



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Detección de Salmonella spp. y Listeria monocytogenes en  
frutas y verduras ecológicas mediante técnicas clásicas y  
moleculares.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ferris Pla, Sara

Tutor/a: Montes Estellés, Rosa M<sup>a</sup>

Cotutor/a: Botella Grau, M<sup>a</sup> Salud

Director/a Experimental: GARCIA FERRUS, MIGUEL

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural

*Universitat Politècnica de València*

*Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural*

**Trabajo de Fin de Grado**

*Grado en Biotecnología*

*Curso académico 2021-2022*

**Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*  
en frutas y verduras ecológicas mediante técnicas  
clásicas y moleculares**

**Autor del proyecto:** Dña. Sara Ferrís Pla

**Tutor académico:** Dra. Rosa M<sup>a</sup> Montes Estellés

**Cotutor académico:** Dra. Salut Botella Grau

**Director experimental:** D. Miguel García Ferrús

**Valencia, julio de 2022**

## TÍTULO

---

**Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en frutas y verduras ecológicas mediante técnicas clásicas y moleculares.**

## RESUMEN

---

La agricultura ecológica es un modelo de producción alimentaria sostenible que minimiza la generación de sustancias tóxicas y contaminantes que se liberan al entorno, además de permitir la obtención de alimentos saludables y la protección del medio ambiente.

La agroecología ha experimentado un crecimiento enorme en los últimos años, siendo las frutas y verduras orgánicas los alimentos ecológicos más demandados en todo el mundo. Sin embargo, se deben estudiar los riesgos microbiológicos y la seguridad de estos productos frescos, ya que la probabilidad de que estén contaminados por agentes patógenos, que pueden causar toxiinfecciones alimentarias, puede verse incrementada.

La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas, producidas por bacterias gram negativas del género *Salmonella*. La listeriosis es también una enfermedad de transmisión alimentaria producida por una bacteria gram positiva denominada *Listeria monocytogenes*. Ambos tipos de bacterias están frecuentemente asociadas a frutas y hortalizas crudas.

En este trabajo se ha estudiado la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en frutas y verduras orgánicas de venta al público por métodos culturales basados en las normas UNE-EN ISO, y métodos moleculares utilizando un termociclador PCR en tiempo real (qPCR) denominado Rotor-Gene® Q, empleando el sistema ASSURANCE® GDS (Genetic Detection System) de la empresa Merck.

Mediante las técnicas de cultivo clásicas, no se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las 35 muestras analizadas, sin embargo, empleando las técnicas moleculares, sí se detectó *Salmonella* spp. en una de ellas. No se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras a través de ninguno de los dos métodos, pero sí la presencia de otras especies del género *Listeria* (*Listeria grayi* y *Listeria seeligeri*) en 9 de las muestras por técnicas de cultivo y, solamente en 2 de ellas, también por técnicas moleculares.

## PALABRAS CLAVE

---

Detección; *Salmonella* spp.; *Listeria* spp.; *Listeria monocytogenes*; frutas; verduras; ecológico; riesgo microbiológico; seguridad alimentaria; técnicas de cultivo; qPCR.

**Autor del proyecto:** Dña. Sara Ferrís Pla

**Tutor académico:** Dra. Rosa M<sup>a</sup> Montes Estellés

**Cotutor académico:** Dra. Salut Botella Grau

**Director experimental:** D. Miguel García Ferrús

**Valencia, julio de 2022**

## TITLE

---

**Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in organic fruits and vegetables using classical and molecular techniques.**

## ABSTRACT

---

Organic farming is a model of sustainable food production that minimizes the generation of toxic and polluting substances which are released into the atmosphere, in addition to allowing the production of healthier food and the protection of the environment.

Agroecology has experienced an enormous growth in recent years, with organic fruits and vegetables being the most demanded eco-friendly foods in the world. However, the microbiological risks and safety of these fresh products must be studied, since the probability that they are contaminated by pathogenic agents that can cause food poisoning may be increased.

Salmonellosis is one of the most common and widespread foodborne diseases, caused by gram-negative bacteria of the genus *Salmonella*. Listeriosis is also a foodborne illness caused by a gram-positive bacteria named *Listeria monocytogenes*. Both types of bacteria are frequently associated with raw fruits and vegetables.

In this project, a study on the presence/absence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in organic fruits and vegetables for sale to the public has been carried out. The detection of these microorganisms has been done through cultural methods based on the UNE-EN ISO standards. To compare the results obtained using standardized culture techniques, the same samples have been analyzed as well with a real-time PCR thermocycler named Rotor-Gene® Q, using the ASSURANCE® GDS system (Genetic Detection System) from the Merck company.

Using classical culture techniques, the presence of *Salmonella* spp. was not detected in any of the 35 samples analyzed. However, using molecular techniques, *Salmonella* spp. was noticed in one of them. The presence of *L. monocytogenes* was not detected in none of the samples through either method, but the presence of other species of the genus *Listeria* (*Listeria grayi* and *Listeria seeligeri*) was detected in 9 of the samples by culture techniques and, only in 2 of them, also by molecular techniques.

## KEY WORDS

---

Detection; *Salmonella* spp.; *Listeria* spp.; *Listeria monocytogenes*; fruits; vegetables; ecological; microbiological risk; food safety; culture techniques; qPCR.

**Author of the project:** Ms. Sara Ferrís Pla

**Academic tutor:** PhD. Rosa M<sup>a</sup> Montes Estellés

**Academic co-tutor:** PhD. Salut Botella Grau

**Experimental director:** D. Miguel García Ferrús

**Valencia, July 2022.**

## AGRADECIMIENTOS

---

En este apartado me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que de alguna manera han formado parte y me han acompañado en esta etapa final de mi grado universitario.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras y profesoras Rosa M<sup>a</sup> Montes Estellés y Salut Botella Grau por dejarme realizar mi Trabajo Fin de Grado con ellas y haber confiado en mí. Además de por su tiempo y por enseñarme todo lo necesario para saber trabajar bien en un laboratorio de Microbiología.

También me gustaría mencionar a todas las personas que trabajan en el laboratorio de Microbiología de la Universitat Politècnica de València, en especial a Miguel García Ferrús, pues si he tenido algún problema o duda siempre ha estado dispuesto a ayudarme, al igual que todos los demás.

En lo personal, agradecer a todos mis amigos y familia por haberme apoyado hasta el final y aguantar mis días de agobio, que no han sido pocos.

Me gustaría acabar diciendo que me ha encantado hacer este TFG y aprender, por poco que sea, lo que he podido de una disciplina tan grande como lo es la Microbiología. Tengo ganas y a la vez miedo de empezar la siguiente fase, solo pido que sea tan maravillosa como la que dejo atrás.

*Gracias a todos.*

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto ECOFOOD: Análisis integrado de la diversidad, calidad y seguridad microbiológica de alimentos vegetales ecológicos mediante cultivo, técnicas moleculares y secuenciación masiva (PID2019-105691RB-I00). La parte experimental se ha realizado en el Centro Avanzado de Microbiología de Alimentos (CAMA).

## I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Alimentos ecológicos: frutas y verduras .....	1
1.2 Inocuidad alimentaria .....	1
1.3 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).....	2
1.3.1 Salmonelosis.....	3
1.3.1.1 Agente patógeno: <i>Salmonella</i> spp .....	3
1.3.1.2 Prevalencia de la enfermedad.....	5
1.3.1.3 Asociación de la enfermedad con los alimentos.....	5
1.3.2 Listeriosis.....	6
1.3.2.1 Agente patógeno: <i>Listeria monocytogenes</i> .....	6
1.3.2.2 Prevalencia de la enfermedad.....	8
1.3.2.3 Asociación de la enfermedad con los alimentos.....	8
1.4 Detección de microorganismos patógenos en alimentos.....	9
1.4.1 Métodos de detección clásicos: Técnicas de cultivo .....	9
1.4.2 Métodos de detección molecular: Assurance® GDS System.....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Muestras de frutas y verduras ecológicas.....	13
3.2 Análisis microbiológico de las muestras por métodos clásicos.....	14
3.2.1 Toma de muestras y preenriquecimiento/enriquecimiento primario .....	14
3.2.2 Enriquecimiento en medio líquido selectivo.....	14
3.2.3 Siembra en placa en medios sólidos selectivos.....	14
3.2.4 Confirmación de <i>Salmonella</i> spp. mediante pruebas bioquímicas .....	16
3.2.4.1 Agar Triple Sugar Iron.....	16
3.2.4.2 Prueba de la oxidasa.....	16
3.2.4.3 Tira API® 20E.....	17
3.2.5 Confirmación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante pruebas bioquímicas .....	17
3.2.5.1 Hemólisis en agar sangre.....	17
3.2.5.2 Tira API® <i>Listeria</i> .....	18
3.3 Análisis microbiológico de las muestras por métodos moleculares .....	19
3.3.1 Assurance® GDS <i>Salmonella</i> Tq .....	19
3.3.1.1 Preparación de las muestras .....	19
3.3.1.2 Procesamiento de las muestras .....	20
3.3.1.3 Amplificación.....	20

3.3.2 Assurance® GDS <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. Tq.....	20
3.3.2.1 Preparación de las muestras .....	20
3.3.2.2 Procesamiento de las muestras .....	20
3.3.2.3 Amplificación.....	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
4.1 Identificación de patógenos alimentarios por métodos clásicos.....	23
4.1.1 Identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	23
4.1.2 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
4.2 Identificación de patógenos alimentarios por métodos moleculares.....	30
4.2.1 Identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	30
4.2.2 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp.....	31
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>40</b>

## II. ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Brotes de transmisión alimentaria recientes asociados con frutas y verduras frescas.....	3
<b>Tabla 2:</b> Factores que afectan al crecimiento de <i>Salmonella</i> .....	3
<b>Tabla 3:</b> Factores que afectan al crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	6
<b>Tabla 4:</b> Clasificación de las muestras por nombre, fecha de compra, comercio y alimento.....	13
<b>Tabla 5:</b> Muestras en las que se ha encontrado presencia de bacterias del género <i>Listeria</i> .....	29



### III. ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Factores de virulencia para la patogenicidad de <i>Salmonella</i> .....	4
<b>Figura 2:</b> Casos anuales totales y asociados a brotes transmitidos por alimentos (BTA) de salmonelosis notificados entre 2017 y 2020 en la Unión Europea .....	5
<b>Figura 3:</b> Factores de virulencia y mecanismo de invasión de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
<b>Figura 4:</b> Casos anuales totales y asociados a brotes transmitidos por alimentos (BTA) de listeriosis notificados entre 2017 y 2020 en la Unión Europea.....	8
<b>Figura 5:</b> Resultados proporcionados por el software de Assurance® GDS Rotor-Gene™ una vez finalizado el análisis qPCR .....	11
<b>Figura 6:</b> Resultados colorimétricos para cada una de las pruebas de los pocillos y plantilla de resultados positiva para <i>Salmonella</i> .....	17
<b>Figura 7:</b> Hemólisis de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria innocua</i> en agar Columbia suplementado con sangre de caballo.....	18
<b>Figura 8:</b> Resultados colorimétricos para cada una de las pruebas de los pocillos y plantilla de resultados positiva para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
<b>Figura 9:</b> Dispositivo PickPen™ y placa de resuspensión .....	22
<b>Figura 10:</b> Termociclador Rotor-Gene® Q.....	22
<b>Figura 11:</b> Muestra EF100. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en agar de Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) .....	23
<b>Figura 12:</b> Muestra EF72. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en agar Cromogénico para <i>Salmonella</i> .....	23
<b>Figura 13:</b> Muestra EF111. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en agar Cromogénico para <i>Salmonella</i> .....	24
<b>Figura 14:</b> Muestra EF100. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en agar Cromogénico para <i>Salmonella</i> .....	24
<b>Figura 15:</b> Agar Triple Sugar Iron (TSI) positivo para la muestra EF92 y TSI negativo para la muestra EF93.....	24
<b>Figura 16:</b> Tira API® 20E de una cepa sospechosa de la muestra EF111.....	25
<b>Figura 17:</b> Muestra EF104. Colonias sospechosas de <i>Listeria monocytogenes</i> en agar de <i>Listeria</i> conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA).....	26
<b>Figura 18:</b> Muestra EF92. Colonias sospechosas de <i>Listeria monocytogenes</i> en agar Polimixina, Acriflavina, Cloruro de litio, Ceftazidima, Esculina, Manitol (PALCAM) .....	27

<b>Figura 19:</b> Muestra EF83. Colonias sospechosas de <i>Listeria monocytogenes</i> en agar Polimixina, Acriflavina, Cloruro de litio, Ceftazidima, Esculina, Manitol (PALCAM).....	27
<b>Figura 20:</b> Agar sangre de dos aislados de la muestra EF83 y uno de la muestra EF85 .....	27
<b>Figura 21:</b> Muestra EF78. Agar sangre con crecimiento hemolítico .....	28
<b>Figura 22:</b> Tira API® para <i>Listeria</i> de una cepa sospechosa de la muestra EF102.....	28
<b>Figura 23:</b> Tira API® para <i>Listeria</i> de una colonia sospechosa de la muestra EF110.....	29
<b>Figura 24:</b> Gráfica resultante del análisis qPCR para <i>Salmonella</i> spp. de las muestras EF92, EF93, EF94, EF100, EF101 y EF102 .....	30
<b>Figura 25:</b> Gráfica resultante del análisis qPCR para <i>Listeria</i> spp. de 27 muestras.....	31

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Alimentos ecológicos: frutas y verduras

El sector agrícola es uno de los sectores más antiguos que existen y que aún desempeña un papel significativo en algunas regiones del mundo. Aunque la agricultura ecológica todavía contribuye de forma reducida a la actividad económica, está adquiriendo creciente importancia en algunos países, independientemente de su estadio de desarrollo. Un ejemplo es la Unión Europea, donde a finales de 2019 unas 14,6 millones de hectáreas agrícolas fueron gestionadas ecológicamente por unos 344.000 agricultores (Willer *et al.*, 2021).

La agroecología es un sistema de producción alimentaria sostenible que promueve y mejora la salud de los suelos, los ecosistemas y las personas (IFOAM, 2008). Se basa en utilizar de forma óptima los recursos naturales en vez de emplear productos sintéticos o artificiales, consiguiéndose de esta forma un sistema de producción mucho más respetuoso con el medio ambiente y alimentos ecológicos con una composición química diferente a la de los convencionales (FAO, 1999a). Las principales diferencias se relacionan con el contenido de nutrientes y de otras sustancias bioactivas, mayor en los productos orgánicos, y con la exposición a contaminantes químicos persistentes, mayor en los productos convencionales (Brantsaeter *et al.*, 2017).

