



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**INCIDENCIA DE *Salmonella enterica* Y VIRUS DE HEPATITIS A Y  
EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES CONTRA  
*Salmonella enterica* EN JITOMATE *CHERRY***

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA  
I. I. A. MARLA GOETHE LEAL CERVANTES

DIRIGIDA POR  
DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

CODIRIGIDA POR  
DRA. ROCÍO MORALES RAYAS

C. U., Santiago de Querétaro, Querétaro, diciembre de 2017



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

"INCIDENCIA DE *Salmonella enterica* Y VIRUS DE HEPATITIS A Y  
EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES CONTRA *Salmonella enterica* EN JITOMATE  
CHERRY"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado  
**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Presenta:

I. I. A. MARLA GOETHE LEAL CERVANTES

Dirigida por:

DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

Codirigida por:


DRA. ROCÍO MORALES RAYAS

SINODALES


Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Director

  
Firma

Dra. Rocío Morales Rayas  
Co-Director

  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Secretario


  
Firma

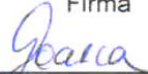
Dr. Ramón A. Martínez Peniche  
Vocal

  
Firma

Dra. Lourdes Soto Muñoz  
Suplente

  
Firma

  
MSP Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre, 2017

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar la incidencia de *Salmonella enterica* y Virus de Hepatitis A e indicadores de calidad sanitaria de jitomate *cherry* obtenido de dos tipos de establecimiento de comercialización al menudeo y evaluar desinfectantes para la inactivación de *S. enterica* inmersa o no en biopelícula inoculada en el fruto. Se tomaron 333 muestras de jitomate *cherry* provenientes de supermercados y mercados, se cuantificó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras (H&L), organismos coliformes totales (OCT) y *Escherichia coli*, y se determinó la presencia de *S. enterica*. Del total de muestras, se tomaron 112 muestras para la detección de virus de hepatitis A (VHA). Se inocularon jitomates con *S. enterica* (8 log UFC/fruto) y se desinfectaron por 5 min con hipoclorito de sodio (200 ppm), ácido peracético (80 ppm) y un producto a base de semillas de cítricos (0.2 %). Se indujo la producción de biopelículas de *S. enterica*, inoculando el jitomate (5 log UFC/fruto) y almacenándolo a 25 °C/72 h; posteriormente, los frutos se desinfectaron como se describió previamente. Se realizaron los recuentos en agar soya tripticaseína adicionado con rifampicina (200 ppm). La mediana del contenido de BMA osciló entre 4.4 y 2.4 log UFC/g en jitomates obtenidos de supermercados y entre 4.8 y 2.9 log UFC/g en los mercados. En el caso de H&L, los jitomates de los supermercados mostraron medianas de 4.1 a 2.0 log UFC/g, y en los de los mercados de 4.5 a 1.5 log UFC/g. Independientemente del sitio de muestreo, los valores de las medianas para OCT fueron bajos (de 1.0 a 1.8 log UFC/g). *E. coli* se detectó en 5.4 % de las muestras de supermercados y en 20.1 % de las muestras de mercados, siendo en ambos sitios el contenido bajo (0.3 a 5.8 NMP/g). La incidencia de *S. enterica* en supermercados y mercados locales fue de 14.1 y 7.8 %, respectivamente. El VHA se detectó en 5.4 % de las muestras obtenidas de supermercados y no se reveló en las muestras de mercados. La aplicación de hipoclorito de sodio, ácido peracético y el germicida a base de extractos de cítricos redujo 5.4, 4.7 y 2.5 log UFC/g, respectivamente la población de *S. enterica* adherida al fruto; el efecto disminuyó cuando el patógeno estaba inmerso en la biopelícula (3.8, 2.8 y 3.2 log UFC/fruto, respectivamente). El estudio expone el riesgo asociado al consumo del fruto y la necesidad de implementar controles preventivos en su producción y comercialización, y demuestra la baja efectividad de la desinfección química.

**(Palabras clave:** Jitomate *cherry*, *Salmonella*, Virus de hepatitis A, desinfección)

## SUMMARY

The aim was to research the incidence of *Salmonella enterica* and Hepatitis A virus (HAV) and microbiological profile of Cherry tomato from two retail points of sale and to evaluate disinfectants for the inactivation of *S. enterica* immersed or not in biofilm inoculated in the fruit. A total of 333 samples of cherry tomatoes were obtained from supermarkets and markets, the content of aerobic plate counts (APC), molds and yeasts (M&Y), coliforms and *Escherichia coli* were enumerated and the incidence of *S. enterica*. Samples (112) were taken for the detection of HAV. Tomatoes were inoculated with *S. enterica* (8 log<sub>10</sub> CFU/fruit) and disinfected for 5 min with sodium hypochlorite (200 ppm), peracetic acid (80 ppm) and a citrus seed product (0.2%). The biofilm production of *S. enterica* was induced by inoculating the tomato (5 log<sub>10</sub> CFU/fruit) and storing it at 25°C/72 h; subsequently, the fruits were disinfected as previously described. Counts were made on tripticasein soy agar added with rifampicin (200 ppm). The median APC content ranged between 4.4 and 2.4 log<sub>10</sub> CFU/g in tomatoes obtained from supermarkets and between 4.8 and 2.9 log CFU/g in the markets. In the case of M&Y, supermarket tomatoes showed medians of 4.1 to 2.0 log<sub>10</sub> CFU/g and in the markets of 4.5 to 1.5 log<sub>10</sub> CFU/g. Independently of the sampling site, the values of the medians for coliforms were low (from 1.0 to 1.8 log<sub>10</sub> CFU/g). *E. coli* was detected in 5.4% of the supermarket samples and in 20.1% of market samples, with both sites having a low content (0.3 to 5.8 NMP/g). The incidence of *S. enterica* in supermarkets and local markets was 14.1 and 7.8%, respectively. HAV was detected in 5.4% of samples obtained from supermarkets and was not found in market samples. The application of sodium hypochlorite, peracetic acid and citrus seed product reduced 5.4, 4.7 and 2.5 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively the *S. enterica* population adhered to the fruit; the effect decreased when the pathogen was immersed in the biofilm (3.8, 2.8 and 3.2 log<sub>10</sub> CFU/fruit, respectively). The study exposes the risk associated with fruit consumption and the need to implement preventive controls in its production and commercialization, and demonstrates the low effectiveness of chemical disinfection.

**(Keywords:** Cherry tomato, *Salmonella*, Hepatitis A virus, disinfection)

Que las cosas no salgan como esperamos, muchas veces es lo  
mejor que nos puede pasar...

Dedico este trabajo a mis padres, mi inspiración, mi ejemplo a seguir.

A mis padres...

A mis hermanas...

A mi familia...

Por todo su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la  
realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme las puertas y dejarme formar parte de esta gran institución, especialmente al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC).

A los doctores Ramón Martínez Peniche, Sofía Arvizu Medrano y Lourdes Soto Muñoz por todas sus aportaciones y sus consejos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Carlos, Martha, Eduardo, Beatriz, Dulce, las chicas de servicio que me ayudaron Camila y Yuritzi, por el apoyo incondicional, por sus “regañños”, sus observaciones, por ser muchas veces mi paño de lágrimas.

A mi soporte y mi fortaleza durante toda la maestría, a ti Iván García Monroy; por aguantar mis desveladas, mis cambios de humor, mi estrés... Por tu amor absoluto.

A mi familia, porque sin ella no estaría donde estoy ahora, a mis dos ángeles que tengo en el cielo cuidándome (mi padre adorado y mi abuelo consentido).

A la doctora Rocío Morales Rayas por la dedicación y la paciencia para enseñarnos acerca de virus en alimentos.

Y al final, pero considero que más importante, a mi directora de tesis, porque cuando entré a la maestría venía destrozada y gracias a su apoyo fui levantándome de las cenizas, convirtiéndome en alguien más fuerte y decida; gracias por ser mi maestra de inocuidad y de la vida doctora Montserrat Hernández Iturriaga.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	iii
---------------	-----

SUMMARY.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1. Frutas y hortalizas en la alimentación humana.....	2
2.1.1. Jitomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ).....	3
2.1.1.1. Jitomate <i>cherry</i> ( <i>L. esculentum</i> var. <i>Cerasiforme</i> ).....	4
2.2. Riesgos microbianos asociados al consumo de frutas y hortalizas .....	4
2.2.1. Fuentes de contaminación.....	6
2.2.2. Brotes de enfermedad .....	7
2.2.3. Patógenos de importancia en frutas y hortalizas .....	9
2.2.3.1. <i>Salmonella enterica</i> .....	9
2.2.3.2. Virus de la hepatitis A (VHA) .....	10
2.3. Estrategias de control de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas .....	12
2.3.1. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).....	12
2.3.2. Métodos de reducción de carga microbiana .....	14
2.3.2.1. Agentes desinfectantes.....	14
2.4. Biopelículas bacterianas .....	16
2.4.1. Etapas de formación de biopelícula de <i>Salmonella</i> .....	17
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo general .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20

4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
4.1.	Equipos, materiales y reactivos .....	21
4.1.1.	Equipos.....	21
4.1.2.	Materiales .....	21
4.1.3.	Medios de cultivo .....	21
4.1.4.	Reactivos.....	22
4.1.5.	Soluciones .....	22
4.1.6.	Material biológico .....	23
4.2.	Métodos.....	23
4.2.1.	Sitios de muestreo .....	23
4.2.2.	Muestreo.....	24
4.2.3.	Cuantificación de grupos indicadores de calidad sanitaria.....	25
4.2.4.	Detección de <i>Salmonella enterica</i> .....	25
4.2.5.	Confirmación de <i>Salmonella enterica</i> por ensayo de PCR .....	26
4.2.6.	Detección de virus de hepatitis A .....	26
4.2.6.1.	Procesamiento de las muestras de jitomate <i>cherry</i> .....	26
4.2.6.2.	Detección por RT-PCR .....	27
4.2.6.3.	Detección por RT-qPCR .....	28
4.2.7.	Evaluación de desinfectantes para la inactivación de <i>S. enterica</i> en la superficie de jitomate <i>cherry</i> .....	28
4.2.7.1.	Preparación del fruto.....	28
4.2.7.2.	Preparación del inóculo .....	29
4.2.7.3.	Inoculación .....	29
4.2.7.4.	Aplicación de tratamientos de desinfección .....	30
4.2.7.5.	Cuantificación de <i>S. enterica</i> .....	30



4.2.8.	Evaluación de desinfectantes para la inactivación de células de <i>S. enterica</i> inmersas en biopelículas desarrolladas en la superficie de jitomate <i>cherry</i> .....	31
4.2.8.1.	Formación de biopelículas de <i>S. enterica in vitro</i> .....	31
4.2.8.2.	Formación de biopelícula de <i>S. enterica</i> en jitomate <i>cherry</i> .....	31
4.2.8.3.	Aplicación de los tratamientos de desinfección .....	32
4.3.	Análisis estadístico.....	33
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
5.1.	Grupos indicadores de calidad sanitaria .....	34
5.2.	Incidencia de <i>S. enterica</i> .....	38
5.3.	Relación entre presencia de <i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i> .....	39
5.4.	Detección de VHA mediante RT-PCR.....	41
5.5.	Detección de VHA mediante RT-qPCR.....	42
5.6.	Eficacia de la desinfección en la inactivación de <i>S. enterica</i> en jitomate <i>cherry</i> .....	45
5.7.	Eficacia de la desinfección química en la inactivación de <i>Salmonella</i> inmersa en biopelículas formadas en la superficie de jitomate <i>cherry</i> .....	48
6.	CONCLUSIONES .....	55
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8.	APÉNDICE .....	71
8.1.	Distribución geográfica del programa de muestreo .....	71
8.2.	Determinación de cloro.....	72
8.3.	Determinación de ácido peracético .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programa de muestreo.....	25
Tabla 2. Secuencia de iniciadores para RT-PCR .....	27
Tabla 3. Diseño experimental.....	33
Tabla 4. Contenido de microorganismos indicadores en muestras de jitomate <i>cherry</i> obtenidas de supermercados y mercados .....	34
Tabla 5. Presencia de <i>E. coli</i> en muestras de jitomate <i>cherry</i> obtenidas de supermercados y mercados .....	37
Tabla 6. Presencia de <i>Salmonella enterica</i> en muestras de jitomate <i>cherry</i> obtenido de supermercados y mercados .....	39
Tabla 7. Relación entre presencia de <i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i> en jitomate <i>cherry</i> .....	40
Tabla 8. Incidencia de VHA en jitomate <i>cherry</i> en punto de comercialización.....	44
Tabla 9. Análisis de varianza efectuado a la desinfección sobre células adheridas de <i>S. enterica</i> .....	46
Tabla 10. Efectividad de diversos desinfectantes aplicados en la superficie de jitomate <i>cherry</i> en la inactivación de <i>S. enterica</i> .....	47
Tabla 11. Cuantificación de <i>S. enterica</i> en la superficie de jitomate <i>cherry</i> .....	51
Tabla 12. Efecto de desinfectantes contra <i>S. enterica</i> inmersa en biopelículas formadas en la superficie de jitomate <i>cherry</i> .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tríada microbiológica de la enfermedad por consumo de agua y alimentos .....	5
--	---

Figura 2. Compleja interacción de factores que conllevan a la formación de biopelícula .....	17
Figura 3. Etapas en la formación de biopelículas.....	18
Figura 4. Estandarización de la técnica de RT-PCR para detectar partículas virales de VHA .....	41
Figura 5. Estandarización de la técnica de RT-qPCR para detectar partículas virales de VHA .....	42
Figura 6. Temperatura de disociación de los productos generados .....	43
Figura 7. Cantidad de biopolímeros producidos por cepas de <i>S. enterica</i> en placas incubadas a 25 °C durante 96 h .....	49
Figura 8. Formación de biopolímeros de <i>S. enterica</i> en función de la cantidad de inóculo en placas incubadas a 25 °C durante 72 h .....	50
Figura 9. Cuantificación de <i>S. enterica</i> en la superficie del fruto y en placa incubadas bajo las mismas condiciones (T: 25 °C; t: 72 h; HR 97 %).....	51
Figura 10. Formación de biopolímeros de <i>S. enterica</i> en placas incubadas bajo las mismas condiciones que el jitomate <i>cherry</i> (T: 25 °C; t: 72 h; HR 97 %) .....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cambios en los estilos de vida actuales han permitido el incremento en el consumo de frutas y hortalizas, lo que se ha traducido en el aumento en su producción. México es considerado como el centro más importante de domesticación del jitomate y actualmente se encuentra dentro de los 11 países con mayor producción anual de este cultivo, ocupando un lugar preponderante en el ámbito económico y social. Con el aumento en la exportación de este alimento se ha presentado un incremento dramático en el número de brotes de enfermedades alimentarias asociados a su consumo en Estados Unidos; entre los que se encuentran patógenos como *Salmonella* y virus de hepatitis A (VHA).

En México no existe un programa de vigilancia epidemiológica donde se relacione la presencia de un patógeno en un alimento con el desarrollo de la enfermedad en el consumidor debido a su ingesta. Conocer la incidencia de *Salmonella* y Virus de Hepatitis A en un producto que se consume principalmente en fresco como lo es el jitomate *cherry*, es de gran relevancia para poder conocer el riesgo al que nuestra población está expuesta. Otro aspecto importante a considerar es el tipo de cultivo (principalmente en invernaderos), por lo que el uso de desinfectantes se puede ver restringido y el riesgo de contener algún patógeno a humanos aumentado. Desafortunadamente, hasta ahora no existe un desinfectante completamente eficaz para eliminar a los patógenos presentes en la superficie del fruto; la inactivación microbiana se ve limitada por la capacidad que tienen algunos patógenos de desarrollar biopelículas, debido a que son un conjunto de microorganismos incrustados en sustancias poliméricas extracelulares, y con ello, más tolerancia a la acción del germicida. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue investigar la calidad sanitaria, así como conocer la incidencia de *Salmonella enterica* y VHA en jitomate *cherry* de dos tipos de establecimientos comerciales de la ciudad de Querétaro y evaluar la efectividad de diversos desinfectantes en la inactivación de *S. enterica* inmersa o no en biopelículas formadas sobre la superficie del fruto.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Frutas y hortalizas en la alimentación humana

La producción y exportación de frutas y hortalizas se ha convertido en el área más dinámica de la agricultura mexicana durante las últimas décadas. México es actualmente uno de los países que más exportan estos productos, especialmente a los Estados Unidos de América (EE.UU.), lo cual suele explicarse en gran medida por el proceso de apertura comercial iniciado desde la década de los noventa (Macías, 2010; Yúnez, 2012). Sólo entre el periodo de 2008 y 2010, una media del 24 % de los productores hortícolas importados por aquel país provinieron de México con un valor de 8 500 millones de dólares (Arias, 2014). México cuenta con más de 14 millones de hectáreas para cultivo, de los cuales casi 50 000 corresponden a jitomate, obteniendo una producción mayor a los 2 millones de toneladas de este fruto (SIAP, 2017).

Este tipo de alimentos constituyen un grupo bastante heterogéneo que es sobresaliente desde un punto de vista nutricional por su importante aporte de vitaminas y minerales, así como por su bajo contenido energético (Rivera, 2008). El consumo *per cápita* de hortalizas, tanto frescas como procesadas aumentó en México en las últimas décadas en respuesta a los mensajes publicitarios sobre la salud, asociados con el consumo de frutas y hortalizas, así como a su disponibilidad en formas más convenientes (Maya, 2004). En EE.UU., el Departamento de Agricultura recomienda el consumo de cinco a nueve raciones de frutas y verduras al día. Por su parte, el comité de expertos FAO/OMS recomienda un consumo mínimo de 400 g al día (Hernandez, 2010).

Por otro lado, cambios en la dieta, especialmente por razones de salud y estética, tienden al fortalecimiento del consumo de frutas y hortalizas frescas y promueven que los consumidores adquirieran conciencia del grado nutricional y de sus efectos en la salud (Benavides *et al.*, 1999). Dado que existen pruebas cada vez

más numerosas y contundentes de que un consumo adecuado de frutas y hortalizas contribuye a prevenir muchas enfermedades y favorece la buena salud, aunque una parte considerable de la población mundial las consumen en cantidades insuficientes (Hernandez, 2010).

Para el año 2020, se espera un incremento en el consumo de frutas de 24 a 27 % y un incremento en el consumo de hortalizas de 19 a 24 %; este aumento puede tener consecuencias no deseadas, si las frutas y hortalizas se producen bajo condiciones que puedan propiciar su contaminación con microorganismos patógenos ya que más de 12 % de las enfermedades alimentarias están relacionadas con el consumo de productos frescos (Matthews, 2006).

### **2.1.1. Jitomate (*Lycopersicon esculentum*)**

El origen del jitomate es la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile, pero su cultivo se extiende por todo el continente (Gosselin *et al.*, 2001). El nombre científico de la especie es *Lycopersicon esculentum*; el nombre de jitomate procede del náhuatl *xictli*, ombligo y *tomatl*, tomate, que significa tomate de ombligo. Es una planta de la familia *Solanaceae*, de carácter climatérico. El fruto es una baya ovalada, redonda o periforme. Su tamaño va desde pequeños frutos del tamaño de una cereza, hasta enormes frutos de 750 g (Sánchez-Bel *et al.*, 2012).

El jitomate es el segundo producto hortofrutícola de importancia mundial (Álvarez, 2014) y es el principal cultivo de la agricultura protegida. Este fruto se cultiva en diversos países, y hasta el 2016 el mayor productor fue China. México se ubica en el décimo primer lugar en producción; dentro de los principales estados productores se encuentran Sinaloa, Michoacán, San Luis Potosí, Baja California y Jalisco. El jitomate tiene el 22 % de la participación nacional en la producción de frutas y hortalizas y el 99 % de su exportación se destina a EE.UU. El consumo anual en México es de 13.8 kg. (SIAP, 2016).

### **2.1.1.1. Jitomate *cherry* (*L. esculentum* var. *Cerasiforme*)**

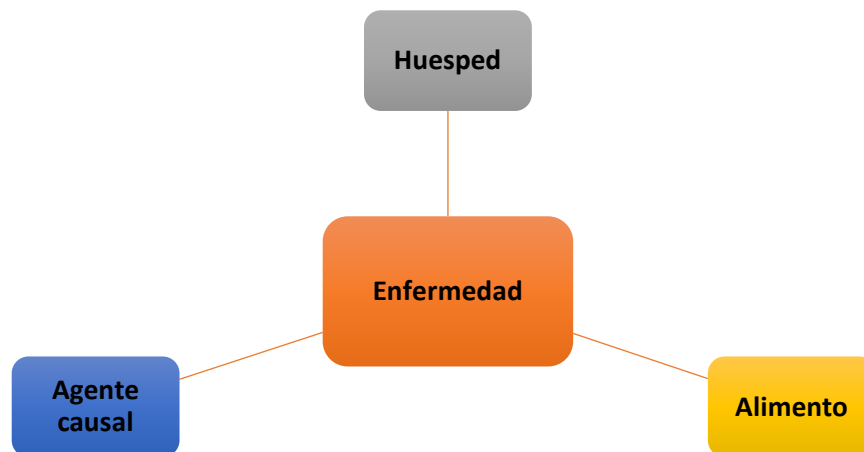
El jitomate se clasifica con base a su forma en seis tipos, del más pequeño al más grande: *grape* (uva), *cherry* (cereza), Roma, tipo pera, bola estándar y bola grande (SIAP, 2016). El jitomate *cherry* se produce en plantas de crecimiento indeterminado; es pequeño y de piel delgada; los frutos se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos, tiene sabor dulce y existen de color rojo y amarillo (Saavedra *et al.*, 2017; FAO, 2012).

El jitomate *cherry* se diferencia del jitomate por su tamaño, sabor, conservación poscosecha y posibilidades culinarias. Su atractivo aspecto lo hace apto para decoración de platillos, así como la facilidad de su consumo y sus excelentes propiedades nutritivas lo convierten en un producto ideal para la alimentación de los niños. Su conservación es durante prolongados períodos, constituyendo un jitomate de larga vida comercial (más 50 días en temperaturas de 7-10 °C). Es una variedad que se adapta bien a invernaderos fríos, tanto como cultivo orgánico como hidropónico. Aunque presenta un mayor costo de mano de obra a cosecha en comparación con variedades como la Roma y bola, el menor número de tratamientos terapéuticos y el buen precio que logren en el mercado lo compensa (Yun *et al.*, 2015).

## **2.2. Riesgos microbianos asociados al consumo de frutas y hortalizas**

La microbiología del agua y alimentos ha identificado tres componentes en la configuración del riesgo de enfermar resultante de su consumo: alimento, agente patógeno e individuo. El peligro microbiano se puede expresar con diferentes niveles de riesgo y se encuentra influenciado por la contaminación, sobrevivencia y desarrollo del microorganismo patógeno en el alimento. La gestación del riesgo inicia con la contaminación, y para los microorganismos de dosis infectante baja, la contaminación por sí misma puede concluir en enfermedad siempre y cuando el patógeno pueda sobrevivir hasta el consumo. Sin embargo, otros patógenos

requieren multiplicarse en el alimento para alcanzar la dosis infectante o para sintetizar toxinas hasta una concentración que tenga expresión clínica en el consumidor (Escartín, 2008).



**Figura 1.** Tríada microbiológica de la enfermedad por consumo de agua y alimentos

En todo el mundo se ha incrementado la frecuencia de brotes de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de frutas y hortalizas contaminadas (Kwon *et al.*, 2017). Dentro de los principales microorganismos patógenos a humanos que se han encontrado involucrados en estos brotes están cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Nguyen-The, 2012). El agente causal de la mayoría de los brotes de enfermedad ha sido *Salmonella* spp. En los EE. UU., esta bacteria ha sido la causante de brotes de enfermedades por consumo de germinados contaminados, jitomate, rebanadas de jitomate, de melón y de sandía (Orue *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017). Por otro lado, enfermedades causadas por el virus de la hepatitis A (VHA) se han relacionado con el consumo de jitomates y fresas azucaradas (Martín-Latil *et al.*, 2012). El conocimiento acerca de los parásitos y helmintos asociados al consumo de frutas y hortalizas es limitado (Rojas Reséndiz *et al.*, 2010; García Galván, 2009).

La importancia de la investigación enfocada a la detección de patógenos de transmisión alimentaria que pueden producir brotes de enfermedades radica en la



identificación oportuna y la prevención. Es necesario identificar claramente los puntos de contaminación durante el proceso y cuáles son los frutos con mayor probabilidad de retener patógenos. Algunos reportes indican que estos patógenos tienen la habilidad de internarse en los tejidos de las frutas y hortalizas. Esta habilidad de los microorganismos podría representar un riesgo para la salud humana, aunque se tenga la precaución de lavar, desinfectar o eliminar la epidermis de los frutos (Ávila-Quezada *et al.*, 2008).

En respuesta al reconocimiento de las hortalizas como vehículos de patógenos, gran parte de la investigación científica reciente se ha enfocado en el desarrollo de métodos efectivos de descontaminación. Con la excepción de la irradiación, ningún tratamiento de desinfección es definitivo, al menos en las concentraciones aplicadas que no daña la calidad sensorial del producto. Aún la irradiación podría no ser completamente efectiva contra virus en hortalizas. Esos tratamientos tienen como objetivo bajar la carga microbiana, pero no siempre resultan en frutas y hortalizas libres de patógenos microbianos (Orozco, 2008).

### **2.2.1. Fuentes de contaminación**

La principal causa de brotes por consumo de frutas y hortalizas son los microorganismos de origen entérico (CDC, 2017). La presencia de patógenos intestinales en la tierra es primordialmente el resultado de contaminación fecal accidental o intencional. Las frutas y hortalizas cultivadas en campo abierto están expuestas a diversas fuentes de contaminación, incluyendo el agua de irrigación, tierra, estiércol, manipulación de los trabajadores y heces (humanas y animales) que pueden contener patógenos (FAO, 2003; López Camelo, 2003). En la cosecha son de especial interés la manipulación humana, la maquinaria y el equipo, el agua de lavado y enjuague, el aire y una posible contaminación cruzada (Beuchat, 1996). Por otro lado, durante la poscosecha, la contaminación puede ocurrir por medio del material de transporte, el agua del lavado y por contaminación cruzada con otros alimentos (Wachtel *et al.*, 2002).

Mei *et al.* (2013) indicaron que, dentro de los factores ligados al sistema de producción, uno de los más importantes es la intervención humana, ya que es una fuente de contaminación que influye de manera autónoma en las operaciones del proceso de producción y a su vez, puede modificar el medio para potencializar la contaminación y transmitirla de un lugar a otro.

A pesar de la multiplicidad de fuentes de contaminación potenciales para las frutas y hortalizas identificadas desde la labranza en campo abierto hasta los sitios de preparación, como las cocinas, es poco probable que operen simultáneamente. La forma en que se gesta la contaminación necesita investigar: cuándo ocurren, en qué circunstancias, cómo se distribuye y en qué intensidad, de manera que su caracterización es compleja. Es indispensable conocer el comportamiento de microorganismos de interés sanitario no solamente en el alimento cultivado, sino en materiales agrícolas de su entorno para decidir en qué términos podrían funcionar como potenciales nichos y vehículos de la contaminación (Orozco Ramírez, 2008).

Los patógenos asociados a ETA's son transmisibles a través de hortalizas o frutas que se consumen crudas. Las llamadas ensaladas verdes que contienen hortalizas como lechuga, brócoli, zanahoria, jitomate, apio y otras, constituyen un riesgo especial, suelen ofrecerse en las barras de restaurantes y prepararse en casi todas las cocinas, incluidos los hogares (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

### **2.2.2. Brotes de enfermedad**

La información epidemiológica sobre enfermedades transmitidas por alimentos en México es escasa e incompleta, por lo que es necesario recurrir a datos obtenidos principalmente en EE.UU. Es importante resaltar que existe diferencia entre la producción de alimentos en México y EE.UU.

Los microorganismos capaces de provocar enfermedades humanas pueden encontrarse en los productos agrícolas crudos. En ocasiones forman parte de la microflora de las frutas y hortalizas como contaminantes fortuitos provenientes del suelo, el polvo y el entorno. En otros casos, se introducen en los alimentos a través de malas prácticas de producción y manipulación. También éstos pueden ser vehículos para la transmisión de parásitos y virus (FAO, 2003).

En EE.UU., la proporción de brotes asociados a frutas y hortalizas ha incrementado; según el CDC, los alimentos implicados en los últimos 10 años (2006-2015) fueron pepinos, nueces, habas, mangos, melones, papayas y jitomates contaminados con *Salmonella enterica* (CDC, 2015<sup>a</sup>). Para el VHA, las ensaladas, emparedados, cebollas verdes, jitomates y lechugas, fueron los vehículos implicados brotes (Martin-Latil *et al.*, 2012). Durante 2009-2012, se registraron 1008 brotes de norovirus transmitidos por los alimentos, 48 % de todos con una causa conocida; sólo 67 brotes fueron vinculados a alimentos específicos, incluyendo las hortalizas (30 %), las frutas (21 %) y moluscos (19 %) (Hall *et al.*, 2014).

El hecho de que se produzcan grandes brotes causados por *Salmonella* relacionados con el consumo de jitomates contaminados constituye una gran preocupación, considerando que más de 2 millones de toneladas de jitomates frescos se exportan de México a EE.UU. (SIAP, 2016). Durante el periodo comprendido entre 1990 y 2008 el número de brotes causados por *S. enterica* asociados a los jitomates aumentó tanto en frecuencia como en magnitud. Estos hechos resaltan que las estrategias de intervención fueron inadecuadas para asegurar que los jitomates no estén contaminados con *S. enterica* o con algún otro patógeno transmitido por alimentos. Es necesario seguir generando información sobre los mecanismos de contaminación del jitomate y los métodos de erradicación de los patógenos en el producto (FDA, 2003).

El primer brote multiestatal de *Salmonella* relacionado con el consumo de jitomate fue en 1990; en 2005 ocurrieron dos brotes importantes en donde dos

serovares de *S. enterica* (Javiana y Montevideo) se vieron implicados y actualmente también en empacadoras de jitomates (Lim *et al.*, 2016).

Recientemente, diversos estudios epidemiológicos reportaron un vínculo entre los brotes de hepatitis A y el consumo de jitomates deshidratados en Australia, los Países Bajos y Francia (Donnan *et al.*, 2012). La investigación del brote en Australia identificó a jitomates deshidratados importados de Turquía como el vehículo más probable de transmisión (Gallot *et al.*, 2011). En México, la información acerca de virus en jitomate no ha sido reportada.

### **2.2.3. Patógenos de importancia en frutas y hortalizas**

#### **2.2.3.1. *Salmonella enterica***

Todos los años, *Salmonella* causa un millón de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en EE. UU., con 19,000 hospitalizaciones y 380 muertes (CDC, 2015a). Los niños pequeños, los adultos mayores y las personas con sistemas inmunes débiles son los más propensos a padecer salmonelosis (Fernández-Escartín, 2008). En comparación con el periodo 2010-2012, la incidencia de infecciones causadas por *Salmonella* no tifoidea mostró una disminución de 9 % en 2013 (Crim *et al.*, 2015).

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo, flagelado, móvil, no encapsulado, anaeróbico facultativo; fermentador de glucosa, maltosa y manitol; perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Jiménez, 2012). *Salmonella* se clasifica en dos especies: *bongori* y *enterica* (NCBI, 2016).

La mayoría de los serovares de *Salmonella* no tifoidea son consideradas cepas productoras de diarrea y causan gastroenteritis aguda sin invasión. El serovar Typhi causa invasión de las células epiteliales hacia la lámina propia, donde provocan edema de la mucosa e inflamación. Cuando los organismos llegan a la

lámina propia, producen pequeñas cantidades de endotoxinas, que pueden actuar como pirógenos (Cabello, 2007).

Usualmente, se requieren al menos de 2 a 3 log de *Salmonella enterica* para que cause infección; sin embargo, se han reportado brotes en donde menos de 10 células han causado la enfermedad (Fernández-Escartín, 2008). La salmonelosis tiene un periodo de incubación de 6 a 48 horas, y posteriormente el paciente presenta náuseas, vómito y dolor abdominal tipo cólico, siguiendo una diarrea de intensidad moderada sin sangre, fiebre y ataque al estado general (Jiménez, 2012). Los síntomas usualmente se resuelven en una semana, pero el patógeno puede seguirse expulsando en la materia fecal entre 8 y 20 semanas según la edad del individuo infectado (Fernández-Escartín, 2008). La bacteria en los lactantes y personas mayores, así como aquellos con sistema inmune comprometido, puede propagarse de los intestinos al torrente sanguíneo, causando una variedad de enfermedades y en algunos casos incluso la muerte (Yun *et al.*, 2015).

Algunas cepas de *Salmonella* tienen la capacidad de adherirse e invadir el enterocito mediante pinocitosis; este proceso está influenciado por la concentración de calcio, el cual daña los lípidos de la membrana. Ya dentro del enterocito, la bacteria se multiplica en el interior de una vacuola. La falta de mecanismos de adhesión en una cepa suprime la fijación a la mucosa intestinal (Escartín, 2008).

Una característica de relevancia es que puede producir biopelículas en estados de estrés, por lo que aunado a su amplio rango de temperaturas y de pH donde puede crecer, convierten a esta bacteria en una amenaza potencial (Díez-García *et al.*, 2012).

### **2.2.3.2. Virus de la hepatitis A (VHA)**

Los virus entéricos se introducen en el medio ambiente por contaminación de materia fecal humana; sin embargo, pocos son reconocidos como agentes causantes

de enfermedades asociadas con los alimentos. El rotavirus, norovirus y el VHA son los principales agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas a nivel mundial (Maunula y von Bonsdorff, 2014).

El VHA causa más de 1.4 millones de nuevos casos en el mundo cada año, representando un costo mayor a los 36 000 dólares para EE.UU. cada año (CDC, 2003). VHA causa sólo la forma aguda de la enfermedad, principalmente en los niños, mientras que el 70 % de los adultos presentarán manifestaciones clínicas importantes, incluyendo hepatomegalia (Jacobsen y Wiersma, 2010).

La hepatitis A puede presentarse como casos aislados de individuos o en epidemias que cubren grandes zonas. Los brotes se presentan con mayor facilidad en las áreas superpobladas donde imperan condiciones sanitarias deficientes (CDC, 2003). El VHA se transmite fundamentalmente por ruta fecal-oral ya sea por contacto de persona a persona, o bien, por la ingestión de agua y alimentos contaminados, en particular, mariscos, frutas y verduras (Martin-Latil *et al.*, 2012).

El VHA es un virus de ARN de una sola hebra positiva clasificada en el género *Hepatovirus* de la familia Picornaviridae (Coudray-Meunier *et al.*, 2015); el VHA es estable en el medio ambiente y es particularmente resistente a los desinfectantes, calefacción, presión y pH bajo (Casteel *et al.*, 2008). Por otro lado, este virus puede permanecer con capacidad infectiva y ser activo durante más de 30 días tras el riego con lodos o efluentes (Butot *et al.*, 2008). El agua usada en el riego y el abono fertilizante pueden ser vehículos de su dispersión en los cultivos en el campo. Se ha observado que partículas virales de VHA inoculadas en zanahorias, hinojo y lechuga sobrevivió durante 4, 7 y 9 días, respectivamente. Además, el lavado no reduce sustancialmente la contaminación viral (Stals *et al.*, 2012).

En cuanto a la fisiopatología de la enfermedad, ésta tiene un inicio insidioso y se caracteriza por fiebre, malestar general, anorexia, náuseas, dolor abdominal; conforme progresa la enfermedad, la persona presentará malestar general, coluria,

acolia y prurito generalizado e ictericia. La dosis infectante va de 10-100 partículas virales (Flores, 2016). El periodo de incubación es de 15 a 50 días, con un promedio de 28 días, su duración es variable y va desde la enfermedad leve que dura de una a dos semanas, hasta una afección peligrosa incapacitante que permanece varios meses; su duración está directamente relacionada con la edad y estado de salud del paciente. La tasa de letalidad en niños es de 0.1 %, en personas de 15 a 39 años es de 0.4 % y de 1.1 % en mayores de 40 años de edad (Anthony, 2004; DGE, 2012).

VHA tiene dosis infectante baja y se encuentra en concentraciones bajas en muestras de alimentos; además, se requiere un método de concentración de virus eficaz y rápido para el control de rutina. Debido a la ausencia de un método de cultivo celular fiable para la mayoría de los virus entéricos implicados en brotes, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (por sus siglas en inglés RT-qPCR) se utiliza ampliamente para la detección de virus de ARN en muestras de alimentos. Uno de los requisitos generales para el diagnóstico viral se refiere a la utilización de un control de proceso para controlar la eficacia de concentración de partículas virales, extracción de ácidos nucleicos y la presencia de inhibidores potenciales de la reacción de RT-qPCR (Hennechart-Collette *et al.*, 2015).

### **2.3. Estrategias de control de microorganismos patógenos en frutas y hortalizas**

#### **2.3.1. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)**

El enfoque hacia el suministro de alimentos inocuos y de calidad promovido por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se basa en la gestión de riesgos a lo largo de toda la cadena alimentaria; este enfoque implica la aplicación de medidas reglamentarias en puntos adecuados de la cadena, desde las prácticas anteriores a la producción hasta el punto de venta o de distribución a los consumidores, de manera que el alimento cumpla las normas vigentes (FAO, 2003).

En el ámbito internacional, el *Codex Alimentarius* es el organismo intergubernamental encargado de establecer las normativas internacionales relacionadas con la inocuidad de los alimentos, incluidos los productos hortofrutícolas (Piñeiro, 2007). En EE. UU., agencias gubernamentales como USDA y FDA han publicado diversas guías para minimizar los peligros microbianos en frutas y hortalizas (USFDA/USDA/CDC, 1998). Todos estos manuales están basados en la correcta implementación del programa de BPA.

En México existe el Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) que implementan de forma voluntaria los productores de frutas y hortalizas. Este programa también toma como base los principios establecidos en las BPA (SENASICA, 2016).

El programa de BPA incluye estrategias para prevenir la contaminación y garantizar la inocuidad de los productos hortofrutícolas desde su producción en el campo y hasta su cosecha y empaque. Específicamente, controla la contaminación de agentes físicos, químicos y biológicos durante diversas actividades como: el riego, la aplicación de abonos orgánicos, la cosecha y manipulación tras la recolección, el saneamiento de equipo y utensilios, el uso de pesticidas y el control de animales y plagas (Escartín, 2008).

Evidentemente todas las actividades de control que se realizan deben de estar debidamente registradas. Como requisitos para llevar un producto inocuo al mercado. Esta es la primera etapa en el aseguramiento de la inocuidad, aunque el alimento puede contaminarse. De aquí la importancia de mantener la cadena de inocuidad alimentaria basada en el concepto “del campo a su mesa”, incluyendo el empleo de un método de desinfección para las frutas y hortalizas, posterior al corte y previo al almacenamiento (FAO, 2002).



### **2.3.2. Métodos de reducción de carga microbiana**

La contaminación superficial de frutas y hortalizas varía en número y tipo, dependiendo del producto y del manejo, previo y posterior a la cosecha, que dicho producto haya recibido. Muchos de los microorganismos están asociados a partículas de tierra y otro tipo de suciedad cercana a la fruta, en cuyo caso la remoción es relativamente sencilla. Sin embargo, existe flora asociada cuya remoción es difícil ya que se encuentra formando biopelículas superficiales o están ocupando lugares poco accesibles como aberturas naturales o heridas (Speranza *et al.*, 2016).

Existen varios métodos para reducir la carga microbiana superficial de frutas y hortalizas. Cada método tiene ventajas y desventajas dependiendo del tipo de producto y del proceso. En general, los métodos utilizados se basan en procesos físicos y/o químicos (Lim y Harrison, 2016). Entre los físicos podemos mencionar la remoción mecánica, los tratamientos térmicos y la irradiación. Los químicos involucran el uso de agentes químicos como desinfectante superficiales que se utilizan en soluciones acuosas (Matthews, 2006).

#### **2.3.2.1. Agentes desinfectantes**

Los tratamientos con agentes desinfectantes se hacen en solución acuosa por inmersión o aspersión. El alcance del tratamiento depende del compuesto empleado y de los microorganismos que se quieren eliminar (Kader, 2011). Por una parte, los virus y quistes de protozoos generalmente exhiben mayor resistencia a los desinfectantes que las bacterias y hongos (Tortora *et al.*, 2007). En cuanto al compuesto, la resistencia relativa varía en función de su tipo y pH, tiempo de contacto, temperatura, tipo de acción mecánica y las propiedades químicas y físicas de la superficie a tratar (USFDA, 2001).

Entre los agentes químicos más estudiados se encuentra el cloro aplicado a concentraciones de 50 a 200 ppm durante 1 a 2 minutos (Silveira *et al.*, 2008). La

desventaja principal del cloro es que pierde poder germicida al contacto con la materia orgánica o por la exposición al aire, luz o metales. Por otra parte, el cloro produce potenciales compuestos nocivos, incluyendo las cloraminas y trihalometanos que pueden ser una amenaza para la salud humana y el medio ambiente (Richardson *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta la salud de los consumidores y los problemas ambientales, se necesitan alternativas más eficaces y más seguros para los consumidores (Yun *et al.*, 2015). Es por ello que se han investigado compuestos como el ácido peracético, peróxido de hidrógeno, fosfato trisódico y ácidos orgánicos (Wei *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 2008; Kader, 2011). Desde el 2001 la FDA aprobó el uso de ácido peracético para la desinfección directa de frutas y hortalizas a una concentración de 40-80 ppm (Speranza *et al.*, 2015).

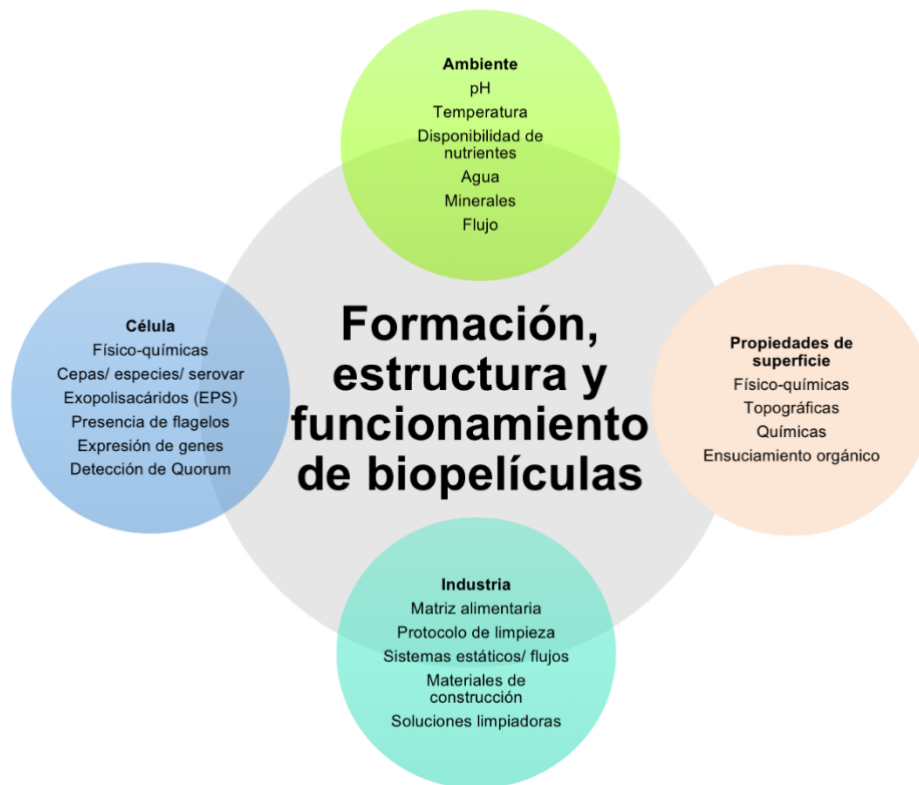
Un estudio demostró que la población de *S. Montevideo* sobre la superficie de jitomates se reduce de 5.2 log UFC/cm<sup>2</sup> a valores no detectables luego de un tratamiento durante 15 s con fosfato trisódico al 15 % (Zhuang y Beuchat, 1996). Se ha reportado también en jitomate una reducción de 2 log UFC/g de *S. Montevideo* empleando hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (Zhuang *et al.*, 1996). En jitomate *cherry*, la aplicación de recubrimientos de zeína con canela y aceite de mostaza redujeron 4.6 y 2.8 log UFC/g respectivamente, después de 5 horas de haber aplicado el recubrimiento (Yun *et al.*, 2015). En jitomate *cherry* también se han evaluado otros recubrimientos (HPMC, quitosano, carvacrol) como antifúngicos (contra *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus flavus*) para evitar el deterioro del jitomate, pero no se conoce su efecto en microorganismos patógenos al humano (Fagundes *et al.*, 2013; de Souza *et al.*, 2015). El tratamiento con calcio calcinado tuvo una reducción de 7.59 log UFC/fruto de jitomate sobre *L. monocytogenes*; este producto también se probó en dos concentraciones (1 y 2 %) sobre semillas de alfalfa, logrando reducciones de 3.2 y 1.5 log, respectivamente (Gandhi y Matthews, 2003). Estos resultados son prometedores y justificarían una investigación posterior sobre *Salmonella* en jitomate *cherry* empleando calcio calcinado al 1 %.

La eficiencia de la desinfección puede verse limitada debido a la adherencia de bacterias a lugares inaccesibles sobre el producto como son los poros, superficies cortadas, cicatrices y otras irregularidades; o bien debido a la presencia de biopelículas que pueden proteger a los microorganismos a la acción de los desinfectantes (Zhuang y Beuchat, 1996; Casteel *et al.*, 2008).

#### **2.4. Biopelículas bacterianas**

El término biopelícula o “biofilm” se refiere a un consorcio funcional de microorganismos unidos a una superficie e incrustados en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por los mismos microorganismos. La formación de un biopelícula es un proceso muy complejo y consiste en una adhesión inicial, microcolonización y producción de EPS, seguido de maduración. En el primer paso (Figura 2), varios factores, tales como la composición del substrato, la química superficial y la topografía de la superficie, el flujo de fluidos y la baja disponibilidad de nutrientes, pueden inducir cambios fenotípicos de las células planctónicas (vida libre) a la forma sésil (células unidas) en muy poco tiempo (Speranza *et al.*, 2015).

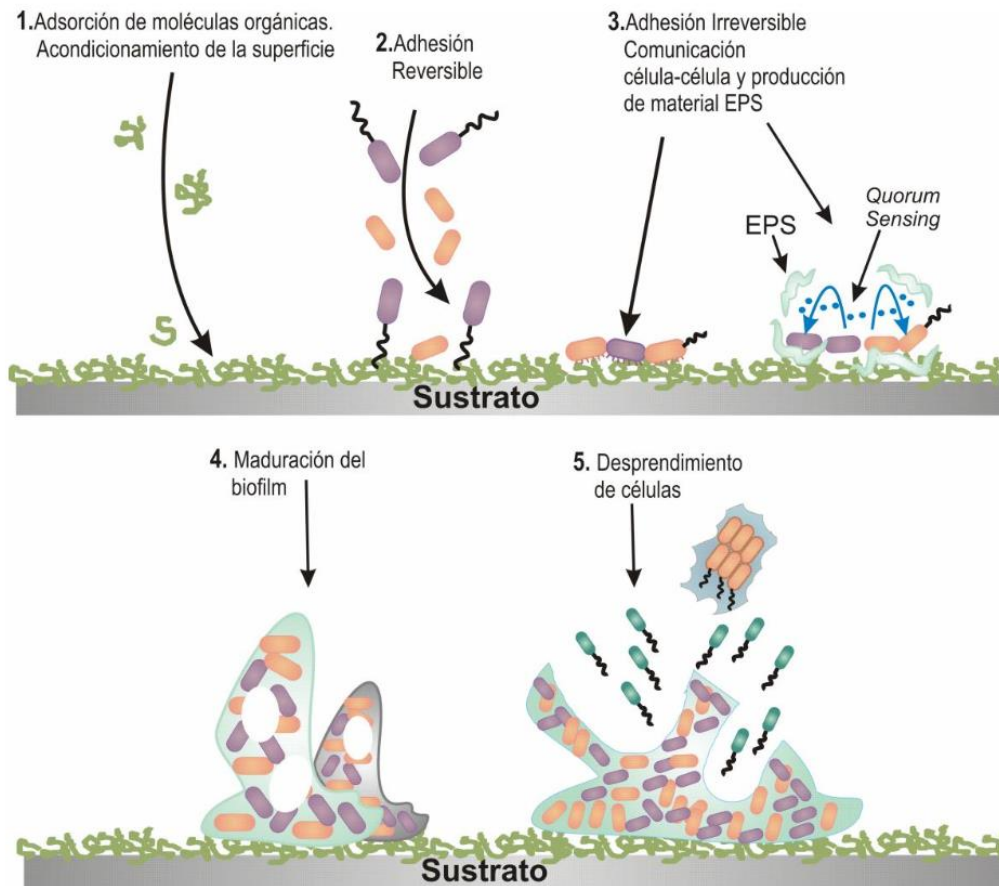
No sorprende que más de 99 % de todas las bacterias del planeta vivan en una biopelícula, ya que los microorganismos ganan considerables ventajas al ser parte de una comunidad. Los microorganismos son organismos vivos con una amplia gama de especies fisiológica y metabólicamente variadas que les permite colonizar casi cualquier superficie que encuentren, así como adaptarse y utilizar una gran diversidad de substratos. Por lo tanto, una biopelícula puede ser una entidad de pequeña o gran escala y en el entorno de procesamiento de alimentos pueden encontrarse con frecuencia. Las biopelículas cerrados o "verdaderos" ocurren generalmente bajo condiciones del flujo continuo o intermitente y se considera que tienen estructuras apiladas bien desarrolladas. Bajo condiciones estáticas, se ha demostrado que se producen biopelículas con diferentes arquitecturas y funcionalidades (Whitehead y Verran, 2015). La presencia de estas estructuras dificulta la acción de desinfectantes y antimicrobianos (Aviles *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Compleja interacción de factores que conllevan a la formación de biopelícula (Modificado de Whitehead y Verran, 2015)

#### 2.4.1. Etapas de formación de biopelícula de *Salmonella*

Las etapas de formación de biopelícula son: contacto y anclaje de bacterias sobre superficie, formación de microcolonias, comunicación entre moléculas y producción de la matriz extracelular, la maduración de la biopelícula y como último escalón del ciclo es la colonización de nuevas superficies (Figura 3). En la fase de anclaje, esta puede ser instantánea y reversible, si se prolonga el tiempo de contacto puede llegar a ser adhesión irreversible (Whitehead y Verran, 2015).



**Figura 3.** Etapas en la formación de biopelículas (Davies *et al.*, 1998)

El incremento de la población en la biopelícula puede ocurrir mediante al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la división binaria de las células adheridas a la superficie. El segundo mecanismo es la redistribución de las células adheridas mediante la movilidad superficial. Es decir que a medida que las células se dividen, las células hijas se desplazan sobre la superficie para formar cúmulos celulares, de manera similar a lo que ocurre en la formación de colonias en las placas de agar. Un tercer mecanismo de agregación es la captación de células planctónicas a partir del fluido hacia la biopelícula desarrollado. La contribución relativa de estos tres mecanismos depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie colonizada y las condiciones físicas y químicas del medio ambiente e impacta sobre la estructura de la biopelícula (Phillips, 2016). Las células inmersas en biopelículas suelen adquirir características importantes como: el aumento de la tolerancia a los

antibióticos, la resistencia a germicidas. Actualmente se acepta generalmente que el modo de crecimiento de la biopelícula induce la tolerancia bacteriana a la desinfección que puede conducir a preocupaciones económicas y de salud sustanciales (Charlebois *et al.*, 2017). En la formación de microcolonias y desarrollo se lleva a cabo un mecanismo de comunicación intercelular *quorum sensing* o autoinducción, la cual permite la unión de células planctónicas en el medio circundante, además se lleva a cabo un incremento en la producción de EPS por parte de las bacterias (Phillips, 2016).

En la etapa de maduración de la biopelícula, se desarrolla una estructura organizada, adaptándose a los cambios en población y disponibilidad de nutrientes y de oxígeno. Finalmente, puede ocurrir desprendimiento de componentes de la biopelícula y colonización de nuevas superficies si las condiciones son favorables (Whitehead y Verran, 2015).

La biopelícula es un modo protegido de crecimiento bacteriano que representa ventajas para las bacterias participantes: protección frente a agentes antimicrobianos, hay un incremento de la disponibilidad de nutrientes, así como de moléculas de agua, reduciendo el riesgo de deshidratación, finalmente, la proximidad a otras bacterias, facilita la cooperación y la transferencia de genes (Gracia, 2006).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Investigar la presencia de *Salmonella enterica* y Virus de Hepatitis A e indicadores de calidad microbiológica de jitomate *cherry* obtenido de puntos de comercialización de la ciudad de Querétaro, y evaluar la eficacia de desinfectantes contra *Salmonella enterica* inmersa o no en biopelícula inoculada en el fruto.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Cuantificar los microorganismos indicadores de calidad sanitaria en jitomate *cherry* obtenido en puntos de comercialización.
2. Determinar la incidencia de *Salmonella enterica* y Virus de Hepatitis A en jitomate *cherry* obtenido en puntos de comercialización.
3. Evaluar la eficacia de desinfectantes en la reducción de *Salmonella enterica* inmersa o no en biopelículas formadas sobre la superficie de jitomate *cherry*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Equipos, materiales y reactivos**

#### **4.1.1. Equipos**

Balanza analítica digital, 120 g x 0.0001 g (BJ 1200C)  
Baño María de precisión (Precisión Modelo 251)  
Campana de bioseguridad 2 (Modelo BSC-1800 II B2-X)  
Centrifuga de mesa (Microcentrifuga Dynamica, Velocity 15)  
Cuenta colonias (Reichert Quebec)  
Homogenizador (BagMixer, Interscience)  
Incubadoras de precisión (Thermo Scientific)  
Potenciómetro (Jenway)  
Termociclador (Biorad)  
Transiluminador UV (MiniBis Pro, DNR, Neve)  
Ultracongelador a -70 °C (Froilabo)  
Vortex (A. Daigger Genie 2)

#### **4.1.2. Materiales**

Filtros de nanoalúmina de 24 mm (Ahlstrom Filtration LLC, Mt Holly Springs, PA)  
Kit de pipetas para PCR (Rainin)  
Kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen)  
Kit RT-PCR (Invitrogen)  
Micropipetas (Thermo Scientific)  
Hieleras portátiles

#### **4.1.3. Medios de cultivo**



Agar cuenta estándar (ACE), (Bioxon, BD, Mexico City, Mexico)  
Agar lisina-hierro (LIA), (Dibico)  
Agar papa dextrosa con ácido tartárico (APD), (Dibico)  
Agar bilis rojo violeta (ABRV), (Dibico)  
Agar soya tripticaseína con rifampicina (200 ppm), (Dibico)  
Agar sulfito bismuto (ASB), (Dibico)  
Agar triple azúcar hierro (TSI), (Dibico)  
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), (Dibico)  
Agua de triptona (AT), (Dibico)  
Caldo lactosado, (Dibico)  
Caldo lauril sulfato con MUG (BD DIFCO)  
Caldo tetrionato (Dibico)  
Caldo rappaport, (Dibico)  
Extracto de carne (Dibico)

#### **4.1.4. Reactivos**

Agarosa (Bioline, 2 %)  
Agua destilada estéril  
Agua libre de nucleasas (Qiagen)  
Buffer TBE 1X  
Glicina (Sigma-Aldrich)  
Go Taq Colorless Master (Promega)  
Iniciadores para *Salmonella enterica* (InvA F y InvA R) (Sigma-Aldrich)  
Iniciadores para VHA (SH-Prot-A-F y SH-Prot-1-R) (Integrated DNA Technologies)  
Reactivo de Kovac  
Tris HCl, ultra pure (Gold Biotechnology)  
Sybr Safe (Invitrogen)

#### **4.1.5. Soluciones**

Ácido peracético (Saniper 20)

Desinfectante a base de semillas de cítricos (Total citrus)

Solución de hipoclorito de sodio (Química Zeux)

Solución salina isotónica (0.85 % NaCl)

#### **4.1.6. Material biológico**

Cepas de *Salmonella* obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC):

- *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076
- *Salmonella enterica* Montevideo ATCC 8387
- *Salmonella enterica* Thompson ATCC 8391
- *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 23595
- *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028

Cepas de *Salmonella* aisladas de jitomate *cherry* durante el presente estudio que serán almacenadas en el cepario del Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos:

- *Salmonella enterica* Montevideo, JT107
- *Salmonella enterica* Agona, JT185
- *Salmonella enterica*, JT217
- *Salmonella enterica*, JT282
- *Salmonella enterica*, JT330

Virus de hepatitis A (VHA) HM175/18f ATCC VR-1402

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Sitios de muestreo**

Se tomaron muestras en ocho establecimientos comerciales de la ciudad de Querétaro (distribución geográfica en Apéndice 8.1):

Supermercados

- ✓ Comercial Mexicana (MEGA) (A)
- ✓ Walmart de México, S. De R. L. De C. V (B)
- ✓ Superama (C)
- ✓ Soriana (D)

#### Mercados

- ✓ Central de abastos de Querétaro (E)
- ✓ Mercado Josefa Ortiz de Domínguez (La Cruz) (F)
- ✓ Mercado Escobedo (G)
- ✓ Mercadito UAQ (H)

#### **4.2.2. Muestreo**

Jitomates tipo *cherry* (rojos y amarillos) se colectaron de cuatro supermercados (A, B, C y D) y de cuatro mercados locales (E, F, G y H) de la ciudad de Querétaro, adquiriendo un total de 333 muestras, en el periodo comprendido entre mayo de 2016 y febrero de 2017. Cada muestra consistió de aproximadamente 300 g, que, en el caso de los cuatro supermercados y de los mercados F y G era el peso del producto contenido en cajas de polietileno tereftalato (PET) mientras que, en mercado local (E y H) la muestra se tomó a granel por el vendedor. En los supermercados B y C se venden las mismas marcas de jitomate *cherry*; en los mercados locales se desconoce el origen de las muestras. En los supermercados, en cada muestreo se colectaron aproximadamente siete muestras de cada sitio de venta, mientras que, en los mercados, el número de muestras colectadas se vio reducido debido a la baja disponibilidad de producto; en el caso particular del establecimiento comercial H, sólo se encuentra disponible un día de la semana. Una vez obtenidas las muestras, se transportaron a temperatura ambiente al Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos para su análisis el mismo día. Del total de muestras, se tomaron 112 para realizar la extracción de ARV viral, con el fin de emplearlo en la detección de VHA; 56 de supermercados y 56 de mercados.

**Tabla 1. Programa de muestreo**

Tipo de Establecimiento	Sitio de muestreo	A	B	Tipo de cultivo
Supermercado	A	59	15	Orgánico
	B	44	14	Orgánico
	C	54	15	Orgánico
	D	48	12	Desconocido
Mercado local	E	22	18	Desconocido
	F	67	26	Desconocido
	G	33	12	Desconocido
	H	6	0	Orgánico

A: Número de muestras analizadas para grupos indicadores y detección de *S. enterica*

B: Número de muestras procesadas para detección de VHA

#### **4.2.3. Cuantificación de grupos indicadores de calidad sanitaria**

De cada muestra se tomaron 50 g (entre 3 y 7 frutos) al azar y se colocaron en bolsas con filtro Whirl-Pak con 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos (1 M, pH 6.8); la mezcla se homogeneizó en un BagMixer 400 a máxima velocidad por 1 min, para posteriormente realizar diluciones decimales. Los análisis se basaron en las técnicas referidas en el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM). Se realizó la cuantificación por la técnica de vaciado en placa: para BMA en agar cuenta estándar (Maturin y Peeler, 2001), para OCT en agar bilis rojo violeta (Feng *et al.*, 2013) y para H&L en agar papa dextrosa (adicionado con 10 % de ácido tartárico) (Tournas *et al.*, 2001); el límite de detección fue de 1 UFC/g de jitomate *cherry*. La estimación de *E. coli* por la técnica de número más probable (Feng *et al.*, 2013) con un límite de detección de 0.3 NMP/g.

#### **4.2.4. Detección de *Salmonella enterica***

De cada una de las muestras, se tomaron 50 g de jitomate *cherry*, se agregaron 50 mL de caldo de preenriquecimiento universal (1:2), incubando la mezcla a 35 °C por 24 h. Posteriormente se transfirió una alícuota de 1 mL a caldo

tetracionato y 0.1 mL a caldo Vassiliadis-Rappaport, y se incubaron a 35 °C por 24 h y 42 °C por 24 h, respectivamente. Para el aislamiento de *Salmonella*, se utilizaron placas de agar xilosa lisina desoxicolato y agar sulfito bismuto, las cuales se incubaron a 35 °C por 24 h. Diez colonias con morfología típica fueron sometidas a pruebas bioquímicas en agar triple azúcar hierro, agar hierro lisina y caldo urea, además de confirmación por serología (Antígenos O y Vi de *Salmonella*) a partir de un subcultivo en agar soya tripticaseína (AST) (Andrews *et al.*, 2016) y mediante un ensayo de PCR (Liu *et al.*, 2002).

#### **4.2.5. Confirmación de *Salmonella enterica* por ensayo de PCR**

Las cepas de *Salmonella* aisladas de jitomate se activaron en caldo soya tripticaseína (CST) a 35 °C por 24 h; se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min, la pastilla se suspendió en 1 mL de solución salina isotónica (NaCl 0.85 %) para calentarse en un termoblock durante 10 min a 94 °C. Posteriormente, se llevó a cabo la PCR empleando GoTaq Colorless Master Mix, los iniciadores *InvA* F (CGCGCTTGATGAGCTTTACC) e *InvA* R (CTCGTAATTCCG CCGCCATTG) (1.25 mM) y 1 µL ADN en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de PCR incluyeron una etapa de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos: de desnaturalización (95 °C por 30 s), alineación (60 °C por 90 s) y extensión (72 °C por 90 s); además de una extensión final a 72 °C por 5 min; el gen blanco fue *InvA* y el tamaño del amplicón esperado de 437 pb. El producto amplificado se reveló mediante electroforesis en un gel de agarosa (2 %) con Sybr Safe a 100 V durante 40 min, se observó en luz UV y se recuperó la imagen (Liu *et al.*, 2002).

#### **4.2.6. Detección de virus de hepatitis A**

##### **4.2.6.1. Procesamiento de las muestras de jitomate *cherry***

De cada una de las muestras, se tomaron 50 g de jitomate *cherry* y se sumergieron parcialmente (un tercio del fruto no quedó inmersa en el líquido) en

una solución amortiguadora [0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)1 M NaCl]. La parte no cubierta del fruto se enjuagó con 500 µL de la solución amortiguadora empleando una micropipeta. El jitomate se giró 25 veces dentro de la solución amortiguadora y la parte no cubierta se enjuagó en cada ocasión de con el fin de desprender las partículas virales presentes en la superficie del fruto. Después de la desorción, la solución primaria se pasó a través de un filtro de nanoalúmina de 24 mm (tamaño de poro de 2 µm, 4601 grados) a una velocidad de 10 mL/min para concentrar las partículas; se adicionaron 500 µL de solución amortiguadora de glicina (3 % de extracto de carne, -0.37 % de glicina) sobre el filtro y se dejó en contacto por un minuto. Posteriormente se obtuvo el filtrado y en dos alícuotas de 200 µL se realizó la extracción de ARN total empleando QIAamp Viral RNA Mini kit (Morales-Rayas *et al.*, 2009).

#### 4.2.6.2. Detección por RT-PCR

La detección del VHA se llevó a cabo con los iniciadores propuestos por Guevremont *et al.* (2006) (Tabla 1). Se emplearon los reactivos de RT-PCR (Invitrogen) en reacciones de 25 µL de volumen final con 150 nM de cada iniciador, 100 U/µL de RT/Taq y 5 µL de ARN viral. Las condiciones de RT-PCR fueron: 55 °C por 30 min de retrotranscripción, 95 °C por 3 min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min (Guevremont *et al.*, 2006).

**Tabla 2. Secuencia de iniciadores para RT-PCR**

Patógeno	Iniciador	Secuencia (5'→3')	Tamaño de amplicón
Virus de hepatitis A	SH-Prot-A-F	ATG GAT GCT GGR GTT CTT AC	172 pb
	SH-Prot-1-R	ART TGG CAG CAA TTT CTT CAA G	

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con SybrSafe, dicha electroforesis se realizó a 50 V durante 45 min.

Transcurrido el tiempo, se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV y se capturó la imagen.

#### **4.2.6.3. Detección por RT-qPCR**

La detección del VHA se llevó a cabo con los iniciadores propuestos por Guevremont *et al.* (2006) mediante el empleo de los reactivos Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen), usando la cepa de referencia de VHA (control positivo). Las condiciones de RT-qPCR se establecieron en función de protocolo Rotor-Gene Sybr Green. Para estandarizar el método de detección se evaluó la concentración de iniciadores (250, 200 y 150 nM), temperatura de alineación (53, 54, 55 y 56 °C), tiempo de retrotranscripción (10 y 30 m) y volumen final de reacción (10 y 25 µL). El volumen final de la reacción fue de 25 µL que contenía: 12.5 µL de mezcla de reacción, 150 nM de cada iniciador, 0.5 µL de RT, 4 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ARN viral. Las condiciones finales de RT-qPCR fueron: 55 °C por 30 m de retrotranscripción, 95 °C por 5 m seguido de 40 ciclos de 95 °C por 5 s, 54 °C por 10 s y 54 °C por 10 s, y al final un aumento de temperatura de 65 °C hasta 95 °C. Los productos amplificados se revelaron como se menciona en el apartado 4.2.6.2.

#### **4.2.7. Evaluación de desinfectantes para la inactivación de *S. enterica* en la superficie de jitomate *cherry***

##### **4.2.7.1. Preparación del fruto**

Para los experimentos de desinfección se adquirieron jitomates *cherry* cultivar '*Small fry*' de supermercados. Se seleccionaron frutos sin daños, sin suciedad aparente y de tamaño uniforme, sin lavado previo al experimento. Cada fruto se pesó (16 g  $\pm$  1 g aproximadamente) y se registraron los datos. Los jitomates se colocaron en una charola estéril y se secaron en una campana de bioseguridad a flujo laminar durante 20 min aproximadamente.

#### **4.2.7.2. Preparación del inóculo**

En esta serie de experimentos se emplearon dos mezclas de cepas de *Salmonella*: una mezcla de cinco cepas de referencia (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Montevideo* ATCC 8387, *S. Thompson* ATCC 8391, *S. Typhimurium* ATCC 23595 y *S. Typhimurium* ATCC 14028) y otra conformada por cinco cepas que fueron aisladas de jitomate *cherry* en los muestreos previos (*S. Montevideo* JT107, *S. Agona* JT185, *S. enterica* JT217, *S. enterica* JT282 y *S. enterica* JT330).

A partir de los viales de las 10 cepas de *Salmonella* mantenidos en congelación (-70 °C) se transfirieron 40 µL a caldo soya tripticaseína con rifampicina (CSTR, 200 ppm) y se incubaron a 35 °C por 24 h. Al final de la incubación, se llevaron a cabo dos resiembras sucesivas en el mismo medio.

Del último subcultivo, se tomó 1 mL y se centrifugó durante 3 min a 10000 rpm. Se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le agregó 1 mL de solución salina isotónica (NaCl 0.85 %). Las cepas de referencia y las cepas aisladas de jitomate se mezclaron por separado tomando volúmenes iguales de cada vial. Se cuantificó el número de células en cada mezcla en agar soya tripticaseína con rifampicina (ASTR, 200 ppm) mediante la técnica de vaciado en placa; las placas se incubaron a 35 °C por 24 h.

#### **4.2.7.3. Inoculación**

Los jitomates *cherry* se inocularon por separado con las dos mezclas de cepas de *Salmonella*. En la parte central del fruto se colocaron cinco gotas de 5 µL cada una para tener una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/fruto. Se dejaron secar en flujo laminar durante 40 min a temperatura ambiente.



#### **4.2.7.4. Aplicación de tratamientos de desinfección**

El día del experimento se prepararon las soluciones de los desinfectantes: hipoclorito de sodio (200 ppm), desinfectante a base de extractos de semillas de cítricos (0.02 %) y ácido peracético (80 ppm). Las soluciones se distribuyeron (50 mL) en vasos de plástico estériles; se incluyó agua destilada estéril como control de arrastre. La concentración de las soluciones de hipoclorito de sodio y del ácido peracético se valoraron mediante el método propuesto por AOAC (Apéndice 8.1 y 8.2).

Los jitomates *cherry* inoculados y secos, se sumergieron en las soluciones desinfectantes durante 5 min. Finalizado el tiempo de contacto, los jitomates se colocaron en bolsas estériles que contenían 50 mL de caldo neutralizante.

#### **4.2.7.5. Cuantificación de *S. enterica***

Se realizó la cuantificación de las células de *S. enterica* en cada muestra antes y después del secado, y después de la aplicación de los tratamientos de desinfección, así como en los controles negativos (muestras de jitomate *cherry* no inoculadas). Los jitomates suspendidos en caldo neutralizante se frotaron vigorosamente desde el exterior de la bolsa con la mano durante 1 min. Posteriormente, se prepararon las respectivas diluciones decimales y se procedió a la cuantificación de *S. enterica* empleando ASTR mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35 °C por 48 h. Las colonias que desarrollaron en el agar se cuantificaron y el resultado se expresó en log UFC/g de jitomate *cherry*. La reducción (expresada en log UFC/g) se obtuvo restando la población sobreviviente de cada tratamiento de la población obtenida después del secado.

#### **4.2.8. Evaluación de desinfectantes para la inactivación de células de *S. enterica* inmersas en biopelículas desarrolladas en la superficie de jitomate *cherry***

##### **4.2.8.1. Formación de biopelículas de *S. enterica in vitro***

Primeramente, se evaluó la capacidad de 10 cepas de *Salmonella* (cinco cepas de referencia y cinco aisladas de jitomate *cherry*, (apartado 4.2.7.2.)) para formar biopelículas, mediante la metodología propuesta por Kim *et al.* (2009).

Se prepararon cultivos frescos de cada una de las cepas (apartado 4.2.7.3.) y se distribuyeron 40  $\mu\text{L}$  de cada cepa en cuatro placas de 96 pocillos estéril a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, se dejó secar en flujo laminar durante 40 min; concluido el tiempo, se adicionaron 210  $\mu\text{L}$  de CSTR. Se incubaron durante 72 h a 25 °C para permitir la formación de biopelícula. Se usó como control CSTR (250  $\mu\text{L}$ ) sin inóculo. Las placas se lavaron dos veces con SSI (250  $\mu\text{L}$ ) y en cada lavado se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de metanol grado molecular, se dejó actuar por 15 min, y se decantó. Cada pocillo de la placa se tiñó con 250  $\mu\text{L}$  de cristal violeta durante 5 min a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de tinción, los pocillos de la placa se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar. Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial y se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm. Se cuantificó la producción de biopolímeros a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. El experimento se llevó a cabo por triplicado y en cada ocasión se incluyeron ocho réplicas técnicas. Con los resultados obtenidos (absorbancias más altas a las 48 h) se seleccionaron las cinco cepas con mayor capacidad para producir biopelículas.

##### **4.2.8.2. Formación de biopelícula de *S. enterica* en jitomate *cherry***

Para esta serie de experimentos se usaron jitomates *cherry* cultivar '*Small fry*' obtenido de supermercados. Se seleccionaron frutos sin daños, sin suciedad

aparente y de tamaño uniforme. Cada fruto se pesó ( $12 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$  aproximadamente) y se registraron los datos. Los jitomates se colocaron en una charola estéril y se secaron en flujo laminar durante 20 min.

Primeramente, se propició la formación de la biopelícula sobre la superficie del jitomate *cherry*, para ello se emplearon las cinco cepas con mayor capacidad para formar biopelículas seleccionadas previamente (apartado 4.2.8.1.). Se prepararon cultivos frescos de cada una de las cepas como se describió en el apartado 4.2.7.3 y se mezclaron en proporciones iguales. La suspensión bacteriana se inoculó sobre el fruto colocando 5 gotas de  $10 \mu\text{L}$ , alcanzando una concentración inicial aproximada de  $5 \times 10^5$  UFC/fruto; los frutos inoculados, se secaron en flujo laminar durante 40 min. Posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 97 % de humedad relativa durante 72 h para favorecer la formación de la biopelícula bacteriana.

De manera simultánea, la suspensión bacteriana empleada como inóculo para el fruto se distribuyó en una placa con 96 pozos ( $50 \mu\text{L}$ /pozo; sin la adición de caldo de cultivo), se incubó bajo las mismas condiciones en que se almacenó el fruto ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; HR 97 %; 72 h) para inducir la formación de biopelículas. La cuantificación de los biopolímeros y de las células inmersas en biopelículas formadas en los pozos de la placa se llevó a cabo como se describió en los apartados 4.2.8.1. y 4.2.7.6, respectivamente.

#### **4.2.8.3. Aplicación de los tratamientos de desinfección**

Los jitomates en los cuales se formaron las biopelículas de *S. enterica* se sometieron a desinfección con hipoclorito de sodio (200 ppm), desinfectante a base de extractos de semillas de cítricos (0.02 %) y ácido peracético (80 ppm) siguiendo el procedimiento previamente descrito (apartado 4.2.7.4.) y se cuantificaron las células sobrevivientes como se describe en el apartado 4.2.7.5. La reducción de la población de *S. enterica* se obtuvo restando la población sobreviviente de cada

tratamiento de la población obtenida después de las 72 h de incubación de los frutos.

### 4.3. Análisis estadístico

Se calcularon las medianas de los contenidos de los grupos indicadores (BMA, OCT, H&L) y se llevó a cabo una comparación no paramétrica de las poblaciones microbianas mediante la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis utilizando el programa JMP 10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para *S. enterica*, *E. coli* y VHA los resultados se expresaron como el porcentaje (%) de incidencia.

El diseño experimental para la desinfección de células adheridas se contó con dos factores (tipo de desinfectante y tipo de cepas) y su interacción (Tabla 3). En desinfección de células inmersas en biopelícula el diseño fue unifactorial (tipo de desinfectante) con cuatro niveles. En todos los experimentos la unidad experimental fueron 5 frutos.

**Tabla 3. Diseño experimental**

Factor	Nivel
Tipo de desinfectante	Hipoclorito de sodio
	Ácido peracético
	Producto a base de semillas de cítricos
	Agua destilada estéril
Tipo de cepas	ATCC
	Aisladas de jitomate <i>cherry</i>

En los tratamientos de desinfección las poblaciones sobrevivientes de *S. enterica* después de la aplicación de los tratamientos de desinfección se analizaron mediante un análisis de varianza. Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 utilizando el programa JMP 10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Grupos indicadores de calidad sanitaria

Las muestras de jitomate *cherry* colectadas en mercados locales mostraron en general una mayor carga de BMA, H&L y OCT que las de los supermercados; particularmente, el mercado F mostró los valores más altos ( $P<0.05$ ) para los tres grupos indicadores y el supermercado B los valores más bajos (Tabla 4). En México, no se cuenta con una norma oficial que indique la carga microbiana permitida para frutas y hortalizas frescas analizadas en punto de comercialización. Así que considerando que el jitomate *cherry* va directamente al consumidor y se consume generalmente en fresco, se tomó la NOM-093-SSA1-1994 como referencia, la cual se refiere a las especificaciones sanitarias para la preparación de alimentos (incluyendo las ensaladas) en establecimientos fijos. El límite máximo permitido de BMA y OCT para ensaladas frescas es de 4.7 y 1 log UFC/g, respectivamente; H&L no se considera en esta norma (NOM, 1994).

**Tabla 4. Contenido de microorganismos indicadores en muestras de jitomate *cherry* obtenidas de supermercados y mercados**

Tipo de Establecimiento	Sitio de muestreo	Número de muestras	Mediana (rango) expresado en log UFC/g		
			BMA	H&L	OCT
Supermercado	A	59	4.1 (6.7) <sup>BCD a</sup>	3.1 (4.5) <sup>B</sup>	1.0 (4.7) <sup>BC</sup>
	B	44	2.4 (3.6) <sup>E</sup>	2.0 (4.0) <sup>B</sup>	1.0 (3.1) <sup>C</sup>
	C	54	3.2 (6.5) <sup>D</sup>	2.7 (4.5) <sup>B</sup>	1.1 (4.7) <sup>BC</sup>
	D	48	4.4 (7.5) <sup>ABC</sup>	4.1 (7.8) <sup>A</sup>	1.1 (3.3) <sup>C</sup>
Mercado local	E	22	3.2 (5.6) <sup>D</sup>	2.1 (4.5) <sup>B</sup>	1.6 (3.9) <sup>AB</sup>
	F	67	4.7 (6.7) <sup>A</sup>	4.4 (7.2) <sup>A</sup>	1.8 (3.8) <sup>A</sup>
	G	33	4.8 (6.2) <sup>AB</sup>	4.5 (6.2) <sup>A</sup>	1.2 (4.4) <sup>ABC</sup>
	H	6	2.9 (2.7) <sup>CDE</sup>	1.5 (2.5) <sup>B</sup>	1.0 (1.6) <sup>ABC</sup>

<sup>a</sup> Para cada columna, las medianas con letras diferentes representan diferencia estadística significativa ( $P<0.05$ ) empleando comparaciones no paramétricas de Wilcoxon/Kruskal-Wallis entre los dos tipos de establecimientos comerciales para cada grupo indicador.

BMA: bacterias mesófilas aerobias; H&L: hongos y levaduras; OCT: organismos coliformes totales. Rango = Valor máximo – valor mínimo

Las BMA presentaron valores de medianas que van de 2.4 hasta 4.8 log UFC/g, mostrándose diferencias significativas entre los establecimientos ( $P < 0.05$ ). Los mercados F y G, así como el supermercado D mostraron los valores más altos de BMA; mientras que en el mercado H y en el supermercado B se encontraron los valores más bajos. En el caso de mercados, las condiciones de los establecimientos se encontraban descuidadas, los valores elevados de BMA se pueden asociar a contaminación ambiental presente, aunado a la manipulación de los jitomates por parte de clientes y vendedores; en el caso de supermercados, el producto se encontraba empacado, pudiéndose deber los valores altos de BMA a contaminación previa a la comercialización.

Cárdenas *et al.* (2013) encontraron un contenido de BMA de 3.6 y 3.2 log UFC/g en las variedades Roma y Bola, respectivamente. Asimismo, Zoellner *et al.* (2016) reportaron una carga bacteriana alta (5.8 log UFC/g) en jitomates Roma muestreados en la etapa de comercialización. Finalmente, Ávila *et al.* (2014) obtuvieron medianas que van de 4.5 hasta 6.7 log UFC/g en pimiento morrón, un fruto que pertenece a la misma familia (*Solanaceae*) que el jitomate, colectado en invernaderos. El conteo de BMA es un grupo extenso que incluye una gran diversidad microorganismos presentes en un alimento. En alimentos procesados, valores elevados se pueden asociar con la presencia de patógenos (Orozco *et al.*, 2008b). En productos frescos como el jitomate, niveles elevados de BMA pueden no estar asociados con la presencia de patógenos, ya que, dada la naturaleza del alimento (cultivado en campo y expuesto a contaminación ambiental), se expone a diferentes fuentes de contaminación; sin embargo, si los productos reciben un tratamiento de desinfección esta población podría disminuirse (Escartín, 2008).

En cuanto al contenido de H&L en los jitomates *cherry*, las muestras colectadas en el supermercado D y los mercados F y G presentaron las medianas más altas (4.1, 4.4 y 4.5 log UFC/g, respectivamente) (Tabla 4). Se pueden observar que los jitomates obtenidos de mercados se encontraban en un estado de madurez mayor que aquellos adquiridos supermercados, encontrándose menor

frescura en las muestras obtenidas de los mercados, disminuyendo la vida de anaquel del producto.

Zoellner *et al.* (2016) encontraron una mediana del contenido H&L de 1.3 log UFC/g en jitomate Roma y un valor máximo de 3.8 log UFC/g. En pimiento morrón, Ávila *et al.* (2014) reportaron medianas para este mismo grupo de microorganismos que van de 5.7 a 6.2 log UFC/g. Los H&L se emplean como indicadores de frescura en frutas y hortalizas; valores menores a 3 log se relacionan con producto fresco; asimismo, suelen ocasionar deterioro cuando su contenido oscila entre 6 y 8 log UFC/g (Barth *et al.*, 2009).

La mediana del contenido de OCT en los jitomates obtenidos de supermercados osciló entre 1.0 y 1.1 log UFC/g, mientras que en los de mercados locales entre 1.0 y 1.8 log UFC/g; es decir, los valores más altos están por encima de los límites permitidos por la NOM-093-SSA1-1994 (<1 log UFC/g). Los mercados obtuvieron las cargas más altas; pudiéndose atribuir a malas prácticas agrícolas aunado a una deficiente/ ausente desinfección previa al transporte del producto. Estos resultados son similares a los reportados en jitomate Roma (1.0 log UFC/g) por Zoellner *et al.* (2016). En otras variedades de jitomate y otros frutos se han encontrado valores más elevados. Cárdenas *et al.* (2013) encontraron recuentos similares de 2.6 log UFC/g para jitomate Roma y bola. Ávila *et al.* (2014) mostraron medianas que van de 2.0 a 4.5 log UFC/g en pimiento morrón. van Dyk *et al.* (2015) evaluaron muestras de jitomate Roma obtenidas en campos de cultivo, mercados locales y centros de distribución, presentando contenidos de OCT de 0.5, 4.0 y 4.5 log UFC/g, respectivamente. Heredia *et al.* (2016) reportaron que el contenido de OCT en melones, chiles jalapeños y jitomates Roma durante la comercialización de los productos fue de 7.1, 3.6 y 3.0 log UFC/g, respectivamente. Castro-Rosas *et al.* (2011) encontraron en chile jalapeño y serrano 7.4 y 6.9 log UFC/muestra, respectivamente, valores mucho más elevados que los encontrados en el presente trabajo. La cuantificación de OCT se aplica para determinar la calidad sanitaria del entorno donde se procesan alimentos y para evaluar la efectividad de algunos

tratamientos de desinfección (Fernández-Escartín, 2008). El jitomate después de su cosecha se somete a un proceso de selección, desinfección (opcional) y empaçado, aunado a que debe permanecer en refrigeración durante su comercialización, con el fin de prolongar su vida de anaquel (Park *et al.*, 2012). Desafortunadamente, cuando se aplica la desinfección esta información no se indica en el empaçado, y por tanto no es posible asociar el nivel de OCT encontrado con la efectividad de los tratamientos de desinfección que posiblemente se pudieron aplicar al jitomate.

Por otro lado, *E. coli* se detectó en el 3.4 % de las muestras de supermercado en concentraciones de 0.3 a 0.4 NMP/g (-0.52 a -0.04 log NMP/g). En los mercados cuando estuvo presente *E. coli* (20.3 % de las muestras) fue en concentraciones bajas de 0.9 a 5.8 NMP/g (-0.05 a 0.76 log NMP/g) (Tabla 5). No hubo diferencias significativas entre cada uno de los sitios de muestreo (datos no mostrados). Las muestras con las incidencias más altas de *E. coli* fueron las obtenidas en los mercados E, F y H, con porcentajes de positividad de 50, 19.4 y 16.7 %, respectivamente.

**Tabla 5. Presencia de *E. coli* en muestras de jitomate *cherry* obtenidas de supermercados y mercados**

Tipo de establecimiento	Sitios de muestreo	<i>E. coli</i>	
		NMP/g	P/n (%) <sup>a</sup>
Supermercado	A	0.4 (0) <sup>b</sup>	2/59 (3.4)
	B	0.3 (0)	1/44 (2.3)
	C	0.4 (0)	1/54 (1.9)
	D	0.4 (0)	3/48 (6.3)
Mercado local	E	0.9 (43.5)	11/22 (50)
	F	3.1 (43.4)	13/67 (19.4)
	G	5.8 (0)	1/33 (3.0)
	H	2.9 (0)	1/6 (16.7)

<sup>a</sup> Número de muestras positivas/ número total de muestras analizadas (porcentaje de muestras positivas)

<sup>b</sup> Valor de la Mediana (valor del rango); rango = valor máximo – valor mínimo



En México, Heredia *et al.* (2016) empleando metodología diferente a la realizada en este estudio, encontraron medias de 1.14 log UFC/fruto en jitomate Roma. Ávila *et al.* (2014) reportaron en pimiento morrón valores menores a 0.3 log NMP/fruto. En Sudáfrica, van Dyk *et al.* (2016) llevaron a cabo estudios para conocer el perfil microbiológico de jitomate obtenido de tres granjas comerciales a gran escala, no habiendo detectado *E. coli* (<10 UFC/g) en 905 muestras. Asimismo, en Filipinas Vital *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio de prevalencia de *E. coli* en pimiento morrón y jitomate, encontrando valores máximos de 3.95 y 3.66 log UFC/g en el caso de mercados al aire libre, mientras que en los supermercados los valores fueron 4.15 y 3.12 log UFC/g, respectivamente para cada alimento.

## **5.2. Incidencia de *S. enterica***

La incidencia global de *S. enterica* en jitomate *cherry* fue 11.7 %; el patógeno se detectó en 14.1 % de las muestras colectadas en los supermercados y en 7.8 % de las obtenidas en mercados locales (Tabla 6). De manera general, *S. enterica* fue más incidente en supermercados. El supermercado B y el mercado A mostraron los porcentajes más altos de incidencia (27.3 y 22.7 %, respectivamente); mientras que ni en el supermercado A ni en el mercado D se encontró *S. enterica* en ninguna de las muestras. De las muestras positivas totales (39 muestras) más de una colonia presuntiva se identificó, habiéndose aislado un total de 91 cepas de *S. enterica*. En un estudio similar realizado en jitomate Bola, se encontró *Salmonella* en 1.25 % de las muestras obtenidas en mercados (Cárdenas *et al.*, 2013). Por otro lado, Orozco *et al.* (2008b) reportaron una incidencia de 2.8 % de *S. enterica* en jitomate Bola cultivado en invernaderos mediante cultivo hidropónico. En otro estudio realizado en Filipinas se detectó *Salmonella* en 10 % de muestras de jitomate Roma colectadas en supermercados, y en 18 % de las obtenidas en mercados al aire libre (Vital *et al.*, 2014).

**Tabla 6. Presencia de *Salmonella enterica* en muestras de jitomate *cherry* obtenido de supermercados y mercados**

Tipo de establecimiento	Sitio de muestreo	P/n (%) <sup>a</sup> <i>Salmonella</i>
Supermercado 14.14 %	A	0/59 (0)
	B	12/44 (27.3)
	C	10/54 (18.5)
	D	7/48 (14.6)
Mercado local 7.81 %	E	5/22 (22.7)
	F	3/67 (4.5)
	G	2/33 (6.1)
	H	0/6 (0)

<sup>a</sup> Número de muestras positivas/ número total de muestras analizadas (porcentaje de muestras positivas)

### 5.3. Relación entre presencia de *S. enterica* y *E. coli*

La presencia de *Salmonella* en los alimentos se asocia a la contaminación de tipo fecal, que pudo haber ingresado de manera directa o indirecta. Para evidenciar este tipo de contaminación se lleva a cabo la cuantificación de *E. coli*, que es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, ampliamente distribuido en el intestino de humanos y animales de sangre caliente (Fernández-Escartín, 2008). Se ha establecido como un organismo “índice” o “marcador” para evidenciar la probabilidad de contaminación potencial con patógenos ecológicamente relacionados como son los patógenos entéricos Gram negativos que incluyen a *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. La detección de patógenos es costosa y tardada (Decal *et al.*, 2017), además, las bacterias patógenas en los alimentos generalmente están estresadas, se encuentran heterogéneamente distribuidas y en bajas concentraciones, dificultando su detección (López-Gálvez *et al.*, 2014). Por tanto, la cuantificación de microorganismos índice es de gran ayuda para evidenciar el riesgo de contaminación con bacterias de origen entérico (Fernández-Escartín, 2008).

En este trabajo, la detección de *S. enterica* concordó con la presencia de *E. coli* en 92 % de las muestras de manera global (306 muestras/ 333 muestras totales). Específicamente, en los frutos obtenidos de supermercados el porcentaje fue de 88 % y de los mercados de 98 %; por tanto, se considera que *E. coli* es un buen índice de *Salmonella* y un buen indicador de contaminación fecal en este alimento, en particular en el obtenido de mercados (Tabla 7). Este comportamiento es muy interesante, debido a que, los jitomates *cherry* en los supermercados se encuentran en condiciones de refrigeración (7 a 10 °C), lo que prolonga la vida de anaquel del producto. Sin embargo, esta condición de almacenamiento podría afectar el estado fisiológico de *E. coli* y favorecer la sobrevivencia de *Salmonella* en el jitomate. En contraste, los jitomates que se venden en los mercados se encuentran a temperatura ambiente, condición que podría favorecer la sobrevivencia de ambos microorganismos, aunque por un periodo más corto. En otros trabajos se ha estudiado la relación que existe entre *E. coli* y *Salmonella* en frutas y hortalizas. Orozco *et al.* (2008a) analizaron la relación que existía entre la presencia de *Salmonella* y *E. coli* como índice en jitomate Bola obtenido de invernaderos hidropónicos, y encontraron que existía una correlación entre ambos de 89 %.

**Tabla 7. Relación entre presencia de *S. enterica* y *E. coli* en jitomate *cherry***

Tipo de establecimiento (%)		<i>S. enterica</i>		
		Ausencia	Presencia	Total
Supermercados (88 %) <sup>a</sup>	<b>Ausencia</b>	173	25	198
	<b>Presencia</b>	3	4	7
	<b>Total</b>	176	29	205
Mercados (98 %) <sup>b</sup>	<b>Ausencia</b>	100	2	102
	<b>Presencia</b>	18	8	26
	<b>Total</b>	118	10	128

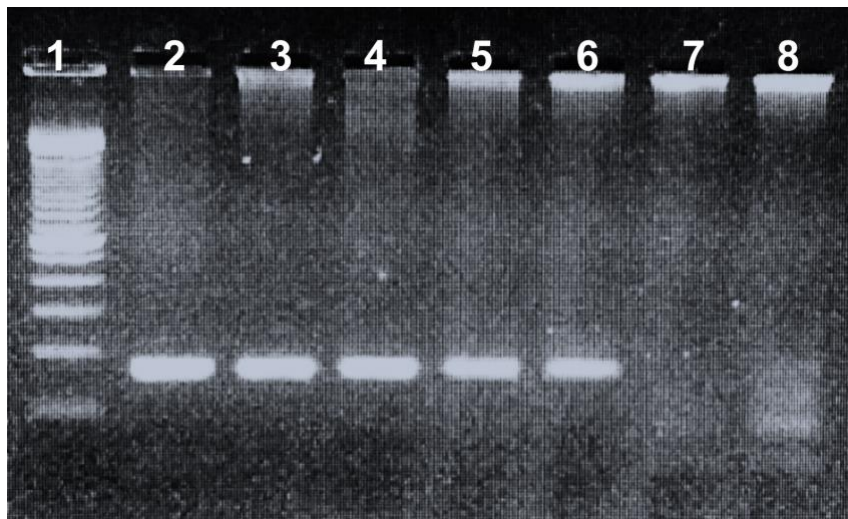
$$^a \text{Porcentaje de correlación} = \left( \frac{173 + 3 + 4}{205} \right) \times 100$$

$$^b \text{Porcentaje de correlación} = \left( \frac{100 + 18 + 8}{128} \right) \times 100$$

#### 5.4. Detección de VHA mediante RT-PCR

Partiendo de una concentración conocida de partículas virales de hepatitis A (VHA), se llevaron a cabo diluciones decimales y se llevó a cabo la detección mediante RT-PCR, se encontró que el protocolo puede detectar hasta una partícula viral. Considerando las bajas concentraciones infectivas de VHA (10-100 partículas), contar con un protocolo que permita detectar una partícula viral es satisfactorio. En la Figura 4, se observa como a medida que va aumentando la concentración de ARN de VHA, se va intensificando el tamaño de la banda.

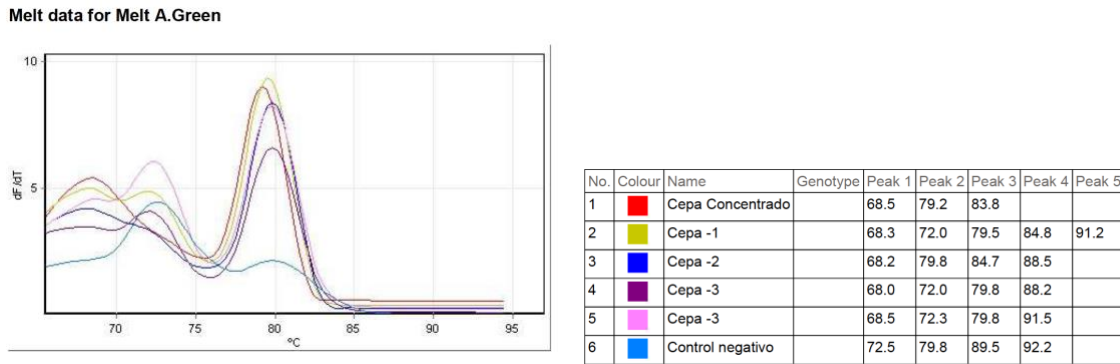
Por todo lo anterior, se puede concluir que el protocolo esta estandarizado para ser aplicado en matrices alimentarias cuando la concentración de ARN viral es baja (>100 partículas virales). Diversos protocolos de detección de patógenos virales se han desarrollado, empleando tanto metodología de RT-PCR, así como RT-qPCR; el uso tanto de Sybr Green I, como de sondas marcadas con fluoróforos han permitido aumentar la especificidad de los protocolos. El siguiente paso, es probar la detección y cuantificación de partículas virales mediante RT-qPCR.



**Figura 4.** Gel de productos de amplificación mediante RT-PCR para detección de partículas virales de VHA. Pozo 1: Marcador de peso molecular (100 pb); pozo 2:  $10^3$  VHA; pozo 3:  $10^2$  VHA; pozo 4:  $10^1$  VHA; pozos 5 y 6:  $10^0$  VHA; pozo 7: control negativo (concentración de iniciadores a 150 nmol); pozo 8: control negativo (concentración de iniciadores a 200 nmol)

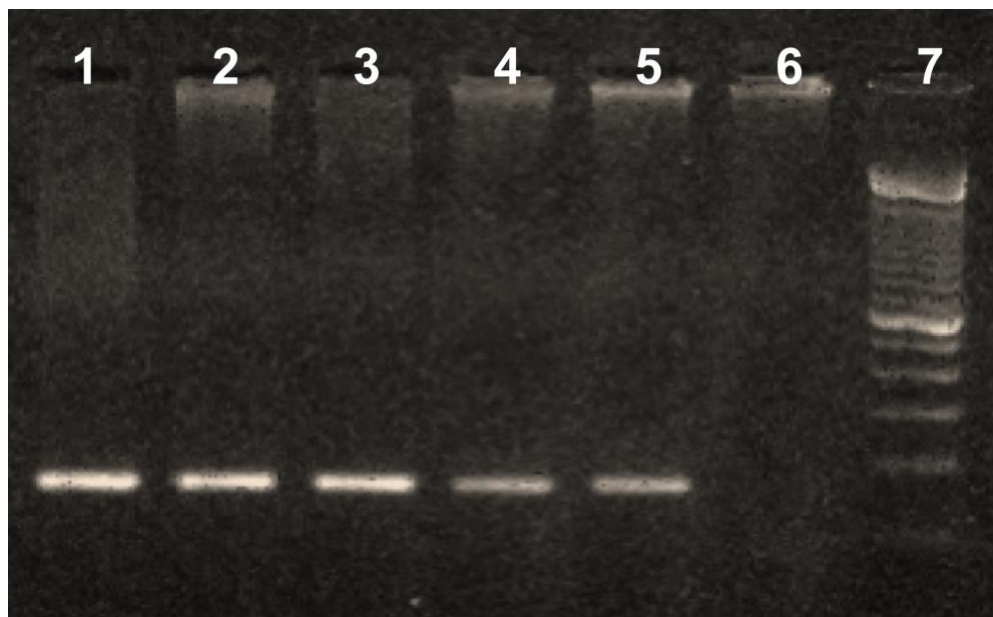
## 5.5. Detección de VHA mediante RT-qPCR

Los resultados de la optimización del protocolo para la detección de VHA se muestran en el apéndice 8.2. La concentración de iniciadores que mostró mejores resultados fue 150 nM y las condiciones finales de RT-qPCR fueron: 55 °C por 30 m de retrotranscripción, 95 °C por 5 m seguido de 40 ciclos de 95 °C por 5 s, 54 °C por 10 s y 54 °C por 10 s, y al final un aumento de temperatura de 65 °C hasta 95 °C. Para confirmar la especificidad de los iniciadores en las condiciones previamente señaladas se corrieron muestras de diluciones de VHA de referencia y se incluyó un control negativo (agua libre de nucleasas). En la Figura 5 se muestran los resultados después de la reacción de RT-qPCR, en donde se observa que las diluciones de la cepa de referencia de VHA muestran un pico importante en la temperatura  $79.5\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ , lo que confirmó la especificidad de los iniciadores. En la misma imagen, el control negativo, así como todas las diluciones de la cepa de referencia presentaron un pequeño pico en  $72.5\text{ °C}$  que puede deberse a la formación de dímeros de iniciadores.



**Figura 5.** Temperatura de disociación de los productos de amplificación de VHA mediante RT-qPCR

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa y se observó la presencia de una banda de 172 pb, lo que confirmó la detección del virus (Figura 6).



**Figura 6.** Gel de los productos de amplificación de RT-qPCR para la detección de partículas virales de VHA. Pozo 1:  $10^3$  VHA; pozo 2:  $10^2$  VHA; pozo 3:  $10^1$  VHA; pozos 4 y 5:  $10^0$  VHA; pozo 6: control negativo; pozo 7: Marcador de peso molecular (100 pb)

Una vez estandarizado el protocolo para la detección de VHA mediante RT-qPCR se llevó a cabo la detección del virus en muestras de jitomate colectadas en puntos de comercialización. De las 112 muestras analizadas, tres resultaron positivas para VHA (Tabla 8); es decir, la incidencia de VHA en jitomate *cherry* es de 2.7 %, lo que implicaría que, de cada 100 consumidores, tres estarían expuestos al virus y podrían llegar a desarrollar la enfermedad. Si estos resultados se analizan en función del tipo de establecimiento los jitomates que se obtuvieron del supermercado fueron los positivos al virus, es decir, la incidencia de VHA en este tipo de establecimiento fue de 5.4 %. Los jitomates *cherry* analizados según se indicaba en el empaque se cultivaron de manera orgánica, sería importante conocer las prácticas de producción y manejo del jitomate para poder dilucidar en qué punto se contaminó el producto. Otro resultado sorprendente fue que en las muestras positivas para VHA, también se detectó la presencia de *S. enterica*. Estos resultados son alarmantes ya que el consumidor está expuesto a ambos tipos de patógenos cuando ingiere jitomate *cherry* crudo, que es la forma habitual de consumo del fruto.

**Tabla 8. Incidencia de VHA en jitomate *cherry* en punto de comercialización**

Tipo de establecimiento	P/n <sup>a</sup>	Incidencia (%)
Supermercado	3/56	5.4
Mercado	0/56	0.0

<sup>a</sup> Número de muestras positivas/número total de muestras analizadas

En México, Felix-Valenzuela *et al.* (2012) analizaron hortalizas de acuerdo a la temporada de cosecha (cilantro, cebolla verde, lechuga, zanahoria, chile jalapeño y coliflor). De las 46 muestras, 13 (28.2 %) resultaron positivas para VHA, 15 (32.6 %) para Norovirus y 6 (13.0 %) para Rotavirus. Un total de 23 muestras estaban contaminadas con al menos uno de los virus. Un total de 11 muestras (22 %) fueron positivas para dos virus, mientras que ninguna de ellas tuvo tres virus simultáneamente. Así, Parada-Fabián *et al.* (2016) analizaron 134 muestras de alimentos perecederos y alimentos procedentes de la pesca para la detección de Norovirus, Rotavirus y VHA por amplificación de regiones conservadas de estos virus. De las 134 muestras analizadas, 14 fueron positivas para VHA, 6 para Norovirus y 11 para Rotavirus, confirmando el papel de las hortalizas y los bivalvos moluscos como vehículos transmisores de virus entéricos.

Considerando lo anterior, en México, la información relacionada con la presencia y epidemiología de virus en alimentos es escasa; se requiere contar con protocolos estandarizados de detección de patógenos virales considerando a los principales agentes etiológicos (VHA, norovirus y rotavirus). Ahora se reconoce el alto impacto económico de los casos de gastroenteritis y brotes causados por estas infecciones, siendo la prevención de estas enfermedades uno de los principales objetivos de los programas de salud (Santosham *et al.*, 2010).

La presencia de virus en alimentos podría deberse a la falta de instalaciones adecuadas para una higienización eficiente y prácticas de higiene insuficientes.

Dado que, estos productos se consumen sin ningún tratamiento como lo dicta la nueva cultura alimentaria, el riesgo no se cancela (El-Senousy *et al.*, 2015).

En México todavía existen malas prácticas en el riego de cultivos hortofrutícolas debido al uso de aguas residuales y fertilizantes orgánicos no procesados (Mattison *et al.*, 2007). Algunas sugerencias para evitar la contaminación de hortalizas por virus son la aplicación de buenas prácticas de higiene, evitar la rotación de personas para trabajar en el manejo de alimentos y el uso de agua tratada para riego (Hida *et al.*, 2013).

#### **5.6. Eficacia de la desinfección en la inactivación de *S. enterica* en jitomate *cherry***

La evaluación de la desinfección de jitomate *cherry*, requiere una especial atención, ya que la principal forma de consumo es en fresco y la desinfección química es el tratamiento más frecuente que se aplica previo a su consumo. Por su tipo de cultivo (primariamente orgánico), la llegada de patógenos al fruto no se descarta, siendo *Salmonella* el que cobra importancia en diversas variedades de jitomate. Conocer la efectividad de los tratamientos de desinfección que se aplican a los frutos, incluido el jitomate *cherry*, es necesario para saber en qué medida se puede minimizar el riesgo asociado al consumo de los productos. Incluir en la evaluación el estudio de factores que pueden intervenir en su efectividad como la presencia de biopelículas o el tipo de cepa o serotipos de esta bacteria es un aporte importante. Desafortunadamente la información disponible en relación a los métodos de descontaminación química que se aplican a jitomate *cherry* es muy escasa.

En este trabajo se evaluaron las concentraciones máximas de los desinfectantes que permite la FDA para la desinfección de frutas y hortalizas. En el caso de cloro fue de 200 ppm y del ácido peracético de 80 ppm; el desinfectante a base de extractos de cítricos se utilizó a la concentración recomendada por el proveedor (0.02 %). Se evaluó el efecto del tipo de cepa y de la presencia de



biopelículas en la superficie del fruto, en la efectividad de los desinfectantes. En relación al tipo de cepas se emplearon dos mezclas: una compuesta por cepas aisladas de jitomate *cherry* en este estudio y podrían estar mejor adaptadas el producto; y otra compuesta por cepas de referencia (ATCC).

La población de *S. enterica* en los jitomates *cherry* cuando se aplicó el inóculo con las cepas ATCC previo a la aplicación de los desinfectantes fue en promedio de 6.4 log UFC/g cuando se aplicó el inóculo con las cepas ATCC y de 6.5 log UFC/g para la mezcla de cepas aisladas de jitomate *cherry*. El análisis de varianza mostró que, de los dos factores estudiados, el tipo de desinfectante tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). La interacción entre desinfectante y el tipo de mezcla de cepas, no resultó significativa (Tabla 9). La efectividad de los tres desinfectantes para inactivar a *S. enterica* inoculada en la superficie del fruto fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) (Tabla 10).

**Tabla 9. Análisis de varianza efectuado a la desinfección sobre células inoculadas de *S. enterica***

Factor	F	Valor de P
Tipo de desinfectante (A)	50.51	<0.0001*
Tipo de mezcla de cepas (B)	1.17	0.28
Interacción A*B	2.82	0.61

Los desinfectantes que mayor efecto tuvieron, tanto sobre la mezcla de cepas de referencia como sobre las aisladas de jitomate fueron el hipoclorito de sodio y el ácido peracético. La reducción observada con la aplicación de hipoclorito de sodio sobre las cepas de referencia y las aisladas de jitomate fue de 5.4 y 4.6 log UFC/g, respectivamente; mientras que con el ácido peracético la reducción fue menor en las cepas (Tabla 10).

La aplicación de agua (control de arrastre) desprendió menos de un log de UFC de *Salmonella*; es decir, un lavado común no influye de manera importante para reducir el riesgo de la presencia de esta bacteria en el fruto. Sin embargo, es necesario para evitar interferencia de la suciedad/materia orgánica en el proceso de desinfección. La aplicación del desinfectante a base de extractos de semillas de cítricos tuvo menores reducciones con respecto a los otros desinfectantes (2.5 log UFC/g en cepas de referencia y 2.2 log UFC/g en cepas aisladas).

**Tabla 10. Efectividad de diversos desinfectantes aplicados en la superficie de jitomate *cherry* en la inactivación de *S. enterica***

Tratamiento	Cepas de referencia		Cepas aisladas	
	Sobrevivientes	Reducción	Sobrevivientes	Reducción
	log UFC/g		log UFC/g	
Hipoclorito de sodio [200 ppm]	0.98 ± 0.72 <sup>C</sup>	5.43	1.90 ± 1.50 <sup>B</sup>	4.63
Ácido peracético [80 ppm]	1.71 ± 1.85 <sup>C</sup>	4.70	1.71 ± 1.76 <sup>B</sup>	4.82
Extracto de cítricos [0.02 %]	3.93 ± 1.07 <sup>B</sup>	2.48	4.33 ± 1.11 <sup>A</sup>	2.20
Agua destilada estéril	5.84 ± 0.67 <sup>A</sup>	0.57	5.78 ± 0.47 <sup>A</sup>	0.75

Datos expresados como la media ± desviación estándar (DE) (n=3). Los valores de las medias seguidos de letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0.05) aplicando la prueba de Tukey.

En diversos estudios se ha evaluado la efectividad de diversos desinfectantes para inactivar microorganismos patógenos en jitomate. En general, las reducciones que se reportan oscilan entre los 3 y 5 log UFC/g. Beuchat *et al.* (2001) evaluaron el efecto de cloro (200 ppm) y de un producto (Fit) que ejercía una doble función, como detergente y agente desinfectante contra *Salmonella* inoculada en superficie de jitomate rojo bola. Las reducciones que observaron fueron de 3.0 log para el cloro y 6.9 log para Fit. Otro estudio en donde se empleó la misma variedad de jitomate demostró que la formación de una biopelícula de *S.*

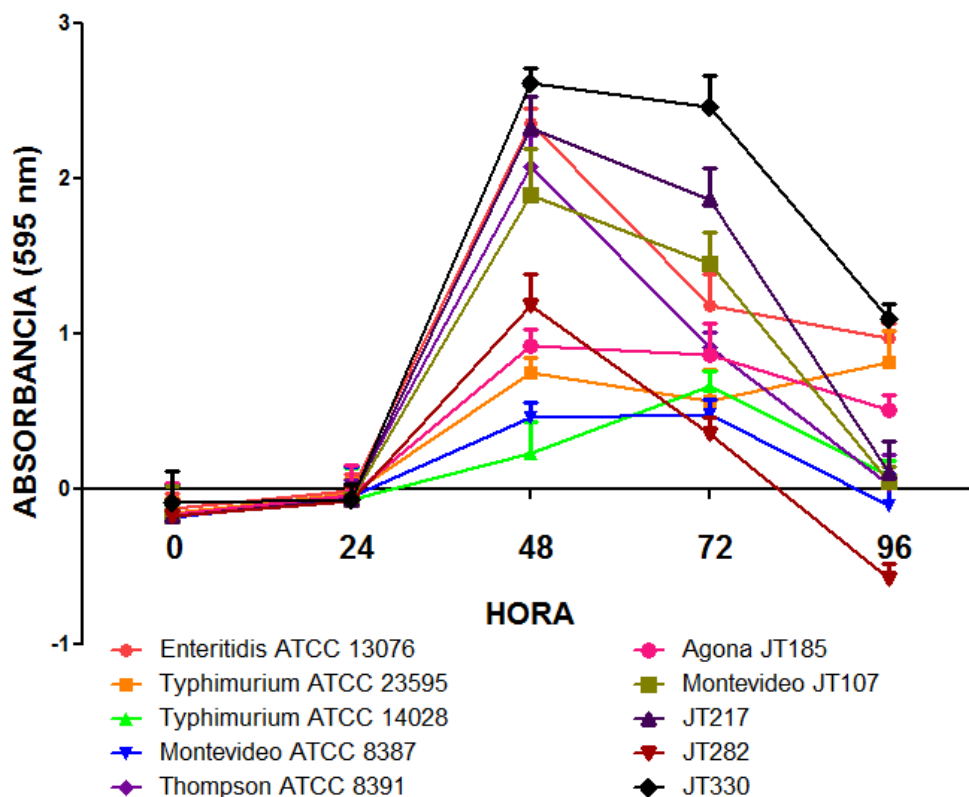
Montevideo reduce el efecto del desinfectante (cloro a 200 ppm) durante el almacenamiento del fruto a 22 y 30 °C durante 10 días (Iturriaga *et al.*, 2008).

Sao José *et al.* (2012) evaluaron la efectividad de la aplicación de desinfectantes químicos en combinación con ultrasonido en la inactivación de *S. Typhimurium* inoculada en jitomate *cherry*, concluyendo que los tratamientos no lograron reducir significativamente la población de *Salmonella*, ya que la aplicación de hipoclorito de sodio (200 ppm) sólo logró reducir 0.4 log UFC/g, mientras que el ácido peracético (40 ppm) redujo 2.7 log UFC/g.

### **5.7. Eficacia de la desinfección química en la inactivación de *Salmonella* inmersa en biopelículas formadas en la superficie de jitomate *cherry***

Una biopelícula consta de aproximadamente 15 % de células y 85 % de matriz de exopolímeros; dentro de estos últimos, se encuentran carbohidratos neutrales y polianiónicos (ácidos urónicos). La absorbancia de una biopelícula, medida como la reducción de la intensidad de un haz de luz transmitido a través de la película se correlaciona con su masa (Poimenidou *et al.*, 2016).

Cabe recordar que se evaluaron diez cepas de *S. enterica in vitro* con el fin de seleccionar aquellas con la capacidad para formar biopelículas a las 48 h. Para ello se inocularon en placas, se propició la formación de biopelículas y se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de polímeros formados. A partir de 48 h se pudo observar valores de absorbancia más altos, asumiendo que se pueden estar formando polímeros (Figura 7). Las cepas JT330, JT217, Montevideo JT107, ATCC 8387 y Enteritidis ATCC 13076 obtuvieron los valores más altos de absorbancia a las 48 h, siendo los serovares Typhimurium y Thompson los que tuvieron los valores más bajos. Sin embargo, a las 72 h empezaron a descender los valores de absorbancia de todas las cepas, hasta observar valores muy bajos a las 96 h.



**Figura 7.** Cantidad de biopolímeros producidos por cepas de *S. enterica* en placas incubadas a 25 °C durante 96 h

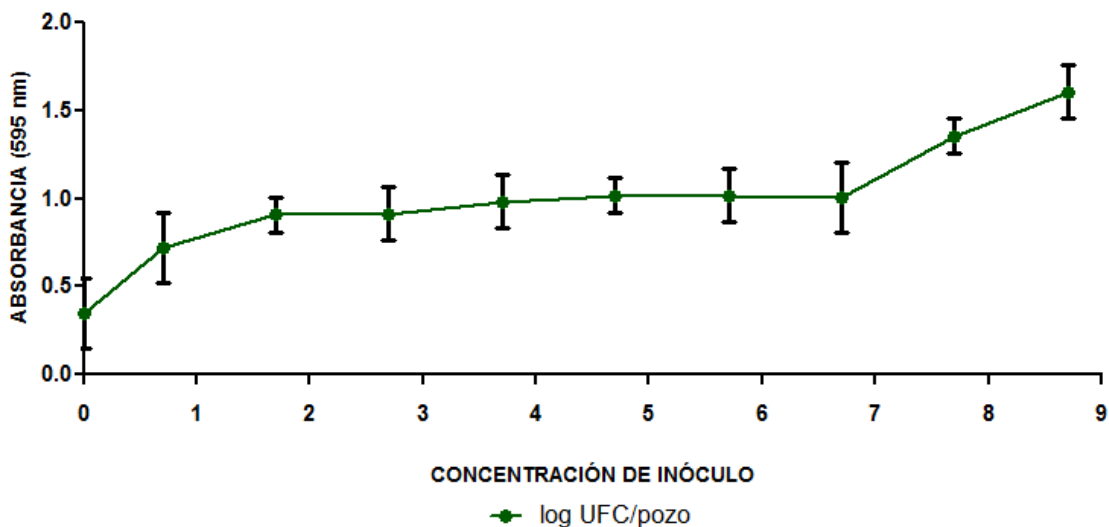
Mediante el análisis *in vitro* en microplacas, se pudo seleccionar a las cepas con mayor capacidad para formar biopelículas que se probarían directamente en jitomate. Con este criterio se seleccionaron las cepas de *S. enterica*: JT330, JT217, Montevideo JT107, Thompson ATCC 8391 y Enteritidis ATCC 13076 para la inoculación del fruto para los experimentos ulteriores.

Diez-García *et al.* (2012), evaluaron 69 cepas pertenecientes a 10 serotipos de *S. enterica* (Typhimurium, Newport, Paratyphi B, Poona, Derby, Infantis, Enteritidis, Virchow, Agona y Typhi), con el propósito de determinar su capacidad para producir biopelículas. Observaron que todas las cepas produjeron biopelículas en placas de micropocillo de poliestireno mediante el ensayo de cristal violeta. Clasificaron las cepas como débiles productoras de biopelículas (35 cepas), moderadas (22) o fuertes (12). La formación de biopelículas por *Salmonella* en el

poliestireno constituye un tema de preocupación porque los materiales plásticos se utilizan con frecuencia en instalaciones de alimentos.

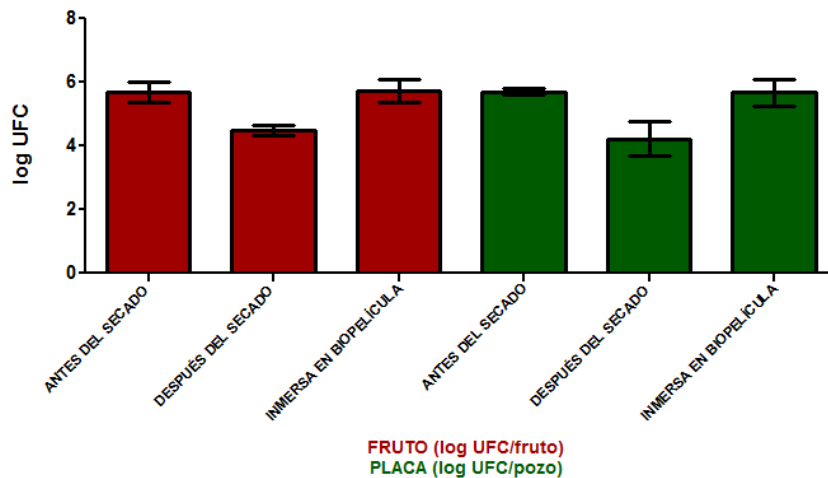
Iturriaga *et al.* (2010) mostraron que a 22 °C y 97 % de HR, se desarrollan biopelículas de *S. Montevideo* a los 10 días de almacenamiento de jitomate bola. Además, demostraron que la efectividad del cloro libre (1000 y 200 mg/L) disminuía conforme pasaban los días de incubación.

Para determinar el nivel de inóculo que se aplicaría sobre la superficie del fruto que garantizara la formación de la biopelícula, se inoculó en una placa la mezcla de cepas de *Salmonella* seleccionada para los estudios en el fruto, en concentraciones que fueron desde 0 hasta 9 log. Se observó una relación directamente proporcional entre la cantidad de inóculo y la cantidad de polímeros producidos después de 72 h de incubación (Figura 8). Con base en estos resultados se decidió que los jitomates se inocularían con aproximadamente 5 log UFC/mL.



**Figura 8.** Formación de biopolímeros de *S. enterica* en función de la cantidad de inóculo en placas incubadas a 25 °C durante 72 h

Los jitomates *cherry* se inocularon con 5.7 log UFC/fruto, y después de 72 h de incubación de los frutos la población de *Salmonella* se mantuvo viable (5.7 log UFC/fruto) (Tabla 11) . Paralelamente, se inoculó una placa con la misma cantidad de células con la que se inocularon los jitomates, se sometieron a secado y se almacenaron bajo las mismas condiciones que los jitomates. El incremento en la población después de 72 h de almacenamiento fue similar al observado en el fruto (5.7 log UFC/pozo).



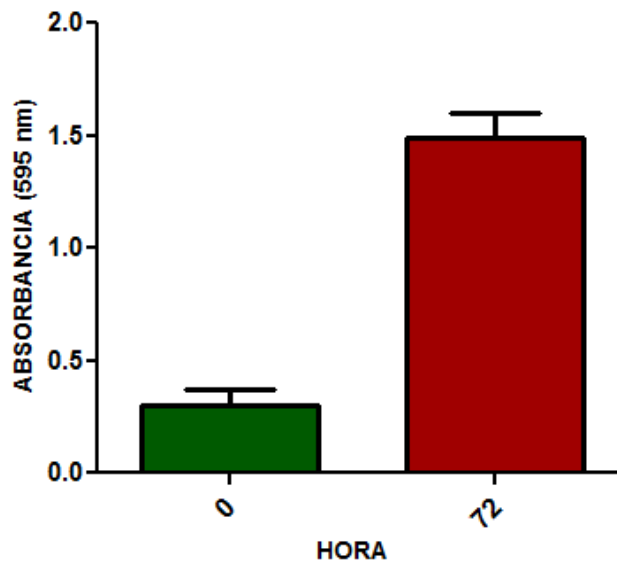
**Figura 9.** Cuantificación de *S. enterica* en la superficie del fruto y en placa incubadas bajo las mismas condiciones (T: 25 °C; t: 72 h; HR 97 %)

**Tabla 11. Cuantificación de *S. enterica* en la superficie de jitomate *cherry***

Condición	Log UFC/fruto	Log UFC/g
Fruto		
Antes del secado	5.69 ± 0.32 <sup>A</sup>	4.60 ± 0.26 <sup>A</sup>
Después del secado	4.49 ± 0.16 <sup>B</sup>	3.37 ± 0.18 <sup>B</sup>
Después de 72 h de almacenamiento	5.71 ± 0.36 <sup>A</sup>	4.60 ± 0.36 <sup>B</sup>
Placa		
	Log UFC/pozo	Absorbancia
Antes del secado	5.70 ± 0.22 <sup>A</sup>	N/A
Después del secado	4.22 ± 0.57 <sup>B</sup>	0.30 ± 0.07 <sup>B</sup>
Después de 72 h de almacenamiento	5.66 ± 0.37 <sup>A</sup>	1.49 ± 0.11 <sup>A</sup>

<sup>a</sup>Datos expresados como la media ± DE (n = 3). Los valores de las medias seguidos de letras diferentes expresan diferencias significativas (P < 0.05) aplicando la prueba de Tukey. N/A: No aplica

Además de cuantificar la cantidad de células de *Salmonella* en los pozos de la placa también se cuantificó la cantidad de polímeros que se formó. Los resultados de la medición de la absorbancia a las 0 y 72 h de incubación se muestran en la Figura 7. Un aumento en la absorbancia indica la formación de polímeros. Con estos ensayos se puede inferir, que en el fruto hay un incremento en el número de células y probablemente se están produciendo los polímeros.



**Figura 10.** Formación de biopolímeros de *S. enterica* en placas incubadas bajo las mismas condiciones que el jitomate *cherry* (T: 25 °C; t: 72 h; HR 97 %). Los datos representan la media de 32 valores  $\pm$  DE

Los resultados de la evaluación de los desinfectantes para inactivar a *S. enterica* inmersa en una biopelícula desarrollada en la superficie de jitomate *cherry* se presenta en la Tabla 12. La disminución en la efectividad de los desinfectantes fue notoria en relación al efecto que se observó cuando se aplicaron los desinfectantes sobre las células de *Salmonella* únicamente inoculadas en la superficie del fruto (Tabla 10). Se observaron diferencias estadísticas significativas entre hipoclorito de sodio y extracto de cítricos; como era de esperarse el agua no presentó un efecto significativo contra la biopelícula (0.9 log UFC/g). Cabe resaltar que el efecto del desinfectante a base de extracto de cítricos mostró un valor mayor

(3.2 log UFC/g) en biopelículas de *Salmonella* en relación con células simplemente inoculadas (2.5 log UFC/g).

**Tabla 12. Efecto de desinfectantes contra *S. enterica* inmersa en biopelículas formadas en la superficie de jitomate *cherry***

Desinfectantes	Log UFC/fruto		Log UFC/g	
	Sobrevivientes	Reducción	Recuperación	Reducción
Hipoclorito de Sodio [200 ppm]	1.96 ± 0.71 <sup>C</sup>	3.75	0.81 ± 0.72 <sup>C</sup>	3.79
Ácido peracético [80 ppm]	3.01 ± 0.93 <sup>B</sup>	2.7	1.85 ± 1.06 <sup>B</sup>	2.75
Extracto de cítricos [2000 ppm]	2.49 ± 0.46 <sup>BC</sup>	3.22	1.36 ± 0.75 <sup>BC</sup>	3.24
Agua	4.71 ± 0.65 <sup>A</sup>	1	3.71 ± 0.47 <sup>A</sup>	0.89

<sup>a</sup> Datos expresados como la Media ± DE (n=3). Las medias seguidas de letras diferentes expresan diferencias significativas (P<0.05) aplicando la prueba de Tukey

Rodrigues *et al.* (2011) evaluaron la susceptibilidad de biopelículas de *S. enterica* a cuatro desinfectantes mediante ensayos en placas de 96 pozos: hipoclorito de sodio (800 ppm), cloruro de benzalconio (800 ppm), peróxido de hidrógeno (90 mg/mL) y triclosán (4000 mg/mL). Los resultados mostraron que hipoclorito de sodio inactivó la población de la biopelícula, mientras que el triclosán tuvo el peor desempeño. Cabe señalar que las concentraciones empleadas en ese estudio superan el límite máximo permitido para frutas y hortalizas.

Singla *et al.* (2014) investigaron el efecto combinado del ácido málico y el ozono como desinfectante para inhibir la formación de biopelículas de *S. Typhimurium* en zanahoria y nabo. El ácido málico fue eficaz para la inhibición completa de la biopelícula en la zanahoria, pero se requirió de la combinación de ácido málico y de ozono para el nabo. El ácido málico también se ha probado en melón y espinacas, aunque el efecto no es destacado (< 1.5 log a concentración de 4 %) (Almasoud *et al.*, 2015).



La mayoría de los estudios hasta ahora reportados han probado la efectividad de desinfectantes contra biopelículas formadas después de 24 o 48 h. El estudio de Corcoran *et al.* (2014) demostró que existen diferencias significativas en la eficacia de algunas sustancias químicas (en este caso, hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y cloruro de benzalconio) cuando se probaron contra la biopelícula temprana (48 h) de *S. enterica* en comparación con la biopelícula madura (168 h). Aunque el hidróxido de sodio eliminó la biopelícula temprana, ninguno de los productos químicos probados incluso después de una exposición de 90 min eliminó la biopelícula madura, lo que sugiere que es necesario desarrollar estrategias que impidan la adherencia de patógeno y el desarrollo de la biopelícula. Un resultado similar fue reportado por Nguyen y Yuk (2013) con biopelículas de *S. Typhimurium* y compuestos de amonio cuaternario, ácido peroxiacético/ácidos orgánicos e hipoclorito de sodio como desinfectantes con biopelículas de 168 h; éstas fueron más resistentes que las biopelículas de 24/48 h.

## 6. CONCLUSIONES

- El contenido de los grupos indicadores encontrados en jitomate *cherry* resultó superior a lo reportado para otras variedades de jitomate y para otros frutos de la misma familia (pimiento morrón, chile serrano y chile jalapeño).
- La elevada carga microbiana encontrada en los jitomates *cherry*, particularmente en los mercados, podría explicarse por el hecho de que la comercialización en éstos se realiza a granel, haciéndolo susceptible a contaminarse de manera frecuente; la contaminación fecal (que puede ser humana y/o animal) también ocurre en este tipo de establecimientos, lo que se demuestra por la mayor presencia de *E. coli* encontrada.
- La incidencia de *S. enterica* en jitomate *cherry* fue sorpresivamente elevada, lo que pone de manifiesto el riesgo al que se enfrenta el consumidor, ya que el producto se consume primariamente en fresco. Es necesario revisar los controles que se implementan durante la cosecha y empaque del fruto, para minimizar el ingreso de patógenos al alimento.
- Es posible la detección por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa de una sola partícula viral.
- El VHA fue detectado sólo en las muestras colectadas en los supermercados.
- El tratamiento químico de desinfección más efectivo en jitomate *cherry* contra células inoculadas de *Salmonella* fue el hipoclorito de sodio (200

ppm) seguido del ácido peracético (80 ppm) y del producto a base de semillas de cítricos (0.02 %).

- El hipoclorito de sodio fue el único desinfectante que logró reducciones de al menos 5 log en jitomate *cherry* cuando se aplicó en células inoculadas de la mezcla de cepas de referencia, cifra establecida por la FDA para reconocer a un desinfectante eficaz.
- El orden de efectividad de los tratamientos químicos de desinfección en jitomate *cherry* contra *Salmonella* inmersa en biopelícula fue: hipoclorito de sodio (200 ppm) > extracto de cítricos (0.02 %) > ácido peracético (80 ppm).
- A pesar de que la desinfección se aplica para reducir la contaminación del jitomate después de la cosecha, los resultados de este trabajo demuestran bajas reducciones de *S. enterica* mediante la aplicación de desinfectantes químicos. Se requiere la implementación de tecnologías capaces de asegurar la inocuidad del fruto y que permitan la conservación de su calidad.
- La prevención de la contaminación del fruto es una labor compleja que involucra la correcta implementación del sistema de reducción de riesgos de contaminación y requiere la regularización de organizaciones gubernamentales.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abanyie, F., Harvey, R. R., Harris, J. R., Wiegand, R. E., Gaul, Desvignes-Kendrick, L. M., Irvin, K., Williams, I., Hall, R. L., Herwaldt, B. 2015. 2013 multistate outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infections associated with fresh produce: focus on the Texas investigations. *Epidemiology Infection*.:1–8.

Almasoud, A., Hettiarachchy, N., Rayaprolu, S., Horax, R., and Eswaranandam, S. 2015. Electrostatic spraying of organic acids on biofilms formed by *E. coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. *Food Research International*, 78:27-33.

Anderson, M. del R. P., Pascual, V. C. 1999. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España, 464 pp

Andrews, W. H., Hammack, T. 2016. *Salmonella*, chap. 5. In *Bacteriological analytical manual online*. U.S. Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> Consultado en noviembre, 2015

Anthony, E. F. 2004. Hepatitis A Transmitted by Food. *Clinical Infectious Diseases*. 200438705-15:11.

Archer, D. L., Young, F. E. 1988. Contemporary issues: diseases with a food vector. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:377-398

Arias Ríos, E. V. 2014. *Enterobacteriaceae, Escherichia coli y Salmonella spp como parámetros en la verificación de las prácticas sanitarias agrícolas durante el manejo poscosecha de hortalizas en empresas exportadoras*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. 112 pp.

Ascencio Álvarez, A. 2014. *Variabilidad genética para virulencia en (fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici (sacc.) Snyder y hansen (fol), fuentes de resistencia y forma de herencia en especies de Lycopersicon*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 43 pp.

Ávila-Quezada, G., Sánchez, E., Muñoz, E., Martínez, L. R., Villalobos, E.

2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México.

Avila-Vega, D. E., Álvarez-Mayorga, B., Arvizu-Medrano, S. M., Pacheco-Aguilar, R., Martínez-Peniche R., Iturriaga. M. H. 2014. Microbiological profile and incidence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on hydroponic bell peppers and greenhouse cultivation environment. *Journal of Food Protection*. 77:1904–1910.

Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., Ponder, M. 2013. Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 252-259.

Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., Breidt, F. 2009 in. Microbiological spoilage of fruits and vegetables, p. 135–183. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. Springer. 2009. Nueva York. EE. UU. 367 pp.

Benavides Barquero, H., Lazos Álvarez, J. Arias Puerta, J., Arias Segura, J., Etchepare, C., Segura, A., Trejos, R. J., de las Casas, P., Trejos, R. 1999. Estudio global para identificar oportunidades de mercado de frutas y hortalizas para los países de centroamérica. IICA, Guatemala (Guatemala)

Bennett, J. V., Jarvis, W. R., Brachman, P. S. 2007. *Bennett & Brachman's Hospital Infections*. Lippincott Williams & Wilkins.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*. 59:204–216.

Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G., 2008. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International Journal of Food Microbiology*. 126, 30–35.

Cabello, R. R. 2007. *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana.

Cabello, R. R., Benavente, I. F. H. 2002. *Síndrome diarreico infeccioso*. Ed. Médica Panamericana. Ciudad de México. México. 1725 pp.

Calvo, M. de la C. 2013. *Toxicología de los alimentos*. McGraw Hill Mexico.

Ciudad de México. México. 467 pp.

Cárdenas, C., Molina, K., Heredia, N., García, S. 2013. Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection*. 76:1475–1479.

Casteel, M. J., Schmidt, C. E., Sobsey, M. D. 2008. Chlorine disinfection of produce to inactivate hepatitis A virus and coliphage MS2. *International Journal of Food Microbiology*. 125:267–273.

Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Acevedo-Sandoval, O. A., González Ramírez, C. A., Villagomez-Ibarra, J. R., Hernández, N. C., Villarruel-López, A., Torres-Vitela, M. D. R. 2011. Frequency and behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on whole and sliced jalapeno and serrano peppers. *Journal of Food Protection* 74:874–881.

CDC. 2003. Vacunas para prevenir la hepatitis A y la hepatitis B. Cent. Para El Control Prev. Enfermedades. Disponible en:

<http://www.cdc.gov/spanish/udi/hepatitis/vaccines.pdf>. Consultado en noviembre 2015

CDC. 2013. CDC - Ciclosporiasis - Epidemiología y factores de riesgo. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/epi.html> Consultado en noviembre 2015

CDC. 2015a. Reports of selected Salmonella Outbreak Investigations 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>. Consultado en noviembre 2015

CDC. 2015b. CDC - Prevenga la propagación de norovirus. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/Norovirus/>. Consultado en noviembre 2015.

CDC. 2017. CDC- La seguridad de las frutas y verduras. Disponible en: <https://www.cdc.gov/Spanish/especialesCDC/SeguridadFrutasVerduras/index.html>. Consultado en: octubre 2017

Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., Archambault, M. 2017. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiology*, 62, 32-38.

Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 1507–1514.

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P., Perelle, S. 2015. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International Journal of Food Microbiology*. 201: 17–26.

Crim, S. M., Griffin, P. M., Tauxe, R., Marder, E. P., Gilliss, D., Cronquist, A. B., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K. 2015. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2006–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Rep. 64: 495–499.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science* 280: 295-298.

de Souza, E. L., Sales, C. V., de Oliveira, C. E., Lopes, L. A., da Conceição, M. L., Berger, L. R., Stamford, T. C. 2015. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. *Frontiers in Microbiology*. 6.

Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S. Temmam, S., Loutreul, J., Morin, T., Estienney, M. 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiology*. 32:48–56.

Decol, L. T., Casarin, L. S., Hessel, C. T., Batista, A. C. T., Allende, A., Tondo, E. C. 2017. Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. *Food Microbiology*. 65:105–113.

DGE. 2012. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las hepatitis virales. Dir. Gen. Epidemiol. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/12\\_2012\\_Manual\\_HepVirales\\_1novt12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/12_2012_Manual_HepVirales_1novt12.pdf). Consultado en noviembre del 2015

Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F., Farber, J. 2013. Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*. 76:307–313.

Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31-2: 173-180.

Donnan, E. J., Fielding, J. E., Gregory, J. E., Lalor, K., Rowe, S., Goldsmith, P., Antoniou, M., Fullerton, K. E., Knope, K., Copland, J. G. 2012. A multistate outbreak of hepatitis A associated with semidried tomatoes in Australia, 2009. *Clinical Infection Disease*. 54: 775–781.

El-Senousy, W. M., Ragab, A. M., Handak, E. M. 2015. Prevalence of rotaviruses groups A and C in Egyptian children and aquatic environment. *Food and Environmental Virology*, 7(2), 132–141.

Fernández-Escartín, E. 2008. *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. 2<sup>nd</sup> ed. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Fagundes, C., Pérez-Gago, M. B., Monteiro A. R., Palou, L. 2013. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 166:391–398.

Food and Agriculture Organization (FAO), D. de documentación, López Camelo, A. F. 2003. Capítulo 4 Aspectos higiénicos y sanitarios. Man. Para Prep. Venta Frutas Hortal. Campo Al Merc. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/agn/cdfruits\\_es/others/docs/maryland\\_manual.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/cdfruits_es/others/docs/maryland_manual.pdf). Consultado en noviembre del 2015.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2002. Alimentos inocuos y nutritivos para los consumidores. Disponible en: <http://www.fao.org/worldfoodsummit/sideevents/papers/y6656s.htm> Consultado en octubre del 2017.

Fayer, R., Xiao, L. 2007. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1 to 2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135: 105– 112



Felix-Valenzuela, L., Resendiz-Sandoval, M., Burgara-Estrella, A., Hernández, J., Mata-Haro, V. 2012. Quantitative Detection of Hepatitis A, Rotavirus and Genogroup I Norovirus by RT-qPCR in Fresh Produce from Packinghouse Facilities. *Journal of Food Safety*, 32-4: 467-473.

Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A. 2013. Bacteriological Analytical Manual Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Chapter 4. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>. Consultado en noviembre 2015

Fernández, A. M. C., Durán, E. M., Jiménez, M. R. 2012. Contaminantes biológicos: Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. España. 516 pp.

Finch, G. R. 1997. Effect of Various Disinfection Methods on the Inactivation of *Cryptosporidium*. American Water Works Association. Edmonton. Alberta. USA. 66 pp.

Flores, R., Owens, R. A., Taylor, J. 2016. Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus. *Curr. Opin. Virol.* 17: 87–94.

Food Safety. 2015. Disponible en: <http://www.foodsafety.gov/index.html> Consultado en noviembre 2015.

Forbes, B. A. 2009. Diagnostico Microbiologico. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 1026 pp.

Fratamico, P. M., Debroy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M. and Feng, P. 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 644.

Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A. M., Couturier, E., Carrillo-Santistevé, P., Pouey, J., Letort, M. J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S. 2011. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emergence Infection Disease*. 17: 566–7.

García Galván, S. G. 2015. Riesgo de enfermar asociado al consumo de lechuga expuesta a contaminación por *Salmonella*. Tesis de Maestría en Ciencia y

Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México. 92 pp.

Gandhi, M., Matthews, K. R. 2003. Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology. 87: 301–306.

Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., de Melo Franco, B. D. 2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. Frontiers in Microbiology, 7: 863-863.

Gosselin, A., Ayari, O., Erhioui, M. B., Papadopoulos, A., Dorais, M. 2001. Optimization of HPS supplemental lighting for greenhouse tomato. Acta Horticulturae. 548: 343–347.

Gracia, R. D. C. R., Zarain, P. L., Laguna, Y. M. 2006. Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero II. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México. 263 pp.

Greenberg Arnold, E., Clesceri Lenore, S. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> Edition. Pp.4-38,4-39. American Public Health Association, Washington. USA. 388 pp.

Greenspan, F. y Mackellar. 1948. FMC. Technical Bulletin 4, peracetic acid, 35 %. Analytical Chemistry. 20, 1061.

Guévremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C., Trottier, Y. L. 2006. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. Journal of Virological Methods, 134-1: 130-135.

Hall, A. J., Wikswa, M. E., Pringle, K., Gould, L. H., Parashar, U. D. 2014. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks-United States, 2009-2012. Morbidity and Mortality Weekly Report. 63:491–495.

Hassenberg, K., Geyer, M., Mauerer, M., Praeger, U., Herppich, W. B. 2017. Influence of temperature and organic matter load on chlorine dioxide efficacy on *Escherichia coli* inactivation. LWT-Food Science and Technology. 79: 349-354.

Hedberg, C. W., M. T. Osterholm. 2015. Foodborne outbreaks caused by

Cyclospora: the message is more important than the messenger. *Epidemiology and Infection*. 144-9: 1803-1803.

Helrich, K. 1990. *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. Virginia USA: Association of Official Analytical Chemists. Inc. 15: 785.

Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S. 2015. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *International Journal of Food Microbiological*. 202: 57–65.

Heredia, N., C. Caballero, C. Cárdenas, K. Molina, R. García, L. Solís, V. Burrowes, F. E. Bartz, A. F. de Aceituno, L.-A. Jaykus. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern México. *Journal of Food Protection*. 79: 1197–1209.

Hernandez, A. G. DRT. 2010. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Ed. Médica Panamericana. Madrid. España. 784 pp.

Hida, K., Kulka, M., Papafragkou, E. 2013. Development of a rapid total nucleic acid extraction method for the isolation of hepatitis A virus from fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 161-3: 143-150.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative microbiology*. Williams Wilkins Md. 71-84.

Huss, H. H. 1999. *Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros*. Food and Agriculture Organization. Copenhage. Dinamarca. 174 pp.

Jacobsen K. H., Wiersma S. T. 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*. 28: 6653–6657.

Jiménez, J. R. 2012. *Infectología clínica*. 2da. Edición. Editorial El Manual Moderno. León. México. 480 pp.

Kader, A. A. 2011. *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas*. UCANR Publications. Tercera Edición. California. USA. 584 pp.

Kumar, G. D., Williams, R. C., Al Qublan, H. M., Sriranganathan, N., Boyer, R. R., Eifert, J. D. 2017. Airborne soil particulates as vehicles for *Salmonella* contamination of tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 90-95.

Kwon, S. J., Chang, Y., Han, J. 2017. Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella enterica* and yeasts/molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 65, 114-121.

Lim, W., Harrison, M. A. 2016. Effectiveness of UV light as a means to reduce *Salmonella* contamination on tomatoes and food contact surfaces. *Food Control*. 66: 166-173.

Liu, T., Liljebjelke, K., Bartlett, E., Hofacre, C., Sanchez, S., Maurer, J. J. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *Journal of Food Protection*. 65: 1227–1232.

Lopez-Galvez, F., Allende, A., Pedrero-Salcedo, F., Alarcon, J. J., Gil, M. I. 2014. Safety assessment of greenhouse hydroponic tomatoes irrigated with reclaimed and surface water. *International Journal of Food Microbiology*. 191: 97–102.

Macías, A. 2010. Competitividad de México en el mercado de frutas y hortalizas de Estados Unidos de América. *Agroalimentaria* 16: 31–48.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S. 2012. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiology*. 31: 246–253.

Matthews, K. R. 2006. Microorganisms associated with fruits and vegetables. American Society of Microbiology. Washington. USA. 1-19 pp

Mattison, K., Karthikeyan, K., Abebe, M., Malik, N., Sattar, S. A., Farber, J. M. and Bidawid, S. 2007. Survival of calicivirus in foods and on surfaces: Experiments with feline calicivirus as a surrogate for norovirus. *Journal of Food Protection*. 70-2: 500–503.

Maturin, L., Peeler, T. 2001. Aerobic plate count, chap. 3. In U.S. Food and Drug Administration Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>. Consultado en noviembre 2015

Maunula, L., Von Bonsdorff, C. H. 2014. Emerging and re-emerging enteric

viruses causing multinational foodborne disease outbreaks. *Future Virology*. 9-3: 301-312.

Maya, C. 2004. *Horticultura de exportación y competencia global: el caso de la berenjena mexicana*. Plaza y Valdes. Ciudad de México. México. 245 pp.

Mei, S., Jan, B., Richard, N. 2013. *Perceptual and Actual Risks and How We Communicate Them. Managing Food Safety Risks in the Agri-Food Industries*. CRC Press. 189-208 pp.

Mexicana, N. O. 1994. *NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos*. Ciudad de México. México.

Morales-Rayas, R., Wolffs, P. F., Griffiths, M. W. 2009. Anion-exchange filtration and real-time PCR for the detection of a norovirus surrogate in food. *Journal of Food Protection*, 72-10: 2178-2183.

Morales-Rayas, R., Wolffs, P. F., Griffiths, M. W. 2010. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *International Journal of Food Microbiology*, 139-1: 48-55.

NCBI. 2016. Taxonomy browser (*Salmonella*). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=590&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Consultado en noviembre 2015.

Nguyen-The, C. 2012. Biological hazards in processed fruits and vegetables—Risk factors and impact of processing techniques. *LWT-Food Science and Technology*, 49-2: 172-177.

Nguyen, H.D.N., Yuk, H. 2013. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*. 29: 236–240.

OMS. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/es/>. Consultado: 10 de agosto del 2015

Orozco, L., Iturriaga, M., Tamplin, M., Fratamico, P. M., Call, J. E., Luchansky, J. B., Escartin, E. F. 2008a. Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. *Journal of Food Protection*. 71: 676–683.

Orozco, L., Rico-Romero, L., Escartin, E. F. 2008b. Microbiological profile of greenhouses in a farm producing hydroponic tomatoes. *Journal of Food Protection*. 71: 60–65.

Parada-Fabián, J. C., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, E. I. 2016. Identification of enteric viruses in foods from Mexico City. *Food and Environmental Virology*, 8-3: 215-220.

Phillips, C. A. 2016. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science & Technology*. 51-8: 1731-1743.

Piñeiro, M. 2007. Aplicacion de Programas Para El Mejoramiento de La Calidad E Inocuidad En La Cadena de Suministro de Frutas Y Hortalizas: Beneficios Y Desventajas - E. Food and Agriculture Organization.

Poimenidou, S. V., Chatzithoma, D. N., Nychas, G. J., Skandamis, P. N. 2016. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. *PloS one*. 11-10: e0165746.

Rathinasabapathi, B. 2004. Survival of *Salmonella* Montevideo on tomato leaves and mature green tomatoes. *Journal of Food Protection*. 67-10: 2277-2279.

Rivera, V. M. R. 2008. Bases de la Alimentación Humana. Netbiblo. La Coruña. España. 565 pp.

Richardson, S. D., Thurston, A. D. 1998. Disinfection By-Products and Chemical Contaminants in Disinfected Waters. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 58, Pp. S42-S42). 111 River St, Hoboken 07030-5774, Nj Usa: Wiley.

Rojas Reséndiz, A. L., Fernández-Escartín, E., Arias Ríos, E. V. 2010. Incidencia de Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* y *Salmonella* en espárragos, en su cultivo, lavado y desinfectado. Verano de la Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Querétaro. [www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2010/9VeranoCienciaUAQ/UAQRojasResendiz.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2010/9VeranoCienciaUAQ/UAQRojasResendiz.pdf)

Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H. and Azeredo, J.

2011. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microbial Drug Resistance*. 17-2: 181-189.

Saavedra, T. M., Figueroa, G. A., Cauhi, J. G. D. 2017. Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciência Rural*. 47-3.

Sair, A. I., D'Souza, D. H., Jaykus, L. A. 2002. Human enteric viruses as causes of foodborne diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(2), 73–89.

Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M. T., Sevillano, L., Martínez-Madrid, C., Romojaro, F., Flores, B. 2012. Aproximación proteómica al estudio de la respuesta diferencial del metabolismo energético al estrés por bajas temperaturas en tomate y pimiento. *Alicante. España*. 53: 131-131

Santosham, M., Chandran, A., Fitzwater, S., Fischer-Walker, C., Baqui, A. and Black, R. 2010. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *Lancet*, 376-9734: 63–67.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Base de datos pecuario 2000-2009 en línea. Disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do). Consultado en octubre 2017

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Base de datos pecuario 2000-2009 en línea. Disponible en: [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016). Consultado en octubre 2017

Silveira, A. c., Conesa, A., Aguayo, E., Artes, F. 2008. Alternative Sanitizers to Chlorine for Use on Fresh-Cut “Galia” (*Cucumis melo* var. *catalupensis*) Melon. *Journal of Food Science*. 73: M405–M411.

Singla, R., Goel, H., Ganguli, A. 2014. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 118-1: 34-40.

Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., Tauxe, R. V. 2004. Fresh

produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. 67-10: 2342-2353.

Speranza, B., Monacis, N., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. 2015. Approaches to Removal and Killing of *Salmonella* Spp. Biofilms. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41-1.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M. 2012. Extraction of foodborne viruses from food samples: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 153-1: 1-9.

Taurnas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A., Brandler, T. 2001. *Bacteriological Analytical Manual (BAM 8th Edition)*. Yeasts, Molds and Mycotoxins (Chapter 18). Food Drug Adm. Gaithersburg MD USA. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>. Consultado en noviembre 2015

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 2007. *Introducción a la microbiología*. 9na Edición. Editorial Acribia. Buenos Aires. Argentina. 988 pp.

USFDA, C. for F. S. and A. 1998. *Produce & Plant Products - Directivas para la Industria: Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, para Frutas y Hortalizas Frescas*. FDA u Food Drug Adm. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm188933.htm> Consultado en noviembre 2015.

USFDA/USDA/CDC. 1998. *Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables*. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM169112.pdf> Consultado en noviembre 2015

van Dyk, B. N., de Bruin, W., du Plessis, E. M., Korsten, L. 2016. Microbiological food safety status of commercially produced tomatoes from production to marketing. *Journal of Food Protection*. 79: 392–406.

Vital, P. G., Dimasuay, K. G. B., Widmer, K. W., Rivera, W. L. 2014. Microbiological quality of fresh produce from open air markets and supermarkets in the Philippines. *Science World Journal*. Vol. 14.

Wachtel, M. R., Whitehand, L. C., Mandrell, R. E. 2002. Association of



*Escherichia coli* O157: H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*. 65-1: 18-25.

Wei, C. I., Huang, T. S., Kim, J. M., Lin, W. F., Tamplin, M. L., Bartz, J. A. 1995. Growth and survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of Food Protection*. 58-8: 829-836.

Whitehead, K. A., Verran, J. 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*. 2: 84-91

Yúnez, A. 2012. Los grandes problemas de México. Tomo 11. Economía rural. El Colegio de Mexico AC. Ciudad de México. México. 196 pp.

Yun, J., Fan, X., Li, X., Jin, T. Z., Jia, X., Mattheis, J. P. 2015. Natural surface coating to inactivate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and maintain quality of cherry tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*. 193: 59–67.

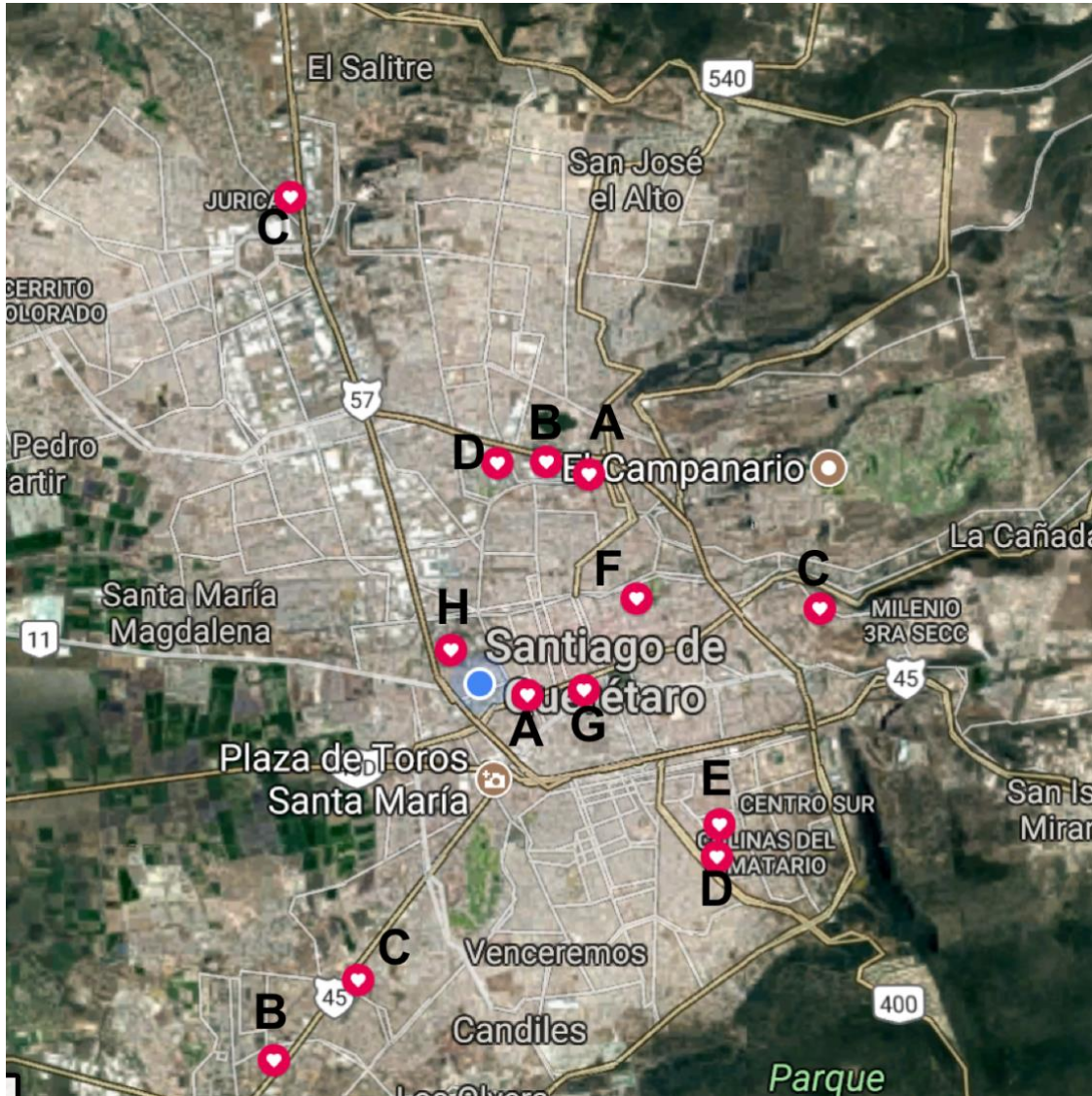
Zhuang, R., Beuchat, L. R., Chinnan, M. S., Shewfelt, R. L., Huang, Y. W. 1996. Inactivation of *Salmonella* Montevideo on tomatoes by applying cellulose-based edible films. *Journal of Food Protection*. 59: 808–812.

Zhuang, R. Y., Beuchat, L. R. 1996. Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella* Montevideo on tomatoes. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 97–100.

Zoellner, C., Venegas, F., Churey, J. J., Dávila-Aviña, J., Grohn, Y. T., García, S., Heredia, N., Worobo, R. W. 2016. Microbial dynamics of indicator microorganisms on fresh tomatoes in the supply chain from Mexico to the USA. *International Journal of Food Microbiology*. 238: 202–207.

## 8. APÉNDICE

### 8.1. Distribución geográfica del programa de muestreo



## 8.2. Determinación de cloro.

El procedimiento de determinación de cloro libre mediante la metodología propuesta por Greenberg *et al.* (1992) modificada se desarrolla a continuación:

- ✓ Colocado de 10 g de muestra a analizar en matraz Erlenmeyer
- ✓ Adición de ácido acético glacial hasta alcanzar pH de 4.5
- ✓ Adición de 0.4 mL de yoduro de potasio y agitar hasta coloración amarillo intenso
- ✓ Titulación con tiosulfato de sodio 0.01 N hasta color amarillo paja
- ✓ Adición de 1 mL de almidón y agitación hasta coloración azul
- ✓ Titulación hasta que vire a transparente y se mantenga por 30 s

Cálculos:

$$\text{Cloro disponible (ppm)} = \frac{VxNx3.55x10000}{M}$$

Donde:

V = Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (mL)

N = Normalidad del tiosulfato de sodio

M = Cantidad de muestra

### 8.3. Determinación de ácido peracético

Mediante metodología planteada por Greenspan y Mackellar (1948) se determinó el contenido de ácido peracético disponible como se describe a continuación:

- ✓ Adición de 10 mL de muestra a matraz Erlenmeyer con 50 mL de ácido sulfúrico 1.0 N
- ✓ Adición de dos gotas de ferroína
- ✓ Titulación con tiosulfato cérico 0.1 N hasta que persista la desaparición de color naranja por un minuto y registro del resultado.
- ✓ Adición de 10 mL de solución de yoduro de potasio y 2 mL de solución indicadora de almidón, agitado.
- ✓ Titulación con solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta que el color naranja original aparezca. Registro de valores consumidos.

Cálculos:

$$\% H_2O_2 = \frac{VxNx0.017x Fx100}{M}$$

Donde:

V = Volumen de sulfato cérico consumido en la titulación (mL)

N = Normalidad del sulfato cérico

F = Factor de dilución

M = Cantidad de muestra

Cálculos:

$$\% APA = \frac{VxNx0.038xFx100}{M}$$

Donde:

V = Volumen de tiosulfato de sodio consumido en la titulación (mL)

N = Normalidad del tiosulfato de sodio

M = Cantidad de muestra

F = Factor de dilución