	Jugos de diferentes vegetales (espinaca, lombarda, lechuga...)	Sin tratamiento químico	<i>Salmonella entérica subsp entérica</i> y <i>E. coli</i>
Neal, J et al., (2012)	Hojas de espinaca	Ácido láctico, peroxiacético, agua clorada, agua ozonada y ClO ₂ gaseoso	<i>Salmonella</i> spp
Wong, C et al., (2020)	Lechuga romana y melón	Bacteriófagos	<i>S. enterica</i>
Kumar, R et al., (2020)	Pollo y ensalada de zanahoria	Bacteriófagos	<i>Salmonella</i> spp

Fuente: elaboración propia.

4.4 Ensayos de detección de *Salmonella* spp en vegetales de hoja usando diferentes técnicas comerciales y experimentales.

El aislamiento tradicional de *Salmonella* spp implica un preenriquecimiento no selectivo de la muestra, seguido por un paso de enriquecimiento selectivo y confirmación bioquímica y serológica de las colonias sospechosas. El método actual de la ISO consiste en un preenriquecimiento de muestras en agua de peptona (BPW) seguida de un enriquecimiento selectivo en Rappaport Vassiliadis (RVS) (Lee, K et al., 2015).

Los métodos rápidos que utilizan clonación molecular y ADN recombinante han sido desarrollados, validados, y están disponibles en el mercado. Estos procedimientos acelerados de detección de *Salmonella* permiten respuestas rápidas, ahorran espacio de almacenamiento de suministros y aumentan el rendimiento de las muestras. Es por esto, que el método rápido puede ser definido como la técnica que permite la detección de *Salmonella* spp en muestras y entrega resultados fiables en pocas horas. Los métodos rápidos disponibles comercialmente para la detección de *Salmonella* se pueden dividir en varias categorías, incluyendo los nuevos medios selectivos, los procedimientos convencionales, los ensayos basados en inmunología y los ensayos basados en ácidos nucleicos (Lee, K et al., 2015).

De estos métodos, los procedimientos ELISA y PCR muestran una gran especificidad y sensibilidad con respecto a los métodos convencionales. Los ensayos ELISA son capaces de detectar la concentración de *Salmonella* a un nivel de 10^4 - 10^5 UFC/ml mientras que los ensayos basados en PCR proporcionan niveles de sensibilidad de 10^4 /ml después del enriquecimiento. La sensibilidad y la especificidad de estos métodos dependen en gran medida de la flora, matriz de muestras, presencia de sustancias inhibitorias (por ejemplo, grasas, proteínas, metales pesados y antibióticos) (Alakomi, H et al., 2009).

4.4.1.- Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp en lechuga.

El artículo de Chacón, L et al., (2010) tuvo el objetivo de estandarizar una técnica de PCR en vegetales como la lechuga para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp; este gen es muy importante para el género *Salmonella* puesto que es el que se relaciona con el proceso de invasión al epitelio intestinal, siendo este gen el que causa los problemas gastrointestinales por salmonelosis.

La bacteria que se usó en el ensayo y se inoculó en la lechuga para la estandarización de la PCR fue una cepa de *Salmonella enterica* serovariedad *enteritidis* (ATCC 13076). Para la realización de las prueba de especificidad de la PCR se utilizaron un gran número de bacterias del género *E. coli*, destacando: *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* (LT-/ST-), *E.coli* (LT+/ST-), *E.coli* (LT-/ST+), *E.coli* (LT+/ST+), *E.coli* enteropatógena, entre otras. En cuanto a la muestra de ensayo, se utilizaron 13 muestras de 25 g, analizadas por triplicado (39 muestras en total) de lechugas variedad mantequilla.



Figura 9: Lechuga variedad mantequilla.

La lechuga fue dividida en muestras de 25 gramos y se contaminaron intencionalmente con *Salmonella* ATCC 13076. Como control negativo se utilizó una porción de muestra de 25 g inoculada con 1 mL de agua de peptona estéril. Estas muestras se sometieron a un preenriquecimiento y se incubaron por 24 horas a 35°C. En paralelo se realizó un ensayo con caldo tetracionato y selenito-cistina para detectar colonias con morfología sospechosa de *Salmonella* spp, para ser analizada por métodos bioquímicos tradicionales (cultivo convencional).

Para la extracción del ADN se escogió 1 ml del caldo de preenriquecimiento, tanto de las lechugas contaminadas de *Salmonella* spp, como las que se mezclaron con agua peptonada estéril. La extracción del ADN se realizó por choque térmico. Era una PCR con modificaciones (llamada PCR touchdown), la cual mostró ser reproducible, específica y sensible para la detección de *Salmonella* spp. La PCR constó de 10 ciclos con una temperatura de hibridación inicial de 65°C, disminuyendo 1°C cada ciclo; seguido de 30 ciclos con una temperatura de hibridación estable a 55°C. Como adyuvante se agregó dimetil sulfóxido. Por último, para obtener un ADN control positivo de la PCR, se inoculó 1 ml de agua destilada estéril con una colonia de *Salmonella* spp.

Para obtener unos resultados precisos se procedió a la estandarización de la técnica de PCR. Para poder obtener una amplificación adecuada del producto de 389 pb del gen *invA*, fue necesario realizar varias PCR. En cada repetición se fueron modificando temperaturas y tiempos en el termociclador.

Purificación y secuenciación: La banda obtenida de 389 pb se purificó a partir del gel de agarosa utilizando un kit comercial. Gracias a que se realizó una PCR touchdown, este producto fue secuenciado utilizando sus mismos iniciadores

Reproducibilidad de la técnica de PCR: Se analizó el ADN de 30 aislamientos de *Salmonella* spp (identificadas bioquímica y serológicamente) conforme al protocolo de PCR estandarizado. En todos los casos se observó la banda correspondiente al gen invA (Figura 10).

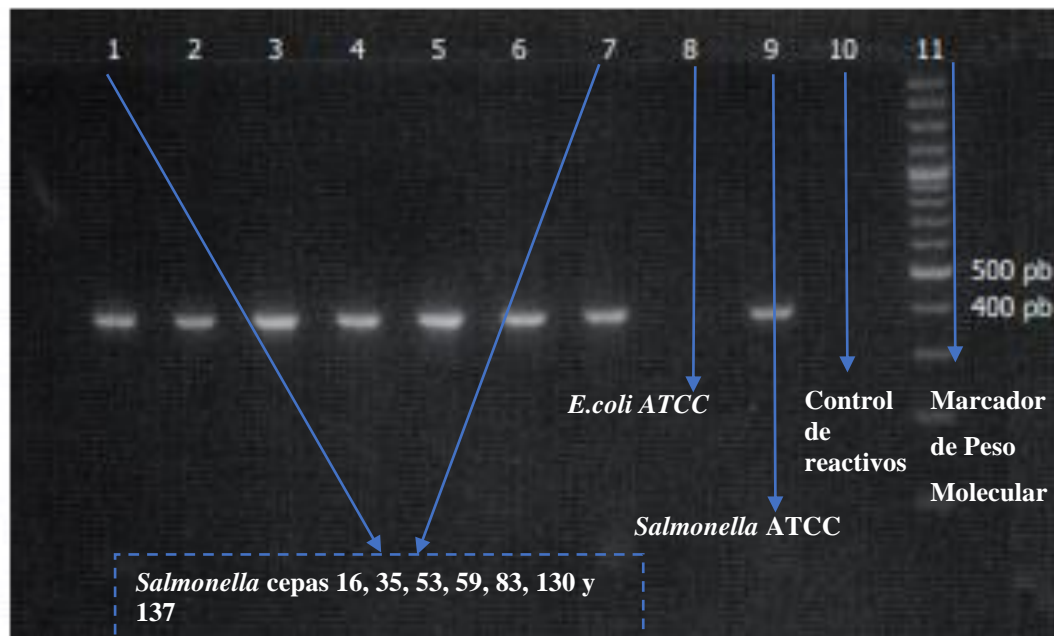


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio para análisis de reproducibilidad de *Salmonella* spp.

Fuente: Chacón, L et al., 2010.

PCR vs cultivo convencional: Se analizaron por cultivo varias porciones de 25 g de lechuga contaminadas con concentraciones conocidas de *Salmonella* spp y se logró evidenciar por cultivo convencional y por PCR concentraciones de hasta 10^2 UFC/25 g. Los ADN extraídos no mostraron amplificación del producto de 389 pb. La comparación cualitativa del método de PCR con el cultivo convencional, mostró una mayor eficiencia del PCR, ya que se rebaja el tiempo de procesamiento de muestra y se obtienen resultados en 36-48 horas, comparado con la técnica de cultivo (5-6 días). Pero el nivel de detección fue el mismo para ambos métodos (10^2 UFC/25 g).

En conclusión, la técnica estandarizada de PCR realizada en este estudio, supone una herramienta base para la detección de *Salmonella entérica*, y podría utilizarse en un futuro para analizar otras matrices de alimentos, pues la transmisión de este patógeno se da en otros muchos alimentos y agua contaminada. Gracias a la detección de factores de virulencia, como el gen *invA*, se puede obtener información de la identidad de una bacteria determinada y su potencial virulento, ya que la producción de cuadros gastrointestinales depende, en gran medida, de los genes de virulencia que posea la bacteria y, como beneficio adicional permite un resultado presuntivo en menor tiempo.

El estudio de Luigi, T et al., (2015) confirma lo reportado por el estudio anterior (Chacón, L et al., 2010). Luigi, T et al., (2015) concluyó que la realización de la PCR para detectar el gen *invA* de *Salmonella* resultó ser muy específica y sensible para la detección de *Salmonella* spp en suspensiones bacterianas con recuentos de 4×10^9 UFC/ml hasta 3×10 UFC/ ml. Los resultados obtenidos en este estudio cumplieron con los requisitos de selectividad, exclusividad, robustez y reproducibilidad. Asimismo, hay mucha diferencia con el método convencional de detección de *Salmonella* spp, que resulta laborioso y requiere de medios de cultivos para su reactivación y aislamiento en medio selectivo. Además, con el método tradicional se necesitan de 5 a 7 días para confirmar los resultados, con la PCR usando el gen *invA*, el tiempo de detección se acorta (24 horas). A pesar de ello, se sugiere continuar con investigaciones donde se aplique este protocolo de PCR para detectar *Salmonella* spp en otro tipo de alimentos susceptibles de este patógeno.

4.4.2.- Ensayo de una PCR en tiempo real con transcriptasa inversa para la detección de *Salmonella typhimurium* en lechugas y tomates.

Son muchos los artículos que utilizan PCR en tiempo real para la detección de patógenos en alimentos. El inconveniente de estos métodos moleculares típicos basados en ADN es que no distinguen entre células vivas y muertas. Es por ello que varios investigadores han afirmado la idoneidad del uso de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) para la determinación de la viabilidad de *Salmonella* a través del ARNm para el gen *invA* (González-Escalona, N et al., 2009). La RT-PCR no solo permite la detección potencial de células infecciosas vivas, sino que también es útil para detectar contaminación reciente, ya que el ARNm tiene una vida media más corta que el ADN. La detección rápida de la contaminación por *Salmonella* en productos frescos mediante RT-PCR en tiempo real (rt-RT-PCR) no solo ayudaría a controlar la diseminación del producto contaminado, sino que podría ayudar en el desarrollo de estrategias de control y como una herramienta para un APPCC eficaz (Maurer, J., 2006).

El estudio de Miller, D et al., (2011) investigó la sensibilidad de un método de RT-PCR en tiempo real para la detección de *Salmonella* en lechugas y tomates para comprobar si el método podía detectar el patógeno en un día. El método de RT-PCR desarrollado evaluó el uso de los cebadores *invA* que son específicos para especies de *Salmonella*. Se usaron niveles altos de inóculos (6-8 log UFC/ml) y bajos (1-5 log UFC/ml) para inocular lechugas y tomates.

Se usaron trozos de lechuga (25 g) y tomates (100 g) para inocularlos con 0,1 ml de inóculos altos (6-8 log) y bajos (1-5 log) de *Salmonella typhimurium*. Se dejaron controles de muestras lavadas pero sin inocular y cada experimento se replicó dos veces. Para recuperar el patógeno inoculado en los vegetales se usaron diferentes tampones:

-0,05 mol / L de glicina

-0,14 mol / L / tampón salino (pH 9,0)

-Tampón de glicina salina con 0,1 g/100 ml de Tween-20

-Tampón de glicinesalina con 0,05 g/100 ml de Tween-20 y 3 g/100 ml de extracto de carne.

Estas soluciones de lavado se utilizaron para comparar la eficiencia en la recuperación de células bacterianas del producto.

Adicionalmente se quiso comprobar la capacidad de este ensayo para detectar células estresadas, por lo que se sembraron *S. typhimurium* estresadas por frío a -20° C y 4° C y por calor a 45° C.

Los resultados de este estudio confirmaron que la recuperación máxima de *Salmonella typhimurium* de lechuga fue de 3,40 log UFC/25 g ($2,52 \times 10^3$) del inóculo inicial de 6 log UFC/25 g. De la superficie de los tomates, la recuperación fue de 2,51 log UFC/100 g del inóculo inicial de 7 log UFC/100 g. El tampón de glicina que contenía 0,05 g/100 ml de Tween-20 y extracto de carne de vacuno fue el tampón de recuperación más eficaz como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Recuperación de *Salmonella typhimurium* de lechuga sin enriquecimiento en agar XLT4 y concentración resultante de ARN extraído.

TAMPÓN	NIVEL DE INÓCULOS POR 25 G DE LECHUGA	CÉLULAS RECUPERADAS MEDIANTE PLACA DIRECTA EN XLT4 (UFC/25 G)	ARN EXTRAÍDO NG / ML
0,05 mol / L de glicina	10 ⁶	9.0 x 10 ¹	9.95
0,14 mol / L / tampón salino (pH 9,0)	10 ⁶	1.0 x 10 ¹	16.83
Tampón de glicina salina con 0,1 g/100 ml de Tween-20	10 ⁶	2.45 x 10 ²	17.35
Tampón de glicinesalina con 0,05 g/100 ml de Tween-20 y 3 g/100 ml de extracto de carne.	10 ⁶	2.52 x 10 ³	23.13

Fuente: Miller, D et al., 2011.

La extracción de ARN pareció mejorar obteniéndose una mayor recuperación bacteriana cuando se usó tampón que contenía Tween-20 y extracto de carne como se muestra en la Tabla 12, produciendo un máximo de 23 ng/ml de ARN sin enriquecimiento. Usando este ensayo de RT-PCR en tiempo real, se pudo detectar *Salmonella* a concentraciones de 6 log UFC/25 g de lechuga con altos inóculos de *Salmonella* sin pre-enriquecimiento. Para niveles bajos de inóculos, fue necesario un enriquecimiento de 6 h para la detección, que mejoró el límite de detección a 4 log UFC/25 g de lechuga. Para los tomates, se detectó *Salmonella* a 6-7 log UFC/100 g sin enriquecimiento. Para inóculos bajos, un pre-enriquecimiento de 6 h resultó en un límite de detección de 4 log UFC/100 g. Por lo tanto, se puede decir que el preenriquecimiento mejoró la detección de *Salmonella* mediante RT-PCR en tomates y lechugas con bajos niveles de contaminación del patógeno. Además, los resultados se pudieron obtener en un día, lo que ha sido una ventaja para este estudio.

Estos resultados se validaron aún más analizando los amplicones diana (fragmento de ARN) usando electroforesis en gel que reveló el producto diana de 347 pb, con una sensibilidad de detección similar a valores de 4 log UFC (Figuras 13 y 14). Los controles negativos no mostraron el producto diana de 347 pb en el gel (Figuras 11 y 12). Los controles negativos consistieron en agua, TSB, peptona o lechuga y tomates sin inocular.

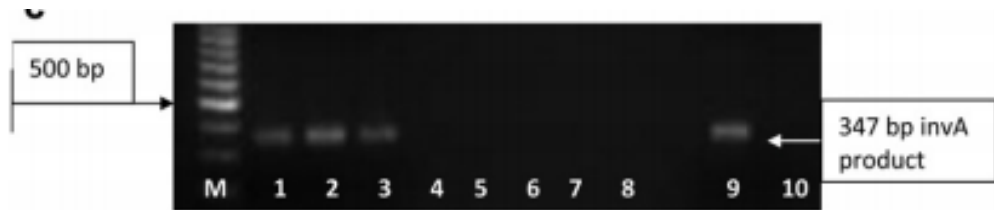


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de lechuga inoculada con *Salmonella typhimurium* sin enriquecimiento.

- Carril (M): marcador de escalera de 100 pb.
- Carril (1-8): trozos de 25g de lechugas inoculadas con 1-8 log UFC de *S. typhimurium*.
- Carril (9): control positivo de ARN extraído de *S. typhimurium*.
- Carril (10): control negativo (agua) con IAC a 154 pb.

Fuente: Miller, D et al., 2011.



Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de lechuga inoculada con *Salmonella typhimurium* después del enriquecimiento.

- Carril (M): marcador de escalera de 100 pb.
- Carril (1-5): trozos de lechuga inoculadas con 4-8 log UFC de *S. typhimurium*.
- Carril (6): control positivo de ARN extraído de *S. typhimurium*.
- Carril (7): control negativo (agua).

Fuente: Miller, D et al., 2011.

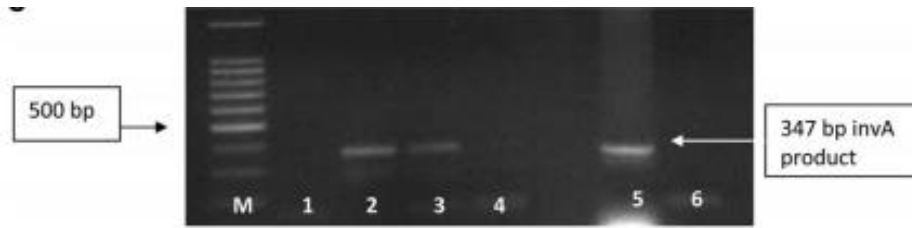


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347 pb) de tomates inoculados con *Salmonella typhimurium* sin enriquecimiento.

- Carril (M): marcador de escalera de 100 pb.
- Carril (2-4): porciones de 100 g de tomates inoculados con 6-8 log UFC de *S. typhimurium*.
- Carril (5): control positivo de ARN extraído de *S. typhimurium*.
- Carril (6): control negativo (agua) con IAC a 154 pb.

Fuente: Miller, D et al., 2011.



Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por rt-RT-PCR (347pb) de tomates inoculados con *Salmonella typhimurium* después del enriquecimiento durante 6 h.

- Carril (M): marcador de escalera de 100 pb.
- Carril (1-8): porciones de tomates inoculados con 1-8 log UFC de *S. typhimurium*.
- Carril (9): control positivo de ARN extraído de *S. typhimurium*.
- Carril (7): control negativo (agua).

Fuente: Miller, D et al., 2011.

Las células de *Salmonella* estresadas por calor (47° C) a niveles altos de inóculos de 7 log UFC/ml demostraron resultados de extracción similares a los de las células de *Salmonella* cultivadas de manera óptima con una recuperación de 4,2 log UFC/25 g de lechuga y 3,2 log UFC/100 g de tomate. Se obtuvieron resultados similares para las células de *Salmonella* estresadas por frío (-20° C y 4° C) con un inóculo inicial de 7 log UFC/ml con recuperaciones de 3.4 log UFC/25 g y 4.2 log UFC/25 g de lechuga. Para tomates inoculados con 7 log UFC/ml de células estresadas por frío, la recuperación fue de 2.8 log UFC y 3.8 log UFC/100 g. Los resultados de RT-PCR en tiempo real para *S. typhimurium* estresado por frío y calor (a niveles altos y bajos de inóculos) mostraron una detección similar a las de las células no estresadas, con límites de detección de 7 log UFC/25 g y 8 log UFC/100 g en lechugas y tomates sin enriquecer, respectivamente. El enriquecimiento previo de 6 h ayudó en la recuperación y detección de las células estresadas con inóculos bajos de una manera similar a las células no estresadas. Esto demuestra que se pueden obtener resultados de detección similares para *Salmonella* usando RT-PCR cuando los productos se mantienen a diferentes temperaturas durante el transporte y almacenamiento.

En conclusión, este método de RT-PCR en tiempo real detectó rápida y exitosamente *Salmonella* spp de lechugas y tomates en 24 h, de manera más rápida que los métodos tradicionales. Gracias a la investigación continua sobre la mejora de la velocidad de detección, la sensibilidad, la recuperación bacteriana, la calidad del ARN y los rendimientos de ARN, se puede llegar a ahorrar un capital significativo en las industrias alimentarias al prevenir brotes y retiradas de lotes.

Por último, se detalla un cuadro donde se resumen los estudios usados en esta revisión bibliográfica y sus diferencias en relación a las muestras y métodos de detección del patógeno *Salmonella*.

Tabla 13: Cuadro resumen de los artículos usados en la revisión bibliográfica.

Autor	Muestra alimentaria	Método de detección	Cepa de <i>Salmonella</i> estudiada
Chacón, L et al., (2010)	Lechuga variedad mantequilla	PCR Touchdown	<i>S. enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> (ATCC 13076)
Miller, D et al., (2011)	Lechuga y tomate	rt-RT-PCR	<i>S. typhimurium</i>

Fuente: elaboración propia con los datos de la revisión bibliográfica.

5. DISCUSIÓN

Tradicionalmente, el proceso de lavado era el más extendido en la industria de productos frescos para eliminar la tierra, y polvo de los alimentos, así como para mejorar la seguridad microbiológica de los productos frescos (Gil, M et al., 2009). Sin embargo, un proceso de lavado simple no puede inactivar los patógenos internalizados en los vegetales (Huang, R et al., 2018). Además, este agua de lavado también podría servir como fuente de contaminación para los productos frescos. Por lo tanto, hoy día se usan innumerables productos desinfectantes a base de químicos para inactivar los patógenos en los productos frescos y prevenir la contaminación cruzada. Pese a esto, son muchos los autores que han estudiado la eficacia de cada desinfectante y han reportado numerosas fluctuaciones en sus experimentos, relacionando cada una con diferentes parámetros fisicoquímicos y organolépticos del alimento estudiado.

Según un estudio de Zheng, J et al., (2013); se ha demostrado la persistencia de *Salmonella* en productos frescos como el tomate y se vio como la capacidad de *Salmonella* para persistir en estas plantas variaba entre los sitios donde se inoculaba. Según este estudio, la concentración de *Salmonella* se duplicó en la etapa de flor del tomate, mientras que en otras partes como las valvas disminuyeron con el paso de los días.

Se estudió la persistencia de *Salmonella* en el propio fruto y se vio como la mitad de los tomates usados en el experimento, contenían el patógeno solo en las superficies de la fruta, ya que *Salmonella* se detectó al analizar una muestra del agua de lavado. Sin embargo, también se encontró que algunos tomates podían tener *Salmonella* tanto en la superficie como internamente (Zheng, J et al., 2013).

Este estudio muestra como el método de cultivo y la serovariedad son dos factores clave que afectan la internalización de *Salmonella*, además del tiempo que es muy importante para dicha internalización. De hecho, en este estudio se vio como 3 días después de la inoculación se produjo una recuperación mayor de *Salmonella* colonizadora del interior. Además, en este estudio, se vio como en la etapa de trasplante, una planta de tomate es más susceptible a la internalización, lo que provoca un mayor riesgo de contaminación por *Salmonella* en los tomates recogidos antes de la cosecha.

Tras la revisión de este estudio podemos confirmar como el sitio de inoculación afecta mucho a la hora de la internalización de *Salmonella* en las hojas de los vegetales tales como lechuga, puesto que no son todas uniformes, algunas muestras provienen de la zona más herbácea y otras de la parte más leñosa, por lo tanto, cuentan con diferente textura y dureza. Además, al igual que en el estudio de Jie Zheng et al., (2013) en vegetales de hoja también puede encontrarse *Salmonella* en la superficie o colonizando el interior celular entre recovecos y estomas, esto nos da una explicación de por qué la recuperación con cualquier tampón resulta tan variable y azarosa. Además, coincide con otros estudios en el factor “tiempo”, puesto que en diferentes ensayos se alude al desarrollo de *Salmonella* tras el transcurso de los días. Por último, cabe destacar que el grado de madurez de los vegetales también puede afectar a la internalización del patógeno, puesto que, en el estudio de Zheng, J et al., (2013) se comprobó como los tomates precosecha eran más susceptibles de ser contaminados, al igual que ocurriría con vegetales de hoja.

Otro estudio muy interesante fue el realizado por Bencardino, D et al., (2018). Ellos también afirmaron como la eficiencia de lavado y desinfección puede verse influida por múltiples factores como la superficie del producto, la calidad del agua, el desinfectante utilizado y el tiempo de contacto. Así, la efectividad del lavado variaba según el método y el tiempo de inmersión. Estos autores revelaron como el lavado basado solo en el agua del grifo no separaba las bacterias de las hojas de lechuga, es decir, la reducción decimal no era considerable. Este resultado es coincidente con lo

reportado en nuestra revisión bibliográfica. Según Bencardino, D et al., (2018), la diferencia en la reducción bacteriana era representado por el desinfectante que se usase; en concordancia con nuestra revisión, dónde afirmamos que el tipo de desinfectante a usar es muy influyente para la reducción de la carga bacteriana.

Además, en el estudio de Bencardino, D et al., (2018) se puso en evidencia algo que se llevaba estudiando hace tiempo. Los vegetales IV Gama se exponen como el producto más contaminado. Por lo tanto, tal y como hemos afirmado en anteriores ocasiones, la manipulación en el procesado es una importante fuente adicional de contaminación microbiana. Es por esto que, la mejora de las Buenas Prácticas Agrícolas y de Fabricación (BPA) por parte de los productores es necesaria para garantizar la inocuidad de los alimentos. Tal y como hemos ido descubriendo a lo largo de la revisión bibliográfica, el tiempo de almacenamiento de los vegetales es muy importante e influyente ya que su consumo durante el primer período de vida útil y después del lavado con desinfectantes minimiza el riesgo para la salud humana, afirmado también por el presente estudio discutido.

La detección de *Salmonella* spp en alimentos, especialmente en productos con poca preparación para el consumo representa un gran reto, dadas la capacidad de adaptación del microorganismo y la importancia de obtener resultados en poco tiempo que permitan tomar decisiones rápidas frente a la expedición de lotes de alimentos en las industrias alimentarias. Las técnicas convencionales suponen procedimientos prolongados y tediosos basados en enriquecimiento, aislamiento e identificación del patógeno. Además, pueden generar resultados erróneos en muestras con una alta carga de microorganismos que puede enmascarar la presencia de *Salmonella* spp.

Gracias a los avances en biología molecular se ha podido desarrollar técnicas mejoras para la detección de patógenos asociados a alimentos; sin embargo, estas metodologías se han visto limitadas por varios factores que han hecho difícil su estandarización y uso de forma rutinaria. El principal obstáculo en la aplicación de técnicas PCR para la detección de microorganismos presentes en los alimentos es la presencia de compuestos que pueden actuar como inhibidores de la reacción de amplificación y arrojar resultados erróneos (Delbeke, S et al., 2015).

Un paso crítico para detectar patógenos en productos frescos es la extracción de las células en un tampón. Se ha demostrado en numerosos estudios que las células bacterianas son difíciles de eliminar de la superficie de los productos frescos. Investigaciones anteriores han sugerido que la dificultad de extracción se debe a la unión de las células bacterianas a la superficie del producto debido a la textura rugosa o naturaleza hidrófoba de la superficie (Iturriaga, M et al., 2003). Shi, X et al (2007) descubrieron que dependiendo de la cepa de *Salmonella* la adhesión a las superficies era distinta.

Otro factor potencial que puede afectar a la recuperación y detección es la viabilidad celular. El uso de métodos de enriquecimiento y pre-enriquecimiento permite una mayor recuperación de las poblaciones bacterianas, pero estos métodos pueden llevar varios días. En el estudio de Yuk, H et al., (2006). utilizaron un paso de preenriquecimiento de 10 h para obtener un límite de detección de 1 UFC en muestras de leche y carne para *Staphylococcus aureus*. Se realizó una PCR en tiempo real donde se mostró la detección de serovares de *Salmonella* en superficies de tomate con un nivel de detección bajo ($4.6 \cdot 10^1$ UFC por tomate). Investigaciones posteriores de estos autores mostraron una mejor detección de 10 UFC por tomate mediante el método inmunocaptura de flujo continuo seguida por PCR (FTI-PCR) en 8 de cada 10 muestras de tomate (Yuk, H et al., 2007). En el estudio de Guo, X et al., (2000) se usaron cebadores h1A, en un ensayo tradicional basado en PCR, donde se detectó *S. enterica Montevideo* a nivel de 10^1 UFC/g de tomates inoculados después de enriquecimiento durante 6 h a 37° C.

En los ensayos analizados en la presente revisión se obtuvieron resultados de detección similares para las células de *Salmonella* estresadas y para las células cultivadas de manera óptima, es decir, se puede concluir que la detección de *Salmonella* es posible a partir de productos expuestos a diferentes temperaturas.

Otro de los puntos a favor de los métodos basados en ácidos nucleicos es la detección del gen *invA*. Un estudio de González-Escalona et al., (2009), utilizó cebadores del gen *invA* para realizar una RT-PCR basado en TaqMan (sondas para aumentar la especificidad de la PCR cuantitativa). Este método arrojó límites de detección muy precisos (5 UFC/25 g) para *S. saintpaul* y *S. newport* a partir de espinacas, tomates y pimientos jalapeños; eso sí, se utilizó un preenriquecimiento más prolongado de 24 h. La diferencia con el estudio de Miller et al., (2010) fue en el uso de las sondas; ya que se usó un tinte fluorescente SYBR green I, en lugar de TaqMan. Este tinte era menos costoso que el uso de sondas TaqMan (Miller et al., 2010). Y se logró un límite de detección para *S. typhimurium* de 4 log UFC/25 g tanto para lechuga como para tomates (100 g) después de un breve preenriquecimiento de solo 6 h con un tiempo total de ensayo de 10-12h. Es decir, gracias a la detección del gen *invA* con RT-PCR se pudo detectar *Salmonella* a niveles muy bajos y dependiendo de la sonda que se usara, se conseguía límites de detección muy buenos.

6. CONCLUSIÓN

Como consecuencia de la propagación mundial de toxiinfecciones alimentarias provocadas por patógenos, aumenta la necesidad de realizar estudios de detección y reducción de esta enfermedad, con el fin de conseguir la seguridad e inocuidad alimentaria. *Salmonella* se ha identificado como uno de los patógenos más problemáticos del sector agroalimentario, especialmente en las empresas de alimentos vegetales. Para facilitar la prevención y detección, son muchos los estudios desarrollados con el fin de aislar al patógeno y prevenir su desarrollo en los vegetales de hoja.

Está ampliamente extendido el uso de desinfectantes químicos para reducir la carga microbiana en vegetales como lechuga, espinaca, col, apio, etc. La evaluación de las propiedades bactericidas de los diferentes desinfectantes son muy variadas ya que depende del propio producto, de la muestra a tratar, y demás factores externos que afectan a su desinfección. Pese a ello, los resultados de los estudios que se realizan al respecto son muy alentadores ya que indican una buena capacidad desinfectante y su uso puede ser muy útil para las empresas ya que no generan toxicidad al humano. Últimamente, el uso de bacteriófagos como sustituto de los productos químicos está en auge. Este método antimicrobiano arroja buenos resultados en la eliminación de *Salmonella* en vegetales de hoja. Son múltiples las ventajas de utilizar bacteriófagos como agentes antimicrobianos en los alimentos: alta especificidad, ausencia de efectos secundarios y no provoca toxicidad en humanos. Además, los bacteriófagos son insípidos y su adición no altera las características o atributos sensoriales de los alimentos.

Por otro lado, la tecnología de detección de patógenos moderna es más sensible, selectiva y más rápida que la tecnología anterior. Análisis basados en ADN, como la PCR son una alternativa viable. Sin embargo, estas técnicas todavía tienen muchas interferencias, debido a los reactivos usados o la capacidad de recuperación del patógeno presente en la muestra a analizar. Debido a estas limitaciones, es necesario

un enriquecimiento para superar la interferencia de la matriz alimentaria. Por lo tanto, es necesario un método que reduzca el tiempo requerido para las técnicas de diagnóstico y a su vez, consiga detectar niveles muy bajos de *Salmonella* en alimentos.

Varios de los métodos discutidos aquí se han utilizado individualmente o en combinación con otros métodos para aislar y concentrar rápidamente bacterias en muestras de alimentos en un tiempo mucho más corto que los tradicionales. Por todo ello, el desarrollo de métodos rápidos, sensibles y específicos para la detección y eliminación de *Salmonella* asociada a los alimentos sigue siendo un desafío para garantizar la Seguridad Alimentaria.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acero, D., Rueda, R., & Medina, J. (2011). Transmisión de *Salmonella entérica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(2), 167-177.
- Aguerri-Esparza, I. (2014). Análisis de la situación actual del consumo de productos de IV Gama en Pamplona. Tesis para optar al título de ingeniero. Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos. Universidad pública de Navarra. Navarra.
- Alakomi, H., & Saarela, M. (2009). *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1, 142-152.
- Alegre, I., Abadias, M., Colás, P., Collazo, C., & Viñas, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Arbor*, 196 (795), 543-571.
- Barragán, P. (2011). Potencial saludable de sustancias bioactivas de algunas verduras, Memoria para optar al título de Nutricionista Dietista, Facultad de Ciencias, Universidad Javerina.
- Barrantes, K., & Achí, R. (2011). Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 31-36.
- Bedregal, P., Torres, B., Olivera, P., Ubillus, M., & Ganoza, L. (2001). Determination of trace elements and heavy metals in agricultural products cultivated at the river Rímac in the city of Lima. *Peruvian Institute of Nuclear Energy (IPEN) and Nutritional Research Institute (IIN)*.
- Bencardino. D; Vitali. L; & Petrelli. D. (2018). Microbiological evaluation of ready-to-eat iceberg lettuce during shelf-life and effectiveness of household washing methods. *Italian Journal of Food Safety*, 7, 13-69.

- Beuchat, L., Adler, B., & Lang, M. (2004). Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67, 1238-1242.
- Bhagat, A., Mahmoud, B., & Linton, R. (2010). Inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inoculated on hydroponic tomatoes using chlorine dioxide gas. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 677–685.
- Bhunia, A. (2008). *Salmonella enterica*. En *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. Ed.: Elsevier. New York, USA. p. 201-215.
- Buchholz, A., & Matthews, K. (2010). Reduction of *Salmonella* on alfalfa seeds using peroxyacetic acid and a commercial seed washer is as effective as treatment with 20,000 ppm of Ca (ClO)₂. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 462–468.
- Burnett, S., Chen, J., & Beuchat, L. (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Application Environmental Microbiology* 66, 4679-4687.
- Caballero, A. (2008). Temas de higiene de los alimentos. Ciencias Médicas (Ed.), 379. La Habana, Cuba.
- CAC (Codex Alimentarius Commission) (2005). Código de prácticas de higiene para la carne (CAC/RCP 58/2005). Normas Internacionales de los alimentos (OMS–FAO).

- Camponovo, M. (2012). Productos vegetales, seguridad alimentaria y salud. Riesgos microbianos en la producción de alimentos frescos en áreas urbanas y periurbanas de América Latina, 105-123.
- Cantarero, J. (2020) (En prensa). La importancia de una alimentación segura y saludable para la calidad de vida y la salud de las personas. *Alimentación*.
- Carrasco, E., Morales, A., & García, R., (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45, 545-556.
- Chacón, L., Barrantes, K., García, C., & Achí, M. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de *Salmonella* spp en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 30 (1), 18-23.
- Costa, S., Montenegro, M., Arregui, T., Pinto, M., Nazareno, M., & Mishima, B. (2003). Caracterización de acelga fresca de Santiago del Estero (Argentina). Comparación del contenido de nutrientes en hoja y tallo. Evaluación de los carotenoides presentes. *Food Science and Technology*, 23(1), 33-37.
- Creus, E. (2005). *Salmonella* en la Alimentación animal (I): Contaminación en material primas y piensos. *Albéitar*, 85, 115-126.
- Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology* 103, 207-227.
- Delbeke, S., Ceuppens, S., Holvoet, K., Samuels, E., Sampers, I. & Uyttendaele, M. (2015). Múltiples métodos de cultivo y PCR en tiempo real para la detección de *Escherichia coli* y *Salmonella Thompson* productoras de toxina Shiga en fresas, una mezcla de lechuga y albahaca. *Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos*, 193, 1-7.

- EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 10, 2594.
- Erickson. M., Liao. J., Payton. A., Cook. P., DenBakker. H., Bautista. J., & Díaz. J. (2019). Pre-harvest internalization and Surface survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 sprayed onto different lettuce cultivars under field and growth chamber conditions. *International journal of food microbiology*. 291, 197-204.
- FAO (2009). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2009.
- FAO (2011). Seguridad Alimentaria Nutricional, Conceptos Básicos. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) en Centroamérica. 3ra Edición.
- FAO. (2015). Food security and nutrition in Small Island Developing States. Roma.
- FAO. (2015b). The impact of natural hazards and disasters on agriculture and food and nutrition security: a call for action to build resilient livelihoods. Roma.
- Fong, K., LaBossiere, B., Switt, A., Delaquis, P., Goodridge, L., Levesque, R., Danyluk, M., & Wang, S., (2017). Characterization of four novel bacteriophages isolated from British Columbia for control of non-typhoidal *Salmonella* in vitro and on sprouting alfalfa seeds. *Front. Microbiology* 8, 1–14.
- Forshell, L., & Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Review. *Science and Technology* 25, 541–554.
- García, J., Medina, L., Mercado, J., & Báez, R. (2017). Evaluación de desinfectantes para el control de microorganismos en frutas y verduras. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 18(1), 9-22.

- Gil, M., Allende, A., & Selma, V. (2005). "Nuevas Tendencias de Procesado y Conservación de Alimentos Vegetales de IV Gama. Agrocsic": http://digital.csic.es/bitstream/10261/5778/1/CEBAS_AGROCSIC.pdf (Fecha de acceso: 29/11/2020)
- Gil, M., Selma, M., López-Gálvez, F., & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal Food Microbiology* 134, 37-45.
- Giménez, V., Padilla, N., Arroyo, A., Godoy, Y., Terán, Y., & Jiménez, D. (2020). Evaluación de la calidad microbiológica y efecto del lavado en lechuga. *Agroindustria, Sociedad Y Ambiente*, 2(15), 33-54.
- Gómez, L., Jaimes, S., & Montes, J. (2012). Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos frente a *E. coli* y *Salmonella* spp, en la desinfección de lechuga fresca. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2), 122-131.
- González, J; Pereira, N; Soto, Z; Hernández, E., & Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte* 30 (1), 73-94.
- González-Escalona, N., Hammack, T., Russell, M., Jacobson, A., De Jesús, A., Brown, E., et al. (2009). Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse-transcriptase real-time PCR targeting invA mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3714-3720.
- Grimont, P., & Weill, F. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur. 1-166.
- Guo, X., Chen, J., Beuchat, L., & Brackett, R. (2000). PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from hila. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5248-5252.
- Hendriksen, R., Vieira, A., Karlsmose, S., Wong, D., Jensen, A., Wegener, H., & Aarestrup, F. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 887–900.

- Huang, R. & Chen, H. (2018). Evaluación de la inactivación de *Salmonella* en tiras de lechuga iceberg con proceso de lavado en combinación con luz pulsada, ultrasonidos y cloro. *Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos*, 285, 144-151.
- Ibarra, L., Alvarado, S., Rodríguez, M., Martínez, N., & Castillo, A. (2004). Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection* 67, 1353-1358
- Increase. (2018). “Informe de tendencias y nuevos productos transformados vegetales”: <http://www.increa.es/wp-content/uploads/2018/03/Informe-de-tendencias-y-nuevos-productos-transformados.pdf> (Fecha de acceso: 29/11/2020).
- Iturriaga, M., Escartin, E., Beuchat, L., & Martinez-Peniche, R. (2003). Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature, and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. *Journal of Food Protection*, 66, 1756-1761.
- Kumar, R., Bhima, B., Kumar, P., & Ghosh, S. (2020). Biocontrol of *Salmonella* spp in carrot salad and raw chicken skin using lytic bacteriophages, *LWT*, 122.
- Lee, K., Runyon, M., Herrman, T., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276.
- Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, P., Piventeau, P., & Guzzo, J., (2005). Long term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste compost. *Journal Application Microbiology*, 71(10), 5779-5786.
- Lin, C., Moon, S., Doyle, M., & McWatters, K. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *Journal of Food Protection*, 65, 1215–1220.

- Luigi, T., Rojas, L., & Valbuena, O. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp usando el gen invA. *Salus*, 19(3), 41-46.
- Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F., Kirk, M., O'Brien, S., Jones, T., Fazil, A., & Hoekstra, R. (2010). The global burden of non typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50, 882–889.
- Martín, P., Gálvez, M., & Lorenzo, T. (2008) Control sanitario de frutas y vegetales. *Ángel E. Caballero Torres*, 296.
- Maurer, J. (2006). The mythology of PCR: a warning to the wise. In J. Maurer (Ed.), PCR methods in foods. New York, NY, 27-40.
- Miller, N., Davidson, P., & D'Souza, D. (2011). Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella* Typhimurium detection from lettuce and tomatoes. *Food Science and Technology*, 44 (4), 1088-1097.
- Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (2019). Informe del consumo alimentario en España 2019.
- Min, S., Roh, S., Niemira, B., Sites, J., Boyd, G., & Lacombe, A. (2016). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma inhibits *Escherichia Coli* O154: H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Tulane virus in Romaine lettuce. *International Journal of food microbiology*. 237, 114-120.
- Moye, Z., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses* 10, 1–22.
- Moyne, A., Sudarshana, M., Blessington, T., Koike, S., Cahn, M., & Harris, L. (2011). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in field-inoculated lettuce. *Food Microbiology* 28, 1417-1425.
- Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L., Vestby, L., & langryd, S. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International* 45, 532-544.

- Neal, J., Márquez, M., Cabrera, E., Lisa, L., O'Bryan, C., Crandall, P., Ricke, S., & Castillo, A. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leave. *Food Research International*, 45 (2), 1123-1128.
- Niemira, B., (2007). Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*, 70, 2526–2532.
- Olsen, A., & Hammark, T. (2000) Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica*; and the dumpfly, *Hidrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera muscidae) at caged layer houses. *Journal Food Protection*; 70, 958-960.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2015). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC).
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.
- Parzanese, M. (2012). Vegetales mínimamente procesados. *Alimentos Argentinos*, 55, 31-39.
- Peña, Y., Hernández, M., & Castillo, V. (2014). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama. Cuba y Salud*, 6(1), 30-38.
- Posada, G. (2013). Estudio y modelización del efecto de procesos de descontaminación y desinfección sobre microorganismos patógenos en productos vegetales. Tesis para optar al título de bromatología de los alimentos. Universidad de Córdoba, Córdoba
- Posada, G., Pérez, F., López, F., Allende, A., Selma, M., Gil, M., & Zurera, G. (2013). Modelización del crecimiento de *Escherichia coli* O157: H7 en lechuga recién cortada sometida a condiciones comerciales de proceso: lavado con cloro y envasado en atmósfera modificada. *Microbiología alimentaria*, 33 (2), 131-138.

- Posada, G., & Carpio, E., (2019). Estudio de la capacidad de supervivencia de *Salmonella* en lechuga iceberg IV Gama, tras someterse a diferentes procesos de desinfección. Memoria para optar al título de graduado en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad de Córdoba. Córdoba.
- Prieto, M., Mouwen, J., Puente, S., & Sánchez, A. (2008). Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. *Interciencia*, 33(4), 258-264.
- Restrepo, L., Rodríguez, H., & Deossa, G. (2013). Consumo de vegetales y factores relacionados en estudiantes universitarios de la ciudad de Medellín, Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(2), 171-183.
- Rincón, G., Ginestre, M., Romero, S., Castellano, M., & Ávila, Y. (2010). Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Kasmera*, 38(2), 97-105.
- Rodríguez, D., Torres, F., Martínez, M., Gutiérrez, E., López, M., & Carrascal, A. (2008). Determinación de *Salmonella typhimurium* en compost inoculado artificialmente empleado en un cultivo de lechuga. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 61-72.
- Ronner, A. y Wong, C. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Bunan rubber. *Food Protection* 56, 750-758.
- Sakugawa, N., Bezerra, V., Castro, S., Lima, E., Fireman, R., & de Lima, J. (2007). *Salmonella* spp, important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. *Ciencia & Saude Coletiva*, 13(5), 1675-1683.
- Salyers, A., & Whitt, D. (2002) Bacterial Patogénesis: a molecular approach. ASM press, Washinton. second edition; 681-695.
- Selma, M., Ibañez, A., Cantwell, M., & Suslow, T. (2008). Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiology*, 25, 558–565.

- Sharma, M., Patel, J., Conway, W., Ferguson, S., & Sulakvelidze, A. (2009). Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *Journal Food Protection* 72, 1481–1485.
- Shi, X., Namvar, A., Kostrzynska, M., Hora, R., & Warriner, K. (2007). Persistence and growth of different *Salmonella* serovars on pre- and postharvest tomatoes. *Journal of Food Protection*, 70, 2725-2731.
- Sillankorva, S., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *Internet Journal Microbiology*, 1–13
- Silveira, J., Hessel, C., & Tonso, E. (2017). Inactivation of *Salmonella enteritidis* on lettuces used by minimally processed vegetable industries. *The journal of infection in developing countries*. 11, 34-41.
- Soria, M. (2012). Presencia de *Salmonella* y características físicas de huevos destinados a consumo humano. Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Spricigo, D., & Llagostera, M. (2012). La Desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Tesis doctoral para la obtención del título Doctor en microbiología, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Spricigo, D., Bardina, C., Cortés, P., & Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Food Microbiology* 165, 169–174.
- Suslow, T., Wu, J., Fett, W., & Harris, L. (2002). Detection and elimination of *Salmonella* Mbandaka from naturally contaminated alfalfa seed by treatment with heat or calcium hypochlorite. *Journal of Food Protection*, 65, 452–458.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.

- Tauffer, J., Ferreira, C., Tezotto, J., Dallocca, B., Lucazechi, G., & Kluge, R. (2018). Implementación de prácticas para la reducción del riesgo microbiológico en el proceso de elaboración de hortalizas de IV Gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(1), 21-29.
- Terragno, R., Caffer, M., & Binsztein, N. (2008). Aislamiento y caracterización de *Salmonella* sp. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv. Buenos Aires, Argentina. 9-56.
- Todd, E., Greig, J., Bartleson, C., & Michaels, B. (2009). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection* 72, 202-219.
- Tola, J. (2016). Aplicación de Ácidos Orgánicos en lechugas frescas, como desinfectantes de patógenos. Bachelor's thesis, Universidad del Azuay.
- Trinetta, V., Morgan, M., & Linton, R. (2010). Use of high-concentration-short-time chlorine dioxide gas treatments for the inactivation of *Salmonella enterica* inoculated onto Roma tomatoes. *Food Microbiology*, 27, 1009–1015
- Tunes, M. & Vigo, G. (2007). *Salmonella*. En: Microbiología Veterinaria. Ed: Inter Médica. Buenos Aires, Argentina. 210-214
- United States department of agriculture (2008). Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products, 1998-2008.
- Uribe, C., & Suárez, M. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica*, 37(2), 151-158.
- Urrutia, M., Guerrero, M., Luque, A., & Aguayo, F. (2018). Seguridad, fiabilidad y calidad del producto, procesos e instalaciones de la industria alimentaria. In *XXII Congreso Internacional de Dirección e Ingeniería de Proyectos*, 849-861. Asociación Española de Dirección e Ingeniería de Proyectos.

- Vogel, B., Hansen, L., Mordhorst, H., & Gram, L. (2010). The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride 193 and organic material. *International Journal of Food Microbiology* 140, 192–200.
- Wong, P., & Kitts, D. (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry* 97, 505–515.
- Wong, C., Delaquis, P., Goodridge, L., Lévesque, R, Fong, K. & Wang, S. (2020). Inactivación de *Salmonella enterica* en melón y lechuga poscosecha mediante un cóctel de bacteriófagos líticos. *Investigación actual en ciencia de los alimentos*, 2, 25-32.
- Yousef, A. & Carlstrom, C. (2006). *Salmonella*. En: Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 181-222.
- Yuk, H., Warren, B., & Schneider, K. (2006). Preliminary evaluation of flowthrough immunocapture followed by real-time PCR for the detection of *Salmonella* serovars on tomato surfaces within 8 hours. *Journal of Food Protection*, 69, 2253-2257.
- Zhang, X., Dong Niu, Y., Nan, Y., Stanford, K., Holley, R., Mcallister, T., & Narváez, C. (2019). SalmoFresh™ effectiveness in controlling *Salmonella* on Romaine lettuce, mung bean sprouts and seeds. *Food Microbiology* 305, 1–10.
- Zheng, J; Allard. S; Millner. P; Arce. G; Blodgett. R; & Brown, E. (2013). Colonization and Internalization of *Salmonella enterica* in Tomato Plants. *American society for microbiology*. 79, 2494–2502.
- Zúñiga, I., & Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95-104.