Este tipo de agricultura cumple con dos los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS): el objetivo 3 de Salud y Bienestar, para garantizar una vida sana y promover el bienestar, y el objetivo 12 de Producción y Consumo Responsables, para reducir los efectos destructivos sobre el planeta que se originan al hacer un mal uso de los recursos naturales y del medio ambiente (NACIONES UNIDAS, 2022).

Actualmente, la demanda de alimentos ecológicos ha aumentado notablemente, siendo las frutas y verduras los productos frescos más solicitados. Las razones principales que motivan a los consumidores a escoger estos productos son los beneficios que creen que tienen sobre la salud en comparación con los alimentos convencionales, pues incluyen un menor contacto con plaguicidas y un aumento en su valor nutricional. Además de otros motivos como la preocupación por el bienestar animal, el medio ambiente, la calidad del suelo y del agua, etcétera (Brantsaeter *et al.*, 2017). Sin embargo, la literatura publicada hasta la fecha carece de evidencia científica sólida de que los alimentos orgánicos son más saludables que los convencionales (Giampieri *et al.*, 2022).

Si bien el beneficio para la salud que resulta del consumo habitual de frutas y hortalizas frescas está ampliamente probado, existe una creciente proporción de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que han sido relacionados con dichos productos orgánicos. El aumento de la probabilidad de que estos alimentos estén contaminados por agentes patógenos puede deberse a la sustitución de los fertilizantes sintéticos por estiércol animal, al uso de agua de riego contaminada, a la presencia de animales en las áreas de cultivo, etc. (Hurtado-Barroso *et al.*, 2019; Kuan *et al.*, 2017).

### 1.2 Inocuidad alimentaria

Cada alimento alberga su propia microbiota. En los productos frescos, el tipo de microbiota predominante estará determinado por las condiciones ambientales, las prácticas agrícolas que se desarrollen y por su manipulación. Algunos microorganismos pueden considerarse útiles, si los cambios que provocan en los alimentos al crecer se consideran beneficiosos, por ejemplo,

en términos de sabor, textura o apariencia. No obstante, existen otros que pueden causar cambios indeseables en los alimentos cuando aparecen por encima de cierto grado, e incluso hay algunos que representan un riesgo para la salud y se consideran patógenos (Húngaro *et al.*, 2014). Esto último conlleva a que garantizar la inocuidad de los alimentos sea una prioridad de salud pública y un paso esencial para lograr la seguridad alimentaria.

La inocuidad alimentaria ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021) como la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso al que se destine. Sin embargo, los riesgos de contaminación a los que se exponen los alimentos pueden presentarse en cada etapa de la cadena alimentaria.

Los sistemas de producción orgánica pueden experimentar problemas relacionados con la inocuidad de los alimentos, pues dichos sistemas se basan principalmente en ciclos biológicos. Dado que la mayoría de los productos hortícolas frescos reciben un procesamiento mínimo, y, que a menudo, se comen crudos, la contaminación con agentes patógenos puede representar un riesgo grave. Además de que, al cortar, rebanar o pelar dichos alimentos se pueden causar daños en el tejido vegetal que provoquen la liberación de nutrientes y faciliten el crecimiento de los microorganismos.

Aunque existen una gran cantidad de estrategias para conseguir la inocuidad alimentaria y reducir la presencia de los microorganismos patógenos en los alimentos frescos, como, por ejemplo, el lavado de los alimentos con cloro después de la cosecha, también existen factores que limitan la eficacia de estas estrategias, entre los que se incluyen: la internalización de patógenos dentro del tejido vegetal, la formación de biopelículas y la hidrofobicidad de las superficies de las plantas (Olaimat & Holley, 2012).

En la actualidad, se promueve y se potencia la salud alimentaria exigiendo a las empresas que cumplan con la legislación agroalimentaria vigente sobre inocuidad, a través del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y de las buenas prácticas de manufactura (GMP) (FAO, 1999b).

### **1.3 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)**

Aunque la comida es vital para la supervivencia de la especie, también es una fuente importante de agentes patógenos capaces de causar enfermedades. Los alimentos actúan como vectores de transmisión de bacterias, virus, parásitos y hongos, y pueden ser contaminados en cualquier etapa de su cadena de producción, suministro o consumo.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, además de un impedimento para el desarrollo socioeconómico de todo el mundo. Los síntomas de estas enfermedades son muy variables y pueden incluir desde diarreas hasta cánceres y trastornos neuronales (OMS, 2022).

Dada la creciente producción y demanda de frutas y verduras frescas en los últimos años, varios brotes de enfermedades se han asociado con su consumo (*Tabla 1*). De todas las infecciones alimentarias, las bacterianas son las más frecuentes. Como los principales agentes causales destacan: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, algunas infecciones causadas por virus, como norovirus, también son habituales (FDA, 2022a).

**Tabla 1:** Brotes de transmisión alimentaria recientes asociados con frutas y verduras frescas

Año	Producto	Patógeno	Procedencia	Referencia
2020	Champiñones	<i>Listeria monocytogenes</i>	Corea	FDA, 2020a
2020	Melocotones	<i>Salmonella enteritidis</i>	Estados Unidos	FDA, 2020b
2021	Espinacas	<i>E. coli</i> O157:H7	Estados Unidos	FDA, 2021a
2021	Cebollas	<i>Salmonella oranienburg</i>	México	FDA, 2021b
2022	Ensalada envasada	<i>E. coli</i> O157:H7	Estados Unidos	FDA, 2022b
2022	Ensalada envasada	<i>Listeria monocytogenes</i>	Estados Unidos	FDA, 2022c

En el informe “One Health” de la Unión Europea correspondiente al año 2020, elaborado de manera conjunta entre la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC) se detectaron un total de 3.086 brotes alimentarios. De los cuales, uno de los agentes patógenos más frecuentes fue *Salmonella*, causante del 23 % de los brotes. Aunque las contaminaciones causadas por el género *Listeria* no son tan habituales, son las infecciones con tasas más altas de letalidad y hospitalización (1 de cada 8 personas con listeriosis muere) (EFSA & ECDC, 2021).

En general, la OMS (2022) estima que 1 de cada 10 personas de todo el mundo enferma cada año por ingerir alimentos contaminados, lo cual provoca más de 420.000 muertes, de las cuales 125.000 pertenecen a niños menores de 5 años.

### 1.3.1 Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa que afecta al tracto gastrointestinal y que se manifiesta normalmente en forma de gastroenteritis aguda. Aunque en la mayoría de los casos dura aproximadamente de 2-7 días y los síntomas suelen ser leves: diarrea, náuseas, calambres abdominales, fiebre, etc., algunas veces la deshidratación producida por la enfermedad puede poner en peligro la vida, sobre todo en niños, ancianos, embarazadas, inmunodeprimidos... En otras ocasiones, se pueden llegar a producir infecciones sistémicas febriles (fiebre entérica) potencialmente mortales que requieren una pronta terapia con antibióticos.

Esta enfermedad es producida por enterobacterias del género *Salmonella* que penetran en el organismo mayoritariamente a través de la ingesta de alimentos o agua contaminada, aunque también se puede propagar de persona a persona (Giannella, 1996).

#### 1.3.1.1 Agente patógeno: *Salmonella* spp.

*Salmonella* es un género bacteriano constituido por bacilos gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos. El hecho de que sean anaerobios facultativos facilita su desarrollo, pues son capaces de crecer tanto en presencia como ausencia de oxígeno (Wang & Hammack, 2014). Su principal reservorio es el tracto gastrointestinal y las condiciones que afectan a su crecimiento se recogen en la *Tabla 2* (ICMFS, 1996).

**Tabla 2:** Factores que afectan al crecimiento de *Salmonella* (ICMFS, 1996)

Factores	Valor mínimo	Rango óptimo	Valor máximo
Temperatura (°C)	5,20*	35,00-43,00	46,20
pH	3,80*	6,50-7,50	9,50
Actividad del agua (aW)	0,93*	0,99	> 0,99

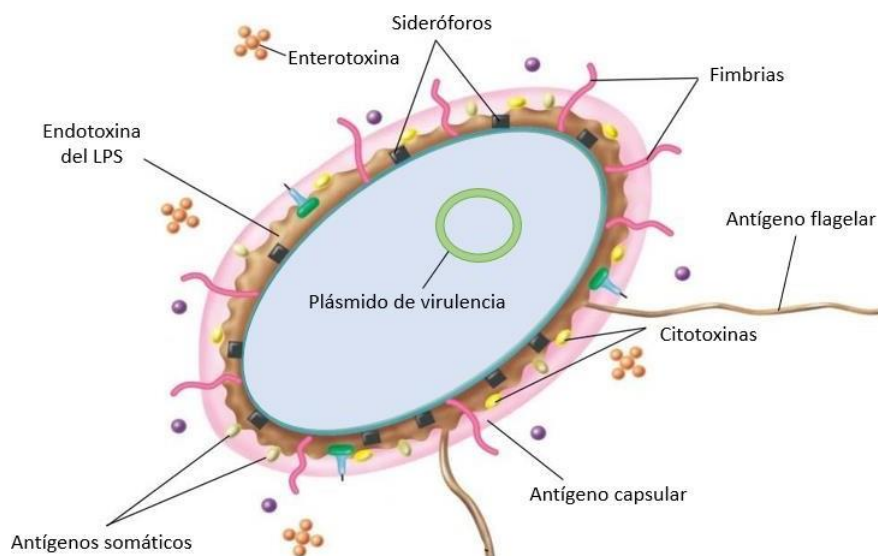
\*No pueden multiplicarse por debajo de estos valores, pero sí sobrevivir largos períodos.

A parte de los factores que aparecen en la tabla, cabe comentar que son sensibles a la presencia de conservantes, a la radiación ionizante y a los desinfectantes (ICMSF, 1996).

El género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*. Esta última se divide en seis subespecies: *S. entérica* subsp. *enterica*, *S. entérica* subsp. *salamae*, *S. entérica* subsp. *arizonae*, *S. entérica* subsp. *diarizonae*, *S. entérica* subsp. *indica* y *S. entérica* subsp. *houtenae*; donde *S. entérica* subsp. *entérica* representa la subespecie de mayor patogenicidad. Además, en función de sus antígenos, las subespecies se pueden dividir en serovares. Existen más de 2000 serovares de *Salmonella* capaces de causar salmonelosis, sin embargo, en función del serovar, se produce un síndrome particular u otro. Por ejemplo, *S. typhi*, *S. paratyphi-A* y *S. schottmuelleri* producen fiebre entérica; *S. choleraesuis* produce septicemia o infecciones focales, y *S. typhimurium* y *S. enteritidis* producen gastroenteritis (Giannella, 1996).

En cuanto a su metabolismo (oxidativo y fermentativo), utilizan la glucosa como principal fuente de energía, aunque también pueden utilizar otros hidratos de carbono (excepto lactosa y sacarosa). Al fermentar estas sustancias, producen a menudo gases y ácidos. Normalmente estas enterobacterias son catalasa positivas y oxidasas negativas. Otras de sus características bioquímicas son: reducción de nitratos a nitritos, uso de citrato como fuente de carbono única, son ureasas negativas, son tetrionato reductasas, no desaminan fenilalanina y producen H<sub>2</sub>S (Parra *et al.*, 2002).

Para conseguir invadir las células del huésped adecuadas (células del epitelio intestinal) y convertirse en un patógeno intracelular, *Salmonella* posee muchos factores de virulencia que determinan su potencial patógeno (Figura 1). Entre los más importantes destacan las fimbrias, importantes para la adhesión de las bacterias a las células huésped diana; el antígeno H o flagelar, importante para que las bacterias se muevan; el antígeno O ó somático, importante para la resistencia de las bacterias al efecto bactericida del suero; el antígeno Vi o capsular, importante para proteger a las bacterias de la respuesta inflamatoria del huésped; los lipopolisacárido (LPS), importantes porque actúan como endotoxinas y, finalmente, los sistemas de secreción tipo III (T3SS), importantes para secretar proteínas efectoras capaces de manipular las cascadas de señalización de las células objetivo y favorecer así la entrada bacteriana (de Jong *et al.*, 2012).



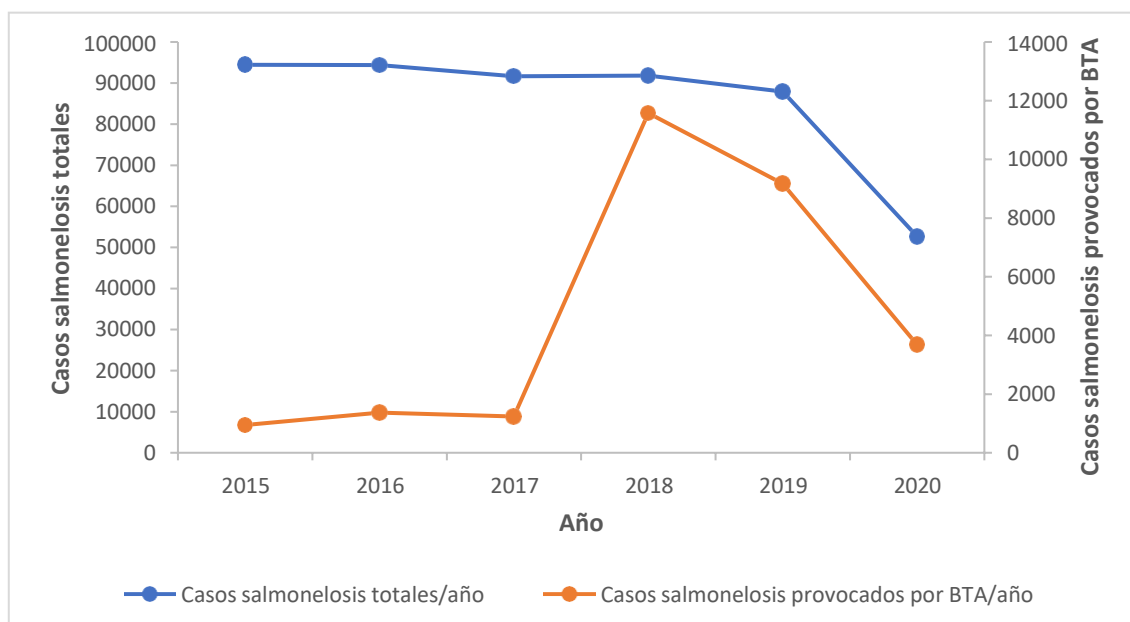
**Figura 1:** Factores de virulencia para la patogenicidad de *Salmonella*. Figura adaptada de (Madigan *et al.*, 2004)

### 1.3.1.2 Prevalencia de la enfermedad

La salmonelosis es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más notificada en humanos después de la campilobacteriosis, y la primera causa de brotes alimentarios en la Unión Europea (UE) y en países no pertenecientes a la UE (EFSA & ECDC, 2021).

En 2020, se notificaron 52.702 casos totales confirmados de salmonelosis en personas pertenecientes a la UE, incluyéndose en esta cifra tanto los casos producidos por brotes alimentarios, como los producidos por otras causas (zoonosis, contagio de persona a persona, etc.). Siendo este el número de casos anuales más bajo desde 2007, debido a los impactos provocados por la salida de Reino Unido de la UE y a la pandemia por COVID-19 (Figura 2).

Los datos utilizados para elaborar la Figura 2 se han obtenido de los informes “One Health” de la Unión Europea correspondientes a los años 2017, 2018, 2019 y 2020, publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC).



**Figura 2:** Casos anuales totales y asociados a brotes transmitidos por alimentos (BTA) de salmonelosis notificados entre 2017 y 2020 en la Unión Europea (elaboración propia)

En España, la salmonelosis es una enfermedad de declaración obligatoria. En 2020, se notificaron 3.526 casos en humanos. Sin embargo, este número podría no ser completo, ya que la pandemia por COVID-19 tuvo un impacto negativo significativo en los sistemas de notificación (AESAN, 2022).

### 1.3.1.3 Asociación de la enfermedad con los alimentos

Los alimentos que tienen mayor probabilidad de contaminarse por *Salmonella* spp. son principalmente los huevos y los ovoproductos (mayonesas, salsas, cremas...), los productos cárnicos y los productos lácteos. Como fuentes secundarias se encuentran otros productos como las frutas y verduras frescas y el marisco (FDA, 2019).

En 2020, se notificaron en total en la Unión Europea 3686 casos confirmados de salmonelosis provocados por 694 brotes de *Salmonella* asociados al consumo de agua y alimentos

contaminados, siendo en su mayoría causados por el serotipo *S. enteritidis* (AESAN, 2022). De los 694 brotes, 56 se localizaron en España (EFSA & ECDC, 2021).

Las frutas y verduras orgánicas se vinculan cada vez con mayor frecuencia con brotes de salmonelosis. Esto es debido a que al ser alimentos que se consumen crudos, son más susceptibles a estar contaminados por *Salmonella*, pues no reciben ningún tratamiento térmico que las inactive (Ehuwa *et al.*, 2021). Además, debido a la interacción inapreciable entre las bacterias patógenas y los alimentos, y la limitada eficacia anti-*Salmonella* de los desinfectantes comúnmente disponibles, la detección y el control de *Salmonella* spp. en productos frescos sigue siendo un desafío.

Uno de los últimos brotes notificados de salmonelosis asociado al consumo de frutas y verduras frescas fue el generado en 2020 por la presencia de *S. enteritidis* en melocotones procedentes de la empresa Prima Wawona. Todos sus melocotones distribuidos sueltos, a granel o en bolsas entre junio y agosto fueron retirados del mercado. En total, el brote causó 101 casos de salmonelosis descritos en 17 estados de Estados Unidos, entre los que se incluyen 28 hospitalizaciones (FDA, 2020b).

### 1.3.2 Listeriosis

La listeriosis es una infección gastrointestinal que se puede manifestar en forma de gastroenteritis febril leve en pacientes sanos (no invasiva), o en formas clínicas más graves (invasiva), como meningitis y septicemia, en grupos de alto riesgo (embarazadas, fetos, lactantes, ancianos, pacientes con cáncer, etc.). La listeriosis invasiva, además de por sus graves síntomas, se caracteriza por tener una elevada tasa de mortalidad (20-30 %) y baja morbilidad (OMS, 2018).

Esta enfermedad es producida por varias especies del género *Listeria* que viven como saprófitos en el medio ambiente. En humanos, *Listeria monocytogenes* es la única especie patógena, sin embargo, en animales, *Listeria ivanovii* también puede causar enfermedad (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2018). Estas bacterias suelen entrar en el organismo a través de alimentos contaminados, aunque también pueden penetrar por inhalación o a través de lesiones en la piel. Además, las mujeres embarazadas pueden transmitir dichas bacterias al feto a través de la placenta o durante el parto (OMS, 2018).

#### 1.3.2.1 Agente patógeno: *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* es un bacilo gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo. Sus reservorios principales son el medio ambiente (agua, suelo, vegetación...) y el tracto intestinal de animales y humanos. Las condiciones que afectan a su crecimiento se recogen en la *Tabla 3*, donde cabe destacar que esta bacteria es capaz de crecer incluso en refrigeración (<5 °C) y a una elevada concentración de sal (ELIKA, 2013).

**Tabla 3:** Factores que afectan al crecimiento de *Listeria monocytogenes* (ELIKA, 2013)

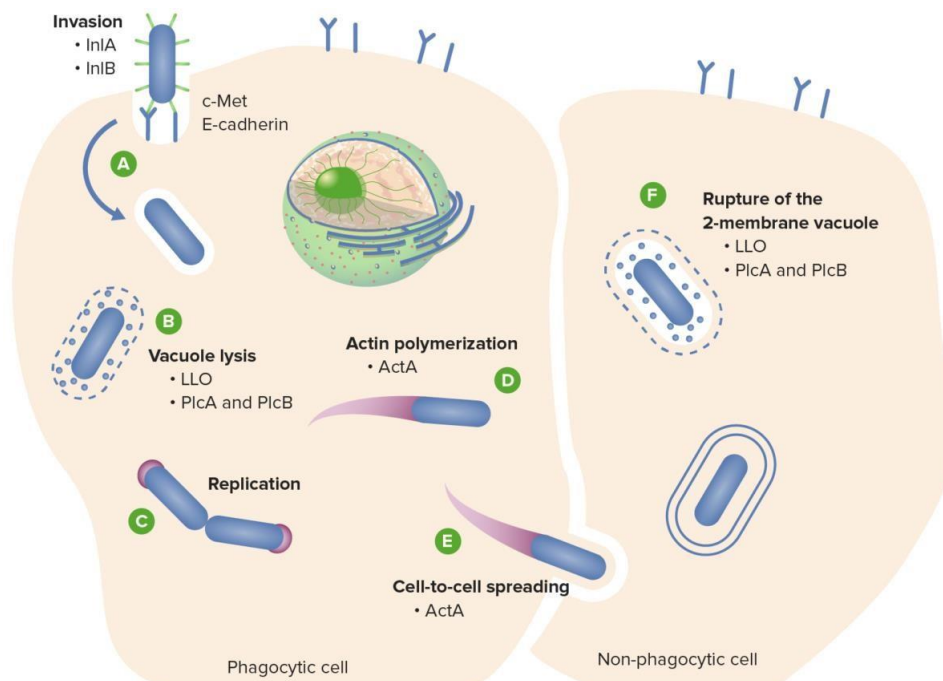
Factores	Valor mínimo	Rango óptimo	Valor máximo
Temperatura (°C)	-1,00	30,00-37,00	45,00
pH	4,00	6,00-8,00	9,60
Actividad del agua (aW)	0,93	0,99	> 0,99
Cloruro sódico (%)	<0,50	-	12,00-16,00



*L. monocytogenes* incluye un amplio espectro de serotipos que difieren en su virulencia y patogenicidad. De los 13 serotipos definidos, se estima que los más frecuentes son 1/2a, 1/2b y 4b, pues son los que se han aislado en el 90 % de los casos de listeriosis. Todos los serotipos pueden producir los dos tipos de afecciones, tanto la invasiva (diseminación por la sangre) como la no invasiva (García-Álvarez *et al.*, 2006).

En cuanto a su metabolismo (oxidativo y fermentativo), utilizan la glucosa como principal fuente de energía, aunque también pueden utilizar otros hidratos de carbono como la lactosa o la sacarosa. Al fermentar estas sustancias, producen a menudo ácidos, generando una reacción de Voges-Proskauer positiva. Normalmente estas bacterias son catalasas positivas, oxidasas negativas, ureasas negativas,  $\beta$ -hemolíticas y son capaces de hidrolizar la esculina. Además, presentan flagelos peritricos que les permiten moverse (Allerberger, 2003; Jamshidi & Zeinali, 2019).

Al igual que *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* también posee muchos factores de virulencia que determinan su potencial patógeno y le permiten entrar a las células diana del hospedador (células del epitelio intestinal y otras no fagocíticas como los hepatocitos) (Ireton, 2007). Entre los más importantes destacan las adhesinas Lap, necesarias para la adhesión celular; proteínas como las internalinas InlA e InlB, que se unen a receptores de la membrana de las células del huésped favoreciendo el proceso de invasión; una citolisina sulfhidrilo-activada (listeriolisina O) requerida para la ruptura de la vacuola fagocítica y la liberación de la bacteria dentro del citoplasma, y, la proteína ActA que participa en la polimerización de actina y permite la movilidad de la bacteria (Figura 3) (Kathariou, 2002).



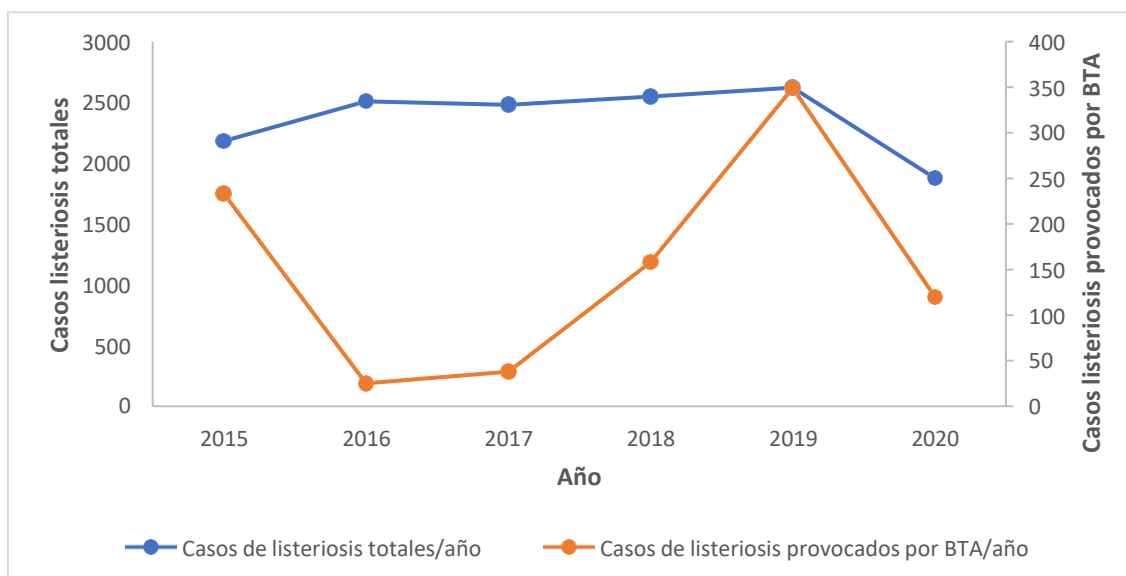
**Figura 3:** Factores de virulencia y mecanismo de invasión de *Listeria monocytogenes*. (A) *L. monocytogenes* invade la célula huésped a través de la interacción de las internalinas InlA e InlB con los receptores de la superficie de la célula huésped E-cadherina y Met, respectivamente. (B) En las células fagocíticas, la bacteria escapa del fagosoma a través de la acción de las toxinas listeriolisinas O (LLO) y las fosfolipasas A y B (PlcA y PlcB). (C) *L. monocytogenes* se replica en el citosol. (D) ActA ayuda a que los filamentos de actina polimericen y la bacteria pueda moverse. (E) Propagación de la bacteria de célula a célula. (F) En las células no fagocíticas, la ruptura de la membrana de la vacuola también está mediada por LLO, PlcA y PlcB (LECTURIO, 2022).

### 1.3.2.2 Prevalencia de la enfermedad

La listeriosis es la quinta zoonosis más comúnmente notificada en humanos en la UE. A pesar de no ser muy frecuente (baja morbilidad), es una de las enfermedades de transmisión alimentaria con una tasa de mortalidad más elevada (EFSA & ECDC, 2021).

En 2020, se notificaron 1.876 casos totales confirmados de listeriosis invasiva provocados por *L. monocytogenes* en la UE, incluyéndose en esta cifra tanto los casos producidos por brotes alimentarios, como los producidos por otras causas (zoonosis, transmisión madre-hijo a través de la placenta, contagio de persona a persona, etc.). De éstos, 780 casos requirieron hospitalización y 167 murieron. A pesar de que se observó una reducción del número de casos de listeriosis en comparación con otros años (probablemente debido a la pandemia por COVID-19), esta reducción no fue significativa, por lo que la tendencia de la listeriosis entre 2016-2020 se mantuvo estable (Figura 4) (EFSA & ECDC, 2021).

Los datos utilizados para elaborar la Figura 4 se han obtenido de los informes “One Health” de la Unión Europea correspondientes a los años 2017, 2018, 2019 y 2020, publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC).



**Figura 4:** Casos anuales totales y asociados a brotes transmitidos por alimentos (BTA) de listeriosis notificados entre 2017 y 2020 en la Unión Europea (elaboración propia)

En España, país en el que la listeriosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 2015, en 2018 se notificaron 284 casos confirmados en humanos. El hecho de ser una enfermedad de declaración obligatoria supone una importante mejora en la notificación de casos, sin embargo, los brotes de listeriosis son difíciles de investigar debido a su largo período de incubación (5-70 días), que dificulta el estudio de los alimentos contaminados consumidos por los contagiados (AESAN, 2019).

### 1.3.2.3 Asociación de la enfermedad con los alimentos

Los alimentos que tienen mayor probabilidad de contaminarse por *L. monocytogenes* son principalmente productos cárnicos listos para el consumo (salchichas cocidas, patés...), pescados

ahumados, productos lácteos (quesos de pasta blanda, leche cruda, helados...), ensaladas preparadas y frutas y verduras frescas (AESAN, 2019).

En 2020, se notificaron en total en la Unión Europea 120 casos confirmados de listeriosis provocados por 16 brotes de *L. monocytogenes* asociados al consumo de alimentos contaminados. De los 16 brotes, ninguno se localizó en España (EFSA & ECDC, 2021).

La presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos es poco habitual. El peligro para los seres humanos procede principalmente de la exposición a determinados alimentos que contengan la bacteria por encima de 100 UFC/g. Sin embargo, debido a la capacidad de supervivencia y propagación de esta bacteria, incluso una proporción baja de muestras que superen ese nivel puede ser causa de preocupación para la salud pública.

*L. monocytogenes* no es termorresistente y se inactiva mediante el cocinado a temperaturas superiores a 70 °C durante 2 minutos. La falta de tratamientos térmicos en frutas y verduras orgánicas hace que, al igual que en el caso de la salmonelosis, los brotes de listeriosis se vinculen cada vez con mayor frecuencia con estos alimentos (AESAN, 2019).

Uno de los últimos brotes notificados de listeriosis asociado al consumo de frutas y verduras frescas fue el generado en 2022 por la presencia de *L. monocytogenes* en ensaladas envasadas procedentes de la empresa Dole de Yuma, Arizona. En total, el brote causó 18 casos de listeriosis identificados en 13 estados de Estados Unidos (FDA, 2022b).

#### **1.4 Detección de microorganismos patógenos en alimentos**

Las empresas alimentarias y los organismos de inspección transfronteriza necesitan pruebas de detección rápida para controlar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, además de para garantizar el cumplimiento de la legislación que estipula niveles máximos de patógenos particulares en ciertas categorías de productos alimenticios. La capacidad de detectar rápidamente patógenos viables en los alimentos es importante tanto por motivos de salud pública como por motivos de seguridad alimentaria.

Tradicionalmente, las pruebas de detección de patógenos se han basado en métodos de cultivo, pues son económicos y fáciles de usar. Sin embargo, requieren mucho tiempo para conseguir confirmar la presencia del patógeno de interés. Debido a la naturaleza perecedera y, por tanto, a la vida útil limitada de muchos alimentos, el retraso en la entrega de dichos resultados hace que tales pruebas sean inadecuadas en muchos casos. Para superar estas limitaciones, se están proponiendo métodos de detección molecular mucho más rápidos y sensibles (Foddai & Grant, 2020).

##### **1.4.1 Métodos de detección clásicos: Técnicas de cultivo**

Los métodos de detección clásicos se basan en la capacidad de los microorganismos para crecer y proliferar en medios de cultivo y formar colonias visibles. Estos métodos comprenden una serie de pasos entre los que se incluyen: una etapa de preenriquecimiento en medios líquidos no selectivos, una etapa de enriquecimiento en medios líquidos selectivos, una etapa de sembrado en medios sólidos selectivos y finalmente una etapa de confirmación a través de pruebas serológicas o bioquímicas (Foddai & Grant, 2020).

Normalmente, los patógenos se encuentran en las muestras en un nivel poblacional bajo (1 UFC/g), con daños subletales y en presencia de decenas de millones de microorganismos acompañantes. La etapa de preenriquecimiento sirve para ayudar a los microorganismos de la muestra a crecer, pues se utilizan medios de caldo no selectivos que solo proporcionan

nutrientes. La etapa de enriquecimiento con caldos selectivos sirve para suprimir el crecimiento de microbiota competitiva y permitir la proliferación del patógeno que se quiere detectar. El objetivo de la etapa de sembrado en agares selectivos es seleccionar y diferenciar colonias bien aisladas del patógeno objetivo de la microbiota acompañante. Y, finalmente, la etapa de confirmación consiste en, después de haber encontrado colonias sospechosas del patógeno, realizar una serie de pruebas bioquímicas o serológicas para asegurar que dichas colonias sospechosas pertenecen al patógeno objetivo (Wang & Hammack, 2014).

Estos métodos de detección han sido validados con éxito por la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) y se encuentran descritos en las Normas UNE-EN ISO. Además, todavía se consideran el estándar de oro y son utilizados por la mayoría de los laboratorios de análisis de alimentos. Sin embargo, todo este proceso de cultivo requiere alrededor de 2-3 días para el aislamiento preliminar del patógeno y hasta 7 días para la confirmación final de la especie aislada (Foddai & Grant, 2020).

#### **1.4.2 Métodos de detección molecular: Assurance® GDS System**

Dadas las limitaciones de los métodos de detección clásicos, recientemente se han desarrollado métodos de detección moleculares más sensibles, rápidos y específicos que los tradicionales. Un ejemplo es el sistema Assurance® GDS (Genetic Detection System) de la empresa Merck, el cual se puede utilizar para la detección de patógenos alimentarios como *Salmonella* y *L. monocytogenes*, entre otros.

Assurance® GDS es un sistema de detección genético automatizado que incorpora múltiples niveles de especificidad y selectividad para asegurar resultados altamente precisos. Consta principalmente de tres pasos: (1) enriquecimiento de las muestras, (2) inmunocaptura del patógeno objetivo mediante unas perlas magnéticas recubiertas por anticuerpos específicos para el mismo y (3) análisis qPCR.

El paso 1 y 2 permiten concentrar los microorganismos objetivos eliminando microbiota competitiva y sustancias inhibitoras de la qPCR presentes en la matriz alimentaria (Brandão *et al.*, 2015), mientras que el paso 3 permite amplificar, detectar y cuantificar dicho microorganismo en el mismo tubo PCR.

El tubo de amplificación contiene todos los reactivos necesarios para el ensayo PCR liofilizados desde el momento de fabricación del kit (incluso la enzima polimerasa). Entre los reactivos, destacan los cebadores de diseño propio muy específicos dirigidos contra una secuencia de ADN altamente conservada en el microorganismo objetivo.

Otra característica de este sistema es que para el análisis qPCR los tubos de amplificación se introducen en un termociclador también propio denominado Assurance GDS Rotor-Gene™. Este termociclador dispone de un formato rotatorio que permite ciclos mucho más rápidos, sin superar el tiempo total de análisis los 80 minutos. Además, también asegura temperaturas uniformes entre todas las reacciones.

Finalmente, los resultados del análisis se presentan en una tabla como no amplificado (en caso de que haya habido un problema durante la amplificación), positivo o negativo para la detección del microorganismo objetivo (*Figura 5*), sin ser necesaria una interpretación compleja (MERCK, 2022a).

No.	Color	Name	Result	Description	Kit Lot Number
1	■	Sample 1	Positive	Salmonella	1234567
2	■	Sample 2	Negative	Salmonella	1234567
3	■	Sample 3	No Amp	Salmonella	1234567

**Figura 5:** Resultados proporcionados por el software de Assurance® GDS Rotor-Gene™ una vez finalizado el análisis qPCR (MERCK, 2022b)

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar la calidad microbiológica de alimentos ecológicos de venta al público. Concretamente, determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en frutas y verduras orgánicas vendidas en comercios de Valencia, mediante técnicas clásicas y moleculares.

Para llevar a cabo este propósito, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en frutas y verduras ecológicas siguiendo la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017, en la que se establece el método horizontal normalizado para la detección de *Salmonella* spp.
2. Determinar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en frutas y verduras ecológicas siguiendo la Norma UNE-EN ISO 11290-1:2017, en la que se establece el método horizontal normalizado para la detección de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*.
3. Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en frutas y verduras ecológicas mediante el sistema automatizado para la amplificación de ácidos nucleicos ASSURANCE® GDS (Genetic Detection System).
4. Determinar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en frutas y verduras ecológicas mediante el sistema automatizado para la amplificación de ácidos nucleicos ASSURANCE® GDS (Genetic Detection System).
5. Analizar y comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestras de frutas y verduras ecológicas

Se analizaron un total de 35 muestras de verduras y frutas orgánicas de consumo habitual, entre las que se incluyeron: 3 espinacas, 2 lechugas, 8 coles lombardas, 8 coles repollo y 14 fresas. Las muestras se compraron en 17 comercios diferentes de la ciudad de Valencia, entre los meses de enero a marzo de 2022 (Tabla 4).

**Tabla 4:** Clasificación de las muestras por nombre, fecha de compra, comercio y alimento

Nombre de la muestra	Fecha de compra	Comercio	Alimentos orgánicos				
			Espinacas	Lechuga	Col lombarda	Col repollo	Fresa
EF77	10/01/22	A				X	
EF78	10/01/22	A			X		
EF79	10/01/22	B					X
EF80	24/01/22	C					X
EF81	24/01/22	D		X			
EF82	24/01/22	D					X
EF83	31/01/22	E	X				
EF84	31/01/22	E			X		
EF85	31/01/22	F					X
EF86	07/02/22	G	X				
EF87	07/02/22	H				X	
EF88	07/02/22	G					X
EF89	14/02/22	H		X			
EF90	14/02/22	H				X	
EF91	14/02/22	I					X
EF92	21/02/22	J	X				
EF93	21/02/22	K			X		
EF94	21/02/22	L					X
EF95	28/02/22	H			X		
EF96	28/02/22	M					X
EF97	07/03/22	N				X	
EF98	07/03/22	N			X		
EF99	07/03/22	N					X
EF100	28/03/22	N				X	
EF101	28/03/22	N			X		
EF102	28/03/22	I					X
EF103	4/04/22	H			X		
EF104	4/04/22	N				X	
EF105	4/04/22	I					X
EF106	2/05/22	O				X	
EF107	2/05/22	L					X
EF108	9/05/22	I					X
EF109	9/05/22	P				X	
EF110	9/05/22	Q			X		
EF111	16/05/22	Q					X

### **3.2 Análisis microbiológico de las muestras por métodos clásicos**

El análisis de las muestras con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* por técnicas de cultivo clásicas se realizó siguiendo los protocolos estandarizados que se recogen en las Normas UNE-EN ISO. Se utilizó la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017 para la detección de *Salmonella* spp. y la Norma UNE-EN ISO 11290-1:2017 para la detección de *L. monocytogenes*.

#### **3.2.1 Toma de muestras y preenriquecimiento/enriquecimiento primario**

Se pesaron 25 gramos de cada muestra y se añadieron a bolsas estériles para homogeneizadores tipo Stomacher.

Se añadieron 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Scharlau, ref. 02-277-500) a las bolsas destinadas a la detección de *Salmonella* spp. para proporcionar nutrientes esenciales y favorecer el crecimiento de todos los microorganismos presentes en las muestras.

Se añadieron 225 mL de caldo Fraser (Scharlau, ref. 02-496-500) a media concentración suplementado con “Listeria Half Fraser Selective Supplement” (Scharlau, ref. 06-145LYO1) a las bolsas destinadas a la detección de *L. monocytogenes* para favorecer su crecimiento e inhibir con acriflavina, ácido nalidíxico y cloruro de litio el de microbiota acompañante.

Todas las bolsas se sometieron a 5 minutos de homogeneizado en el Stomacher. Tras los 5 minutos, las bolsas destinadas a la detección de *Salmonella* spp. se incubaron en estufa a una temperatura de 34-38 °C durante un tiempo de 18-20 horas, mientras que las bolsas destinadas a la detección de *L. monocytogenes* se incubaron a una temperatura de 30 °C ± 1 °C durante un tiempo de 24-26 horas.

#### **3.2.2 Enriquecimiento en medio líquido selectivo**

Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. se inoculó 0,1 mL del cultivo procedente del preenriquecimiento en 10 mL de medio Rappaport-Vassiliadis (RVS) (Difco, ref. 218581) y se incubó a una temperatura de 41,2 °C ± 1 °C durante un tiempo de 24-27 horas. También se inoculó 1 mL del cultivo procedente del preenriquecimiento en 10 mL de medio Tetrionato, novobiocina de Muller-Kauffmann (MKTTn) (Scharlau, ref. 02-033-500) suplementado con “Brilliant Green-Novobiocin Selective Supplement” (Scharlau, Ref. 06-017LYO1) y “Iodine-Iodized Solution” (Scharlau, Ref. 064-V11108), y se incubó a una temperatura de 37 °C ± 1 °C durante un tiempo de 24-27 horas. Se utilizaron el medio RVS y el medio MKTTn para el enriquecimiento de *Salmonella* spp. porque contienen sustancias químicas (cloruro magnésico verde malaquita y tetrionato, respectivamente) que favorecen su crecimiento e inhiben el crecimiento de microbiota competidora.

Para el enriquecimiento secundario de *L. monocytogenes* se inoculó 0,1 mL del cultivo procedente del enriquecimiento primario en 10 mL de medio Fraser (Scharlau, ref. 02-496-500) y se incubó a una temperatura de 37 °C ± 1 °C durante un tiempo de 24-26 horas. Se utilizó el medio Fraser para el enriquecimiento secundario de *L. monocytogenes* porque provee nutrientes esenciales para su crecimiento y sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias acompañantes (cloruro de sodio y cloruro de litio).

#### **3.2.3 Siembra en placa en medios sólidos selectivos**

El aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. se realizó inoculando el cultivo procedente del enriquecimiento con un asa de siembra de 10 µL en la superficie de placas Petri de dos medios



selectivos diferentes: agar de Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) (Scharlau, ref. 01-211-500) y agar Cromogénico para *Salmonella* (Oxoid, ref. CM1007) suplementado con *Salmonella* Selective Supplement (Oxoid, ref. SR0194). Ambos tipos de placas se incubaron posteriormente en posición invertida a una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 24-27 horas.

Se utilizaron el agar XLD y Cromogénico como medios sólidos selectivos para *Salmonella* porque contienen sustancias inhibidoras de microbiota competidora: desoxicolato de sodio en agar XLD e inhibigen, novobiocina y cefsulodina en agar Cromogénico.

El agar XLD tiene un pH aproximadamente de 7,4 y un aspecto rojo debido a la presencia del indicador rojo de fenol. Cuando microorganismos del género *Salmonella* están presentes, empiezan a fermentar el azúcar xilosa disminuyendo el pH. En consecuencia, el indicador rojo de fenol lo registra, cambiando el medio de rojo a amarillo. Después de agotar el suministro de xilosa, las colonias de *Salmonella* descarboxilan la lisina, incrementando el pH del medio y volviendo este a su color rojo inicial. La producción de sulfuro de hidrógeno por estas colonias también se puede detectar gracias al sistema indicador tiosulfato de sodio y citrato de amonio férrico (colonias con centro negro). Por estas razones, las colonias típicas de *Salmonella* H<sub>2</sub>S positivas presentan en agar XLD una zona central de color negro y por fuera una zona ligeramente transparente de color rojizo, mientras que las variantes de *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativas presentan un color rojo/cereza (SCHARLAU, 2021a).

El agar Cromogénico para *Salmonella* contiene dos cromógenos que pueden ser escindidos por enzimas específicas: caprilato esterasa y  $\beta$ -glucosidasa. Todas las especies del género *Salmonella* presentan caprilato esterasa, esta enzima puede escindir uno de los dos cromógenos liberando un cromóforo púrpura insoluble. Sin embargo, no contienen  $\beta$ -glucosidasa, pudiéndose distinguir de las que sí, pues las que la contienen pueden escindir el otro cromógeno liberando un cromóforo azul. Por estos motivos, las colonias típicas de *Salmonella* presentan en agar Cromogénico para *Salmonella* un color púrpura/magenta (FISHER SCIENTIFIC, 2022a).

El aislamiento selectivo de *L. monocytogenes* se realizó inoculando el cultivo del enriquecimiento primario con un asa de siembra de 10  $\mu\text{L}$  en la superficie de placas Petri de dos medios selectivos diferentes: agar de *Listeria* conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA) (Oxoid, ref. CM1084) suplementado con "Ocla (Iso) Selective Supplement" (Oxoid, Ref. SR0226) y "Brilliance *Listeria* Differential Supplement" (Oxoid, Ref. SR0228), y agar Polimixina, Acriflavina, Cloruro de litio, Ceftazidima, Esculina, Manitol (PALCAM) (Scharlau, ref. 01-470-500) suplementado con "PALCAM Selective Supplement" (Scharlau, Ref. 06-110LY01). Ambos tipos de placas se incubaron posteriormente en posición invertida a una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 48-52 horas. Con el cultivo procedente del enriquecimiento secundario se repitió el procedimiento descrito con los dos mismos medios selectivos en placa.

Se utilizaron el agar ALOA y PALCAM como medios sólidos selectivos para *L. monocytogenes* porque contienen sustancias inhibidoras de microbiota competidora: ceftazidima, polimixina, ácido nalidíxico y cicloheximida en agar ALOA y ceftazidima, polimixina, cloruro de litio y acriflavina en agar PALCAM.

El agar ALOA contiene un componente cromogénico que puede ser escindido por la enzima  $\beta$ -glucosidasa presente en todas las colonias del género *Listeria*, liberando un cromóforo de color azul. También presenta el sustrato de la lipasa C, enzima presente en *L. monocytogenes*, que cuando se escinde origina un halo opaco alrededor de las colonias. Por estas razones, las colonias

típicas de *L. monocytogenes* presentan en agar ALOA un color verde azulado y por fuera un halo opaco, aunque este halo puede no siempre aparecer (FISHER SCIENTIFIC, 2022b).

El agar PALCAM contiene esculina. Todas las especies de *Listeria* pueden hidrolizar la esculina a esculetina. La esculetina reacciona con iones férricos produciendo complejos que hacen que el medio cambie de rojo a negro alrededor de las colonias de *Listeria*. Por este motivo, las colonias típicas de *L. monocytogenes* en agar PALCAM presentan un color gris verdoso con un núcleo negro y hundido y un halo también negro alrededor (SCHARLAU, 2021b).

Se seleccionaron las colonias sospechosas de cada placa. Se cogió al menos una colonia típica o sospechosa para su subcultivo y confirmación en el caso de que las hubiese.

### **3.2.4 Confirmación de *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas**

#### **3.2.4.1 Agar Triple Sugar Iron**

Las colonias sospechosas se inocularon en el fondo de un tubo con agar Triple Sugar Iron (TSI) (Merck, ref. 1.03915.0500) inclinado introduciendo el asa de siembra en su interior. Las colonias se sembraron posteriormente en estrías en la superficie del mismo agar con la misma asa de siembra. Se incubaron los tubos a una temperatura de 37 °C durante un tiempo de 24-27 horas.

El agar TSI contiene tres tipos de azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa. Las colonias de *Salmonella* son capaces de metabolizar la glucosa, pero no los otros dos azúcares. Durante la incubación, las colonias de *Salmonella* consumirán toda la glucosa presente en el medio, produciendo ácidos que lo acidificarán y volverán el fondo del tubo amarillo. Ante la imposibilidad de metabolizar la lactosa y la sacarosa empezarán a metabolizar las proteínas, esta reacción necesita oxígeno y por eso ocurre en la superficie. El metabolismo de las proteínas produce aminas que alcalinizan y vuelven la superficie de color rojizo. El género *Salmonella* también es capaz producir sulfuro de hidrógeno (precipitado de color negro) a partir de sustancias que hay en el medio (Gil, 2019).

Por estas razones, tras la incubación, los cultivos típicos de *Salmonella* hacen que el fondo del agar TSI se vuelva ácido (amarillo) y, en el 90 % de los casos, ennegrecido (por la formación de sulfuro de hidrógeno); que la superficie inclinada del agar se mantenga alcalina (roja) y, que se observen burbujas (gas creado al fermentar la glucosa).

#### **3.2.4.2 Prueba de la oxidasa**

Las cepas que dieron agares TSI con aspecto similar a los descritos en el apartado 3.2.4.1 *Agar Triple Sugar Iron de MATERIALES Y MÉTODOS* se resembraron en agar Plate Count (PCA) (Scharlau, ref. 01-161-500) y se incubaron a una temperatura de 34-38 °C durante un tiempo de 24-27 horas. Posteriormente, se les realizó la prueba de la oxidasa (Scharlau, ref. 01-161-500). Se cogieron las colonias sospechosas con un asa de siembra y se frotaron sobre el disco de oxidasa.

El género *Salmonella* carece de la enzima citocromo C oxidasa, último aceptor de electrones H<sub>2</sub> en el mecanismo respiratorio aeróbico. Cuando una cepa de *Salmonella* entra en contacto con un disco impregnado con tetrametil-p-fenilendiamina diclorhidrato, reactivo incoloro que dona electrones y se oxida produciendo un color púrpura intenso, el disco se mantiene incoloro, pues no hay citocromo C oxidasa que capte dichos electrones (MICROBE NOTES, 2021).

### 3.2.4.3 Tira API® 20E

A las cepas que dieron negativas para la prueba de la oxidasa se les realizó una tira API® 20E (Biomérieux, ref. 20100). Se cogieron las colonias asiladas de un cultivo puro con un asa de siembra y se suspendieron en tubos de 5 mL con agua estéril. Los tubos se homogeneizaron y las suspensiones bacterianas se inocularon con una pipeta Pasteur estéril de 1 mL en los 20 pocillos de la tira API®, cada uno con un sustrato deshidratado diferente. Algunos pocillos se sellaron con aceite de parafina, puesto que requerían condiciones de anaerobiosis (pocillos ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE). Luego, las tiras API® 20E se incubaron a una temperatura de 36-38 °C durante un tiempo de 18-24 horas.

Tras la incubación, se añadió el reactivo pertinente a los pocillos que lo necesitaban (una gota de cloruro férrico al pocillo TDA; una gota del reactivo de James al pocillo IND; y una gota de KOH al 40% más una gota de  $\alpha$ -naftol al pocillo VP). Tras esperar 10 minutos, se leyeron las tiras marcando cada prueba de cada pocillo como positiva o negativa en una plantilla. De cada plantilla se obtuvo un perfil numérico que se introdujo en un software de identificación denominado ApiWeb™. El software identificó las colonias y proporcionó las probabilidades de que fuesen del género *Salmonella* y la especie.

En la *Figura 6* se muestran los resultados para una Tira API® 20E donde todas las pruebas de todos los pocillos son negativas, y una donde todas son positivas. También se puede ver la plantilla que se introduce en ApiWeb™ rellena con un resultado positivo para *Salmonella* (positiva para 12 de las 20 pruebas).



**Figura 6:** Resultados colorimétricos para cada una de las pruebas de los pocillos y plantilla de resultados positiva para *Salmonella* (BIOMÉRIEUX, 2022a)

El diagrama de procedimiento para la detección de *Salmonella* spp. se muestra en el *Anexo 1*.

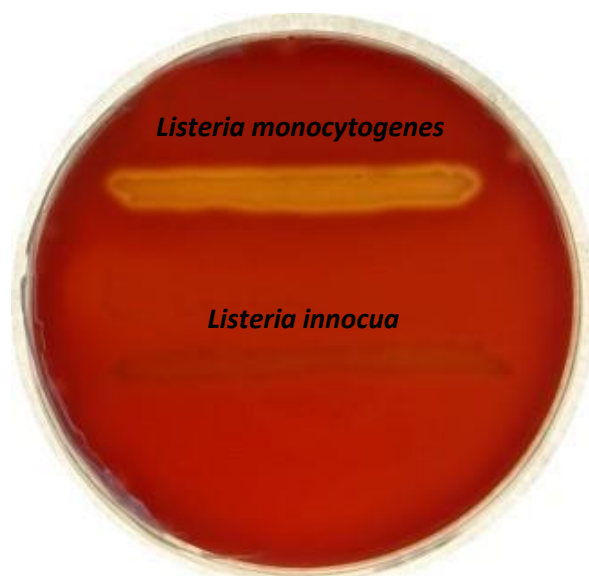
### 3.2.5 Confirmación de *Listeria monocytogenes* mediante pruebas bioquímicas

#### 3.2.5.1 Hemólisis en agar sangre

Las colonias sospechosas se inocularon con un asa de siembra en placas de agar Columbia (Scharlau, ref. 01-034-500) suplementado con sangre de caballo para determinar la reacción de

hemólisis. Se incubaron seguidamente en estufa a una temperatura de 37 °C durante un tiempo de 24-26 horas. Tras la incubación, se examinaron las cepas de análisis bajo una luz intensa para observar bien la hemólisis.

*L. monocytogenes* produce una toxina hemolítica (listeriolisina O) capaz de lisar los eritrocitos presentes en el agar Columbia suplementado con sangre de caballo. Por estas razones, alrededor de su crecimiento en este tipo de agar, muestra zonas estrechas, claras, y limpias de hemólisis ( $\beta$ -hemólisis). Sin embargo, hay otras especies de *Listeria*, como *L. ivanovii*, que suelen mostrar zonas de hemólisis anchas. También hay especies de *Listeria*, como *L. innocua*, que no muestran ninguna hemólisis ( $\gamma$ -hemólisis) alrededor del punto de inoculación (Figura 7) (Norma UNE-EN ISO 11290-1, 2017).



**Figura 7:** Hemólisis de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* en agar Columbia suplementado con sangre de caballo

### 3.2.5.2 Tira API® *Listeria*

A las cepas que originaron bandas estrechas y claras de  $\beta$ -hemólisis en el agar Columbia suplementado con sangre de caballo se les realizó una tira API® para *Listeria* (Biomérieux, ref. 10300). Se cogieron las colonias bien aisladas de un cultivo puro con un asa de siembra y se suspendieron en ampollas API® Suspension Medium de 2 mL. Las ampollas se homogeneizaron y se comprobó que presentaban una turbidez igual a 1 en la escala de McFarland. Se inocularon posteriormente con una pipeta Pasteur de 1 mL los 10 pocillos de la tira API®, cada uno con un sustrato deshidratado diferente, y luego dichas tiras se incubaron a una temperatura de 36-38 °C durante un tiempo de 18-24 horas.

Tras la incubación, se añadió el reactivo pertinente a los pocillos que lo necesitaban (en este caso, solo el pocillo DIM requería una gota del reactivo Zym B). Tras esperar 3 minutos, se leyeron las tiras marcando cada prueba de cada pocillo como positiva o negativa en una plantilla. De cada plantilla se obtuvo un perfil numérico que se introdujo en un software de identificación denominado ApiWeb™. El software identificó las colonias y proporcionó las probabilidades de que fuesen del género *Listeria* y la especie.

En la Figura 8 se muestran los resultados para una Tira API® *Listeria* donde todas las pruebas de todos los pocillos son negativas, y una donde todas son positivas. También se puede ver la

plantilla que se introduce en la base de datos rellena para que el resultado sea positivo para *L. monocytogenes* (positiva para 5 de las 10 pruebas).



**Figura 8:** Resultados colorimétricos para cada una de las pruebas de los pocillos y plantilla de resultados positiva para *Listeria monocytogenes* (BIOMÉRIEUX, 2022b)

El diagrama de procedimiento para la detección de *L. monocytogenes* se muestra en el Anexo 2.

### 3.3 Análisis microbiológico de las muestras por métodos moleculares

El análisis de las muestras con el objetivo de determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* por técnicas moleculares se realizó utilizando el sistema Assurance® GDS. Para la detección de *Salmonella* spp. se utilizó el Kit Assurance® GDS *Salmonella* Tq (Merck Millipore, ref. 71008-100), para la detección de *Listeria* spp. se utilizó el Kit Assurance® GDS *Listeria* spp. Tq (Merck Millipore, ref. 71009-100) y para la detección de *Listeria monocytogenes* se utilizó el Kit Assurance® GDS *Listeria monocytogenes* Tq (Merck Millipore, ref. 71010-100).

#### 3.3.1 Assurance® GDS *Salmonella* Tq

##### 3.3.1.1 Preparación de las muestras

Se pesaron 25 gramos de cada muestra y se añadieron a bolsas estériles para homogeneizadores tipo Stomacher. Se les añadió 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Scharlau, ref. 02-277-500) a las bolsas y se las sometió a 5 minutos de homogeneizado en el Stomacher. Las bolsas se incubaron seguidamente a una temperatura de 37 °C ± 1 °C durante 18-24 horas.

El mismo preenriquecimiento se utilizó tanto para la detección de *Salmonella* spp. por técnicas culturales como para su detección por técnicas moleculares.

### 3.3.1.2 Procesamiento de las muestras

Tras la incubación, se cogió 1 mL de la bolsa de cada muestra con una pipeta para puntas paja. Cada mL se depositó en un pocillo Assurance® GDS diferente (1 pocillo/muestra). A cada uno de los pocillos se añadieron 20 µL de reactivo de concentración (perlas magnéticas recubiertas por anticuerpos para *Salmonella* spp.) y luego estos se cubrieron con una película adhesiva.

Los pocillos sellados se colocaron en un mezclador de tipo vórtex y se agitaron durante 10-20 minutos aproximadamente a 900 rpm para que los anticuerpos de las perlas magnéticas capturaran a las bacterias objetivo.

Posteriormente, se retiraron con cuidado las películas adhesivas y se introdujo en los pocillos el dispositivo PickPen™ (Figura 9), con el que se removió la suspensión bacteriana durante 30 segundos, quedando los complejos perla-*Salmonella* retenidos por el imán.

Después de los 30 segundos, se introdujo el dispositivo PickPen™ en un segundo set de pocillos que contenían cada uno 1 mL de solución de lavado y se agitó con el mismo movimiento de antes durante 5-10 segundos para eliminar del dispositivo los restos de matriz alimentaria.

Tras el lavado, el dispositivo PickPen™ se introdujo en un tercer set de pocillos, localizados en una placa, que contenían cada uno 45 µL de solución de resuspensión y se le quitó su función imán para que los complejos perlas-*Salmonella* se soltaran del mismo y se resuspendieran en la placa.

### 3.3.1.3 Amplificación

Se retiraron los tubos de amplificación preparados de su bolsa de aluminio y se colocaron en un bloque previamente enfriado (-15 °C). Se introdujeron 30 µL de los pocillos que contenían los complejos resuspendidos dentro de los tubos de amplificación con una pipeta multi canal, y posteriormente estos tubos se introdujeron en el termociclador Assurance® Rotor-Gene® (Figura 10). Se completó la configuración y datos necesarios del programa para poder correr la qPCR, y se inició el ciclo.

## 3.3.2 Assurance® GDS *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Tq

### 3.3.2.1 Preparación de las muestras

Se pesaron 25 gramos de cada muestra y se añadieron a bolsas estériles para homogeneizadores tipo Stomacher. Se les añadió 225 mL de caldo Fraser (Scharlau, ref. 02-496-500) a media concentración a las bolsas y se las sometió a 5 minutos de homogeneizado en el Stomacher. Las bolsas se incubaron a continuación a una temperatura de 30 °C durante 22-26 horas.

El mismo enriquecimiento primario se utilizó tanto para la detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* por técnicas culturales como para su detección por técnicas moleculares.

### 3.3.2.2 Procesamiento de las muestras

Tras la incubación, se cogió 1 mL de la bolsa de cada muestra con una pipeta para puntas paja. Cada mL se depositó en un pocillo Assurance® GDS diferente (1 pocillo/muestra). A cada uno de los pocillos se le añadieron 20 µL de reactivo de concentración (perlas magnéticas recubiertas por anticuerpos para *Listeria* spp.) y luego se cubrieron con una película adhesiva.

Los pocillos sellados se colocaron en un mezclador de tipo vórtex y se agitaron durante 10-20 minutos aproximadamente a 900 rpm para que los anticuerpos de las perlas magnéticas capturaran a las bacterias objetivo.

Pasado el tiempo, se retiraron con cuidado las películas adhesivas y se introdujo en los pocillos el dispositivo PickPen™ (*Figura 9*), con el que se removió la suspensión bacteriana durante 30 segundos, quedando los complejos perla-*Listeria* retenidos por el imán.

Después de los 30 segundos, se introdujo el dispositivo PickPen™ en un segundo set de pocillos que contenían cada uno 1 mL de solución de lavado y se agitó con el mismo movimiento de antes durante 5-10 segundos para eliminar del dispositivo los restos de matriz alimentaria.

Tras el lavado, el dispositivo PickPen™ se introdujo en un tercer set de pocillos que contenían cada uno 0,5 mL de caldo Fraser (Scharlau, ref. 02-496-500) a media concentración y se le quitó su función imán para que los complejos perla-*Listeria* se soltaran del mismo y quedaran suspendidos en estos pocillos. Seguidamente los pocillos se taparon con una película adhesiva y se incubaron a una temperatura de 30 °C durante un tiempo de 4-22 horas.

Posteriormente a la segunda incubación, se retiraron con cuidado las películas adhesivas y se introdujo en los pocillos el dispositivo PickPen™, con el que se removió la suspensión bacteriana durante 30 segundos.

Después de los 30 segundos, se introdujo el dispositivo PickPen™ en un cuarto set de pocillos que contenían cada uno 1 mL de solución de lavado y se volvió a remover durante 5-10 segundos.

Tras el lavado, el dispositivo PickPen™ se introdujo en un quinto set de pocillos, localizados en una placa, que contenían cada uno 45 µL de solución de resuspensión y se le quitó su función imán para que los complejos perlas-*Listeria* se soltaran del mismo y se resuspendieran en la placa. La placa de resuspensión se incubó posteriormente a una temperatura de 60 °C durante un tiempo de 15-60 minutos.

### **3.3.2.3 Amplificación**

Se retiraron los tubos de amplificación preparados de su bolsa de aluminio y se colocaron en un bloque previamente enfriado (-15 °C). Se introdujeron 30 µL de los pocillos que contenían los complejos resuspendidos dentro de los tubos de amplificación con una pipeta multi canal, y posteriormente estos tubos se introdujeron en el termociclador Assurance® Rotor-Gene® (*Figura 10*). Se completó la configuración y datos necesarios del programa para poder correr la qPCR, y se inició el ciclo.



**Figura 9:** Dispositivo PickPen™ y placa de resuspensión. Los botones rojo y negro permiten poner los imanes para la inmunocaptura y quitarlos para soltar los complejos perla-objetivo (MERCK, 2022a)



**Figura 10:** Termociclador Rotor-Gene® Q (MERCK, 2022a)

El diagrama de procedimiento para la detección de *Listeria* y *Salmonella* mediante el sistema Assurance® GDS se muestra en el Anexo 3.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación de patógenos alimentarios por métodos clásicos

#### 4.1.1 Identificación de *Salmonella* spp.

Se investigó la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 35 muestras de frutas y verduras orgánicas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2 *Análisis microbiológico de las muestras por métodos clásicos* de *MATERIALES Y MÉTODOS*.

Tras el aislamiento de *Salmonella* spp. en dos tipos de medios selectivos diferentes: agar XLD y agar Cromogénico para *Salmonella*, se obtuvieron presuntas colonias sospechosas en ambos.

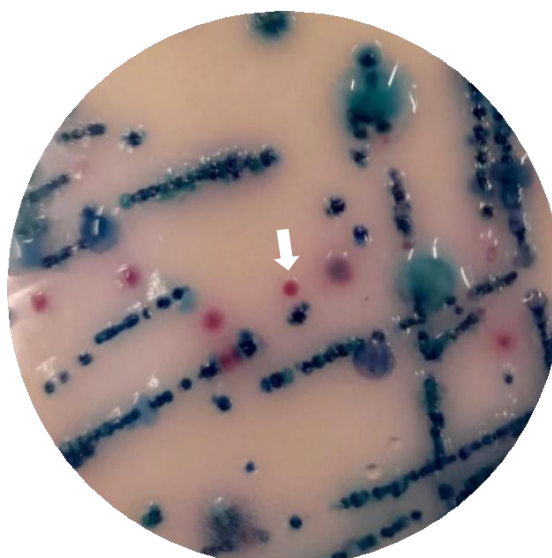
En algunas placas de agar XLD, como por ejemplo la placa de la *Figura 11*, se encontraron colonias con zonas transparentes de color rojizo. Sin embargo, estas carecían de la típica zona central de color negro que tienen los cultivos de *Salmonella* en este tipo de agar. Aun así, se consideraron colonias sospechosas pues hay *Salmonellas* que no son capaces de producir H<sub>2</sub>S (Wu *et al.*, 2016), compuesto responsable del ennegrecimiento del centro de las colonias.

En algunas placas de agar Cromogénico para *Salmonella*, como por ejemplo las placas de las *Figuras 12*, *13*, y *14*, se encontraron colonias malva y magenta. Se consideraron colonias sospechosas pues al originar dicho color en el agar significaba que disponían de la enzima caprilato esterasa, al igual que el género *Salmonella* (Cooke *et al.*, 1999).

Las colonias sospechosas se encuentran señaladas con una flecha en las diferentes figuras.



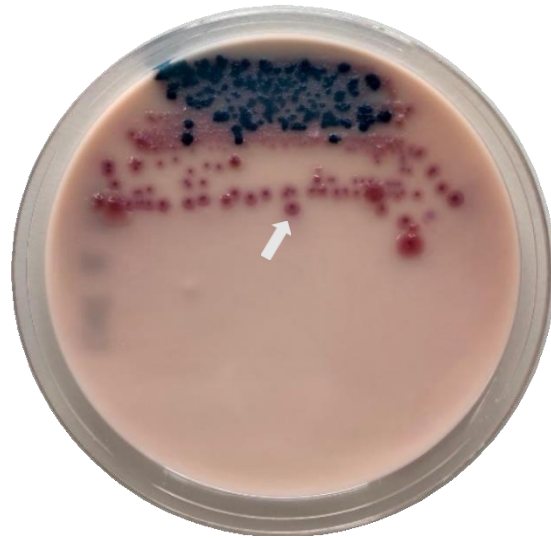
**Figura 11:** Muestra EF100. Colonias sospechosas de *Salmonella* spp. en agar de Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) (aparecen señaladas)



**Figura 12:** Muestra EF72. Colonias sospechosas de *Salmonella* spp. en agar Cromogénico para *Salmonella* (aparecen señaladas)

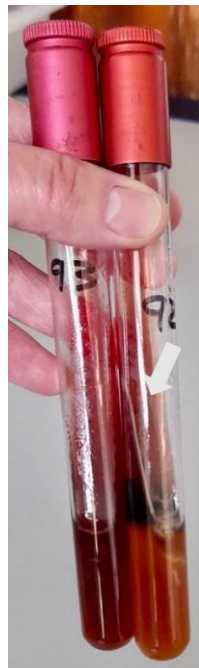


**Figura 13:** Muestra EF111. Colonias sospechosas de *Salmonella* spp. en agar Cromogénico para *Salmonella* (aparecen señaladas)



**Figura 14:** Muestra EF100. Colonias sospechosas de *Salmonella* spp. en agar Cromogénico para *Salmonella* (aparecen señaladas)

Se seleccionaron las presuntas colonias sospechosas de cada medio de cultivo y se procedió a su identificación a través de agares TSI. En la derecha de la *Figura 15* se muestra un agar TSI positivo con la apariencia típica de un cultivo de *Salmonella*: fondo amarillo (consecuencia de los productos ácidos que se producen durante la fermentación de la glucosa) y ennegrecido (consecuencia de la formación de  $H_2S$ ) y superficie rojiza (consecuencia de la producción de aminas durante el metabolismo de las proteínas). En la izquierda se muestra un agar TSI negativo para *Salmonella*, pues la apariencia tras la incubación no es la característica de este género.



**Figura 15:** Agar Triple Sugar Iron (TSI) positivo para la muestra EF92 (aparece señalado) y TSI negativo para la muestra EF93

A las cepas que originaron agares TSI con el aspecto típico descrito anteriormente (fondo amarillo y ennegrecido y superficie rojiza), se les realizó la prueba de la oxidasa.

A las cepas que fueron oxidasa negativas, es decir, que no pudieron oxidar el reactivo impregnado en los discos al carecer de citocromo C oxidasa, se les realizó una tira API® 20E (para enterobacterias) para confirmar su identificación. Esto es debido a que el género *Salmonella* también carece de dicha enzima (Andino & Hanning, 2015).

En la *Figura 16* se muestra un ejemplo de tira API® 20E realizada a una cepa de la muestra EF111 que dio resultado negativo en la prueba de la oxidasa y que originó un TSI con aspecto sospechoso. Tras introducir los resultados de dicha tira en el software ApiWeb™ se identificó que la cepa pertenecía con una probabilidad del 92,2 % al género *Pantoea* y no al género *Salmonella*. Otro género identificado fue *Pseudomonas*.



**Figura 16:** Tira API® 20E de una cepa sospechosa de la muestra EF111 (resultado: género *Pantoea*)

De las 35 muestras analizadas, en ninguna se detectó la presencia de *Salmonella* spp. a través de técnicas clásicas de cultivo. La ausencia de dichos microorganismos en nuestras muestras puede deberse a que realmente no estén presentes, pero también a que estén presentes en cantidades inferiores al límite de detección de las técnicas de cultivo empleadas o a la presencia de salmonellas con daños subletales que no han podido recuperarse a lo largo del procedimiento.

Al consultar la bibliografía científica publicada, se puede comprobar que nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos en otros estudios de la calidad y seguridad microbiológica de frutas y verduras ecológicas. Ceuppens *et al.* (2014) analizaron 75 muestras de lechugas orgánicas procedentes de 6 granjas diferentes de Brasil y encontraron la presencia de *Salmonella* en solo 1 de las lechugas (1,33 %). de Quadros Rodrigues *et al.* (2014) también detectaron la presencia de *Salmonella* en 1 (2,77 %) de las 36 lechugas orgánicas analizadas procedentes de 3 granjas diferentes de Brasil. Marine *et al.* (2015) aislaron *Salmonella* de 4 (2,24 %) de las 178 muestras de verdura de hoja verde estudiadas procedentes de 17 granjas orgánicas de Estados Unidos. Y, finalmente, Ortiz *et al.* (2020) no detectaron la presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las 152 muestras de fresas frescas analizadas procedentes de 18 supermercados nacionales y campos de España (mayoritariamente de la provincia de Huelva).

Sin embargo, en dicha bibliografía científica también existen estudios con resultados muy diferentes a los obtenidos en este trabajo. Nguz *et al.* (2005) analizaron 160 muestras de diferentes vegetales orgánicos (maíz, frijoles, zanahorias, guisantes, judías verdes...) producidos en Zambia y encontraron la presencia de *Salmonella* en 37 de las muestras (23,1 %). Nguyen *et al.* (2021) detectaron la presencia del género *Salmonella* en 74 (12,9 %) de las 572 muestras de verduras frescas procedentes de comercios minoristas de Vietnam.

El hecho de que la presencia de *Salmonella* spp. en frutas y verduras orgánicas sea tan diferente a lo largo de la bibliografía (oscila entre el 0 % y el 23,1 %), puede deberse a la existencia de ciertos factores asociados a la presencia de dichas bacterias: temperatura, humedad, condiciones de producción, manipulación y comercialización, etc.

#### 4.1.2 Identificación de *Listeria monocytogenes*

Se investigó la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 35 muestras de frutas y verduras orgánicas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2 *Análisis microbiológico de las muestras por métodos clásicos* de *MATERIALES Y MÉTODOS*.

Tras el aislamiento de *L. monocytogenes* en dos tipos de medios selectivos diferentes: agar ALOA y agar PALCAM, se obtuvieron presuntas colonias sospechosas en ambos.

En algunas placas de agar ALOA, como por ejemplo la placa de la *Figura 17*, se encontraron colonias con color azulado. Sin embargo, estas carecían del típico halo opaco que se origina alrededor de las colonias de *L. monocytogenes* en este tipo de agar. Aun así, se consideraron colonias sospechosas, ya que pueden existir cepas de *L. monocytogenes* con menores niveles de expresión de las enzimas fosfolipasas PI-PLC, responsables de hidrolizar el fosfatidilinositol y producir dicho halo blanco opaco alrededor de la colonia (Muchaamba *et al.*, 2022).

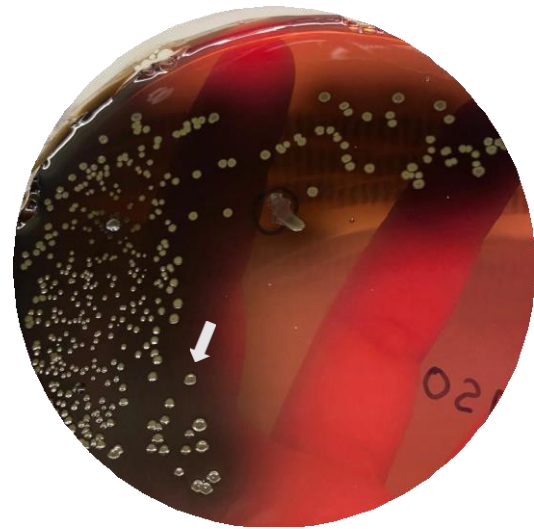


**Figura 17:** Muestra EF104. Colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* en agar de *Listeria* conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA) (aparecen señaladas)

En algunas placas de agar PALCAM, como las de las *Figuras 18* y *19*, se encontraron colonias con un color gris verdoso y un núcleo negro y hundido, aspecto típico de las colonias de *L. monocytogenes* en este tipo de agar. Además, también se pudo observar un oscurecimiento del medio, lo que significaba que las colonias eran capaces de hidrolizar la esculina, al igual que *L. monocytogenes*.



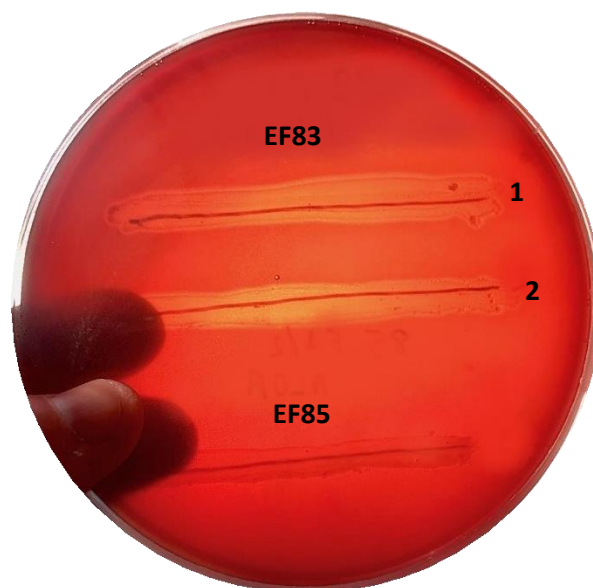
**Figura 18:** Muestra EF92. Colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* en agar Polimixina, Acriflavina, Cloruro de litio, Ceftazidima, Esculina, Manitol (PALCAM) (aparecen señaladas)



**Figura 19:** Muestra EF83. Colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* en agar Polimixina, Acriflavina, Cloruro de litio, Ceftazidima, Esculina, Manitol (PALCAM) (aparecen señaladas)

Se seleccionaron las presuntas colonias sospechosas de cada medio de cultivo y se procedió a su identificación a través de la presencia de hemólisis en agares de sangre.

En la *Figura 20*, se puede observar en torno al crecimiento de dos aislados de la muestra EF83, un pequeño halo de hemólisis ( $\beta$ -hemólisis) similar al que forma *L. monocytogenes* al poseer la toxina hemolítica listeriolisina O. Las colonias  $\beta$ -hemolíticas en agar Columbia suplementado con sangre siguieron siendo sospechosas. También se puede ver que alrededor del crecimiento de la muestra EF85 no apareció hemólisis. Las colonias no hemolíticas dejaron de ser sospechosas, por lo que fueron descartadas.



**Figura 20:** Agar sangre de dos aislados de la muestra EF83 y uno de la muestra EF85

En la *Figura 21* se pueden ver halos de hemólisis muy grandes alrededor de las colonias de la muestra EF78. Dichos halos son demasiado grandes para que se trate de *L. monocytogenes*, sin embargo, pueden pertenecer a especies  $\beta$ -hemolíticas de los géneros *Streptococcus* y *Bacillus* que pueden crecer en agar ALOA con el mismo fenotipo que *Listeria* (colonias azuladas). Este tipo de hemólisis descarta a las colonias como sospechosas.



**Figura 21:** Muestra EF78. Agar sangre con crecimiento hemolítico

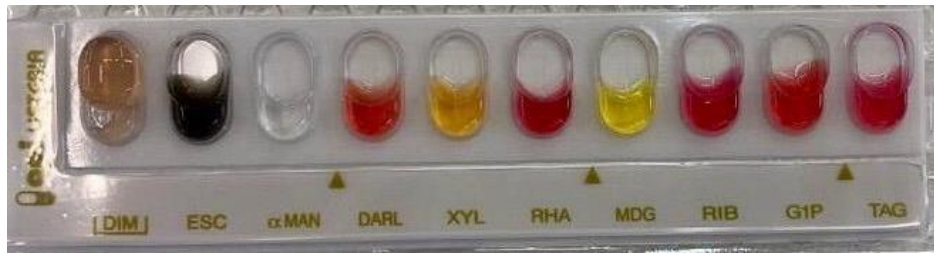
A las colonias que entorno a su crecimiento en agar de sangre originaron un halo de hemólisis pequeño-mediano se les realizó una tira API® para *Listeria*.

En la *Figura 22* se muestra un ejemplo de tira API® para *Listeria* realizada a una cepa de la muestra EF102. Tras introducir los resultados de la tira en el software ApiWeb™ se identificó que la cepa sí pertenecía al género *Listeria*, pero a la especie *L. grayi* con una probabilidad del 99,9 %.



**Figura 22:** Tira API® para *Listeria* de una cepa sospechosa de la muestra EF102 (resultado: *Listeria grayi*)

En la *Figura 23* se muestra otro ejemplo con otros resultados de tira API® para *Listeria* realizada a una cepa de la muestra EF110. Tras introducir los resultados de la tira en el software ApiWeb™ se identificó que la colonia sí pertenecía al género *Listeria*, pero a la especie *L. seeligeri* con una probabilidad del 93,3 %.



**Figura 23:** Tira API® para *Listeria* de una colonia sospechosa de la muestra EF110 (resultado: *Listeria seeligeri*)

De las 35 muestras analizadas, en ninguna se detectó la presencia de *L. monocytogenes*. Sin embargo, tal y como se muestra en la *Tabla 5*, sí que se aislaron 9 cepas (25,71 %) del mismo género pertenecientes a otras especies. De estas 9 muestras positivas, en 5 (55,56 %) se detectó presencia de *L. grayi* y en 4 (44,44 %) la presencia de *L. seeligeri*.

**Tabla 5:** Muestras en las que se ha encontrado presencia de bacterias del género *Listeria*

Nombre de la muestra	Identificación
EF83	<i>Listeria grayi</i>
EF85	<i>Listeria seeligeri</i>
EF86	<i>Listeria seeligeri</i>
EF92	<i>Listeria seeligeri</i>
EF94	<i>Listeria grayi</i>
EF101	<i>Listeria grayi</i>
EF102	<i>Listeria grayi</i>
EF103	<i>Listeria grayi</i>
EF110	<i>Listeria seeligeri</i>

Al consultar la bibliografía científica publicada, se puede comprobar que nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos en otros estudios de la calidad y seguridad microbiológica de frutas y verduras ecológicas. Loncarevic *et al.* (2005) analizaron 179 muestras de lechugas orgánicas procedentes de 12 productores diferentes de Noruega y encontraron la presencia de *L. monocytogenes* en 2 de las muestras (1,11 %). Ortiz *et al.* (2020) no detectaron la presencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las 152 muestras de fresas frescas analizadas procedentes de 18 supermercados nacionales y campos de España (mayoritariamente de la provincia de Huelva).

Sin embargo, en dicha bibliografía científica también existen estudios con resultados muy diferentes a los obtenidos en este trabajo. Tango *et al.* (2014) analizaron 63 muestras de diferentes vegetales orgánicos (espinacas, lechuga romana y hojas de sésamo verde) producidos en Corea y encontraron la presencia de *L. monocytogenes* en 10 de las muestras (15,8 %). Nguz *et al.* (2005) detectaron la presencia de *L. monocytogenes* en 16 (20 %) de las 80 muestras de verduras frescas analizadas producidos en Zambia.

Normalmente, la presencia de *L. monocytogenes* en frutas y verduras orgánicas es baja, el hecho de que se hayan encontrado presencias elevadas en algunos artículos de la bibliografía puede

deberse a que dichos estudios se han realizado en países en desarrollo con dificultad para mantener las condiciones de higiene, con presencia de vectores en las áreas de cultivo, etc.

Es importante comentar que, aunque no se haya encontrado la presencia de *L. monocytogenes* en productos hortícolas orgánicos a través de técnicas de cultivo durante este trabajo, sí se ha encontrado presencia de *L. grayi* y *L. seeligeri*. Aunque *L. grayi* no se considera un patógeno habitual, ha llegado a producir casos de bacteriemia en pacientes susceptibles (por ejemplo, pacientes receptores de trasplantes), por lo que es importante controlar también su presencia en los alimentos (Rapose *et al.*, 2008).

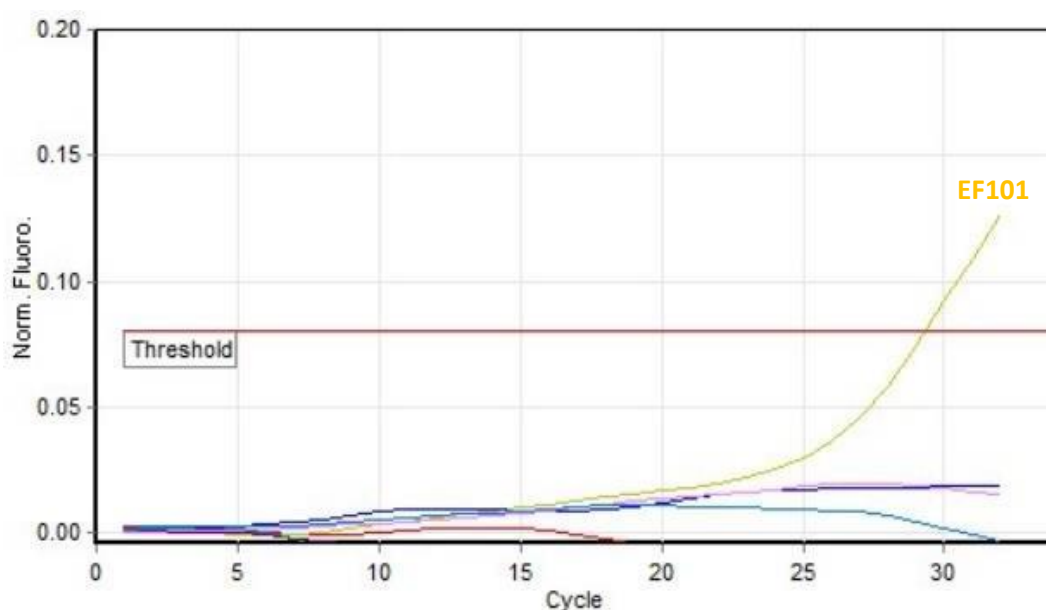
## 4.2 Identificación de patógenos alimentarios por métodos moleculares:

### 4.2.1 Identificación de *Salmonella* spp.

Se analizó la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 35 muestras de frutas y verduras orgánicas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3 *Análisis microbiológico de las muestras por métodos moleculares* de MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizó el sistema Assurance® GDS, que incluye un análisis qPCR, para la detección de ADN genómico de *Salmonella* spp. en caldos preenriquecidos de cada una de las muestras.

En total, solamente 1 (2,85 %) de las 35 muestras fue positiva para *Salmonella* a través del sistema Assurance® GDS. Tal y como se ve en la *Figura 24*, la muestra positiva fue la EF101. Sin embargo, no se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en esta muestra a través de las técnicas de cultivo clásicas. Además, no hubo ninguna muestra que fuera negativa por Assurance® GDS y que hubiese sido positiva por cultivo.



**Figura 24:** Gráfica resultante del análisis qPCR para *Salmonella* spp. de las muestras EF92, EF93, EF94, EF100, EF101 y EF102

La información completa del ensayo se detalla en el *Anexo 4*.

La positividad de la muestra EF101 con cultivo negativo por qPCR podría ser debida a la existencia en el caldo de preenriquecimiento de células de *Salmonella* no viables (células con daños letales) o viables, pero no cultivables (VBNC). Esto explicaría que el DNA genómico de



estas células hubiese sido detectado por qPCR y que no se hubiesen obtenido colonias en las placas de agar selectivo.

Otra posible hipótesis podría ser que el número de células de *Salmonella* estuviese en el caldo preenriquecido por debajo del límite de detección de los métodos culturales, pero suficiente para su detección a través de técnicas moleculares.

También es posible que dichas bacterias no pudiesen crecer en las placas de agar sólido selectivo utilizadas para el cultivo clásico porque hubiese microbiota acompañante que inhibiese su crecimiento (Paniel & Noguer, 2019).

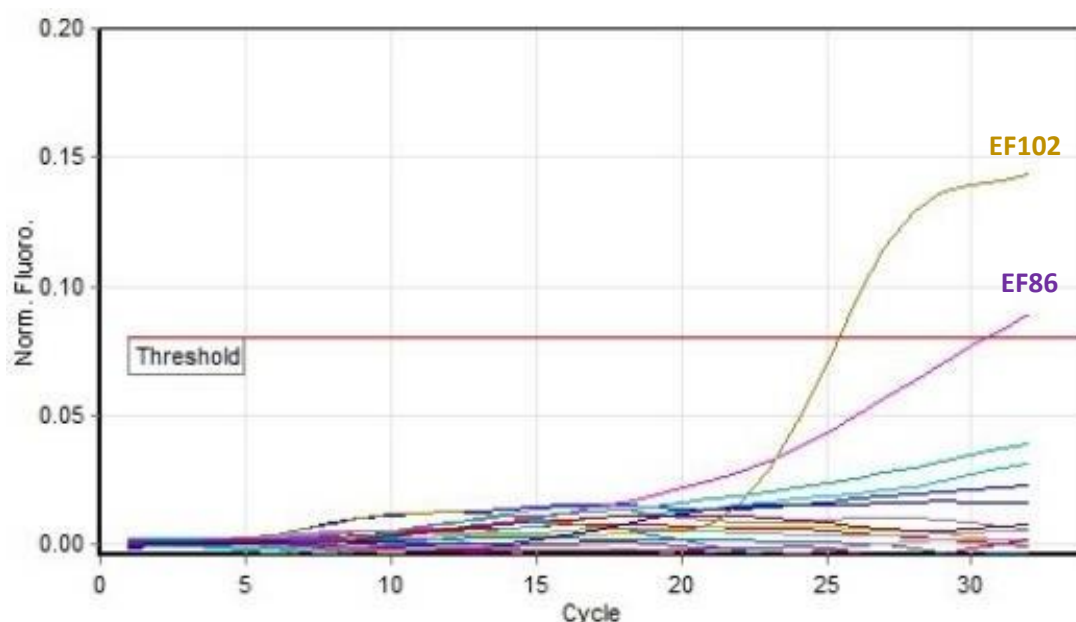
Aunque las técnicas moleculares (qPCR) sean más sensibles y específicas que las técnicas de cultivo, tal y como se ha demostrado, también presentan limitaciones, pues no permiten diferenciar entre DNA viable y no viable. No obstante, para lograr discriminar entre ambos tipos de células por métodos moleculares se han desarrollado otras técnicas como el uso del intercalante de DNA propidio monoazida (PMA) (Vesga *et al.*, 2018).

#### 4.2.2 Identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp.

Se analizó la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. en 35 muestras de frutas y verduras orgánicas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3 *Análisis microbiológico de las muestras por métodos moleculares de MATERIALES Y MÉTODOS*.

Se utilizó el sistema Assurance® GDS, que incluye un análisis qPCR, para la detección de ADN genómico de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en caldos preenriquecidos de cada una de las muestras.

Ninguna de las 35 muestras fue positiva para *L. monocytogenes* a través del sistema Assurance® GDS. Esto coincide con los resultados obtenidos por cultivo. Sin embargo, no ocurre lo mismo para *Listeria* spp. De las 9 muestras en las que se detectó la presencia de *Listeria* spp. por métodos culturales, solo 2 (5,71 %) de las 35 muestras totales dieron resultados positivos por qPCR. Tal y como se ve en la *Figura 25*, las dos muestras positivas fueron la EF86 y la EF102.



**Figura 25:** Gráfica resultante del análisis qPCR para *Listeria* spp. de 27 muestras.

La información completa del ensayo se detalla en el *Anexo 4*.

La negatividad de las muestras EF83, EF85, EF92, EF94, EF101, EF103 y EF110 con cultivo positivo por qPCR (en el caso de que fuesen falsos negativos) podría ser debida a la degradación de las secuencias de DNA diana en la muestra. Sin embargo, no podría explicarse por la inhibición de la reacción de amplificación pues se concentraron las bacterias diana presentes en las muestras eliminando sustancias de la matriz alimentaria que pudiesen interferir en la reacción (separación inmunomagnética) y los controles internos de amplificación no indicaron lo contrario (Paniel & Noguera, 2019).

Otra hipótesis podría ser que las muestras EF83, EF85, EF92, EF94, EF101, EF103 y EF110 no fuesen falsos negativos, sino que fuesen falsos positivos obtenidos por cultivo, como resultado de una interpretación errónea del cambio de color de las tiras API® y, por tanto, de un patrón numérico incorrecto similar al de alguna especie de *Listeria*. Los falsos positivos también podrían obtenerse como resultado de que la suspensión bacteriana utilizada para rehidratar los pocillos de las tiras API® no fuese un cultivo puro. De este modo habría varios tipos de células bacterianas, con varios tipos de enzimas y características, que darían lugar a un patrón numérico incorrecto que coincidiría también con el patrón numérico de alguna especie de *Listeria*.

Estudios recientes han demostrado que la especificidad del medio ALOA, medio selectivo obligatorio en las normas UNE-EN ISO para la detección de *Listeria*, podría mejorarse, ya que se han descrito otros géneros capaces de originar un fenotipo similar al de *Listeria* spp. en este medio: *Bacillus* spp., *Cellulosimicrobium* spp., *Enterococcus* spp., *Kocuria* spp., *Rothia* spp., *Marinilactibacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. (Angelidis *et al.*, 2015).

La imposibilidad de poder distinguir fenotípicamente estos géneros entre sí en el medio ALOA, juntamente con que las pruebas bioquímicas recomendadas por las normas ISO para la confirmación de *Listeria* spp. no siempre son adecuadas para diferenciar a nivel de género, hacen que la confirmación inequívoca de aislados microbianos de color verde azulado muchas veces no sea posible, conduciendo a falsos positivos.

Para evitar una identificación errónea se propone incorporar otras pruebas más específicas, como, por ejemplo, la secuenciación de la subunidad 16S del rRNA del aislado sospechoso, marcadores genéticos específicos de *Listeria* spp., evaluaciones de la movilidad, etc.

Estas propuestas podrían desarrollarse en un futuro para estudiar una mejor combinación entre las técnicas culturales y moleculares para la detección de microorganismos patógenos presentes en frutas y verduras orgánicas.

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son:

1. No se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las 35 muestras analizadas mediante las técnicas de cultivo, sin embargo, empleando las técnicas moleculares, sí que se detectó *Salmonella* spp. en una de ellas, lo que pone de manifiesto la mayor sensibilidad de la qPCR frente al cultivo.
2. No se detectó *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras, ni por cultivo ni por qPCR. Esto indicaría que se deben mejorar ambos métodos para la detección de este microorganismo.
3. Se han aislado otras especies del género *Listeria* (*Listeria grayi* y *Listeria seeligeri*) en 9 de las muestras por técnicas de cultivo, de ellas, solamente en dos se detectó presencia de *Listeria* spp. por técnicas moleculares, sin poder diferenciar especie ni viabilidad celular de los aislados. Estos resultados destacan la sensibilidad del cultivo para detectar otras especies de *Listeria* frente a la qPCR.
4. Se debe mejorar la formulación del medio ALOA para aumentar su selectividad hacia el género *Listeria*, tal y como se recomienda en algunas publicaciones, ya que existe una elevada dificultad a la hora de diferenciar entre colonias de *Listeria* spp. y colonias de otro género capaces de originar el mismo fenotipo verde azulado en dicho medio.
5. Nuestros resultados de aislamiento e identificación por cultivo y la detección molecular por qPCR confirman que ambas técnicas presentan limitaciones, por lo que se debería continuar con la mejora de ambas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2022). *Salmonelosis*. Visto el 18 de mayo de 2022. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm)
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2019). *Listeriosis*. Visto el 18 de mayo de 2022. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/listeria.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm)
- Allerberger, F. (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00447-9](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00447-9)
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Angelidis, A. S., Kalamaki, M. S., & Georgiadou, S. S. (2015). Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a  $\beta$ -D-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *International Journal of Food Microbiology*, 193, 114–129. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.10.022>
- ApiWeb™ Biomérieux (2022a). *Tira API® Listeria*. Visto el 28 de mayo de 2022. <https://apiweb.biomerieux.com/colorCheck/21?v=2>
- ApiWeb™ Biomérieux (2022b). *Tira API® 20E*. Visto el 28 de mayo de 2022. <https://apiweb.biomerieux.com/colorCheck/1?v=2>
- Brandão, D., Liébana, S., & Pividori, M. I. (2015). Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles. *New Biotechnology*, 32(5), 511–520. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2015.03.011>
- Brantsaeter, A. L., Ydersbond, T. A., Hoppin, J. A., Haugen, M., & Meltzer, H. M. (2017). *Organic Food in the Diet: Exposure and Health Implications*. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth>
- Ceuppens, S., Hessel, C. T., de Quadros Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>
- Cooke, V. M., Miles, R. J., Price, R. G., & Richardson, A. C. (1999). A Novel Chromogenic Ester Agar Medium for Detection of *Salmonellae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 807–812. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.807-812.1999>
- de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host–Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002933>
- de Quadros Rodrigues, R., Loiko, M. R., Minéia Daniel de Paula, C., Hessel, C. T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., Bender, R. J., & Tondo, E. C. (2014). Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control*, 42, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>

EFSA (European Food Safety Authority) (2019). Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018;16(12):5500, 268 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971, 47 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>

Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/FOODS10050907>

ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria) (2013). *Listeria monocytogenes*. Visto el 19 de mayo de 2022. <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/Copia-de-4.Listeria.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1999a). *What is organic agriculture?*. Visto el 10 de mayo de 2022. <https://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq1/en>.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1999b). *Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos de Críticos de Control (HACCP) y Directrices para su aplicación*. Visto el 11 de mayo de 2022. <https://www.fao.org/3/Y1579S/y1579s03.htm#bm3.4>

FDA (Food and Drug Administration) (2019). *Salmonella (salmonellosis)*. Visto el 18 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/salmonella-salmonellosis>

FDA (Food and Drug Administration) (2020a). *Outbreak Investigation of Listeria monocytogenes: Enoki Mushrooms*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-listeria-monocytogenes-enoki-mushrooms-march-2020>

FDA (Food and Drug Administration) (2020b). *Outbreak Investigation of Salmonella enteritidis: Peaches*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-salmonella-enteritidis-peaches-august-2020>

FDA (Food and Drug Administration) (2021a). *Outbreak Investigation of E. coli O157:H7: Spinach*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-e-coli-o157h7-spinach-november-2021>

FDA (Food and Drug Administration) (2021b). *Outbreak Investigation of Salmonella oranienburg: Whole, Fresh Onions*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-salmonella-oranienburg-whole-fresh-onions-october-2021>

FDA (Food and Drug Administration) (2022a). *Most common foodborne illnesses*. Visto el 30 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/files/food/published/Most-Common-Foodborne-Illnesses-%28PDF%29.pdf>

FDA (Food and Drug Administration) (2022b). *Outbreak Investigation of E. coli O157:H7: Power Greens Packaged Salad*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-e-coli-o157h7-power-greens-packaged-salad-january-2022>

FDA (Food and Drug Administration) (2022c). *Outbreak Investigation of Listeria monocytogenes: Dole Packaged Salad*. Visto el 15 de mayo de 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-listeria-monocytogenes-dole-packaged-salad-december-2021>

Fisher Scientific (2022a). *Thermo Scientific™ Base de agar Oxoid™ Brilliance™ salmonela*. Visto el 30 de mayo de 2022. <https://www.fishersci.es/shop/products/brilliance-salmonella-agar-base-1/11934112#:~:text=El%20agar%20Thermo%20Scientific%20Oxoid%20Brilliance%20salmonela%2C%20medio,versiones%20de%20este%20producto%20C3%B3digo%20de%20producto.%2011934112>

Fisher Scientific (2022b). *Chromogenic Listeria Agar (ISO)*. Visto el 30 de mayo de 2022. [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1084&org=91#:~:text=Code%3A%20CM1084%20a%20medium%20for%20isolation%2C%20enumeration%20and,%2A%20Adjusted%20as%20required%20to%20meet%20performance%20standards](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1084&org=91#:~:text=Code%3A%20CM1084%20a%20medium%20for%20isolation%2C%20enumeration%20and,%2A%20Adjusted%20as%20required%20to%20meet%20performance%20standards)

Foddai, A. C. G., & Grant, I. R. (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4281–4288. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10542-X/TABLES/2>

García-Álvarez, M., Chaves, F., Sanz, F., & Otero, J. R. (2006). Epidemiología molecular de las infecciones por *Listeria monocytogenes* en un área de Madrid durante un período de 3 años (2001-2003). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), 86–89. <https://doi.org/10.1157/13085014>

Giampieri, F., Mazzoni, L., Cianciosi, D., Alvarez-Suarez, J. M., Regolo, L., Sánchez-González, C., Capocasa, F., Xiao, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2022). Organic vs conventional plant-based foods: A review. *Food Chemistry*, 383. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132352>

Giannella, R. A. (1996). *Salmonella*. In: *Medical Microbiology, 4<sup>th</sup> edition*. Editor: Samuel Baron. Galveston (TX). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>

Gil, Marielsa (2019). Agar TSI: fundamento, preparación y usos. *Lifeder*. Visto el 30 de mayo de 2022. <https://www.lifeder.com/agar-tsi/>

Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. v., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. In: *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 213–231). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>

Hurtado-Barroso, S., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2019). Organic food and the impact on human health. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 4, pp. 704–714). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1394815>

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). *Salmonella*. In: *Microorganisms in foods 5. Characteristics of microbial pathogens*. Blackie Academic and Professional. London: 217–264.

IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements) Organics International (2008). *Definition of Organic Agriculture*. Visto el 10 de mayo de 2022. <https://www.ifoam.bio/why-organic/organic-landmarks/definition-organic>.

Ireton, K. (2007). Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 9(6), 1365–1375. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2007.00933.X>

Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *International Journal of Food Science*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>

Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1811>

Kuan, C. H., Rukayadi, Y., Ahmad, S. H., Wan Mohamed Radzi, C. W. J., Thung, T. Y., Premarathne, J. M. K. J. K., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Tan, C. W., Ramzi, O. B., Mohd Fadzil, S. N., Kuan, C. S., Yeo, S. K., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2017). Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01433>

Lecturio (2022). *The lecturio Medical Concept Library (Listeria monocytogenes/Listeriosis)*. Visto el 27 de mayo de 2022. <https://www.lecturio.com/concepts/listeria-monocytogenes-infections/>

Loncarevic, S., Johannessen, G. S., & Rørvik, L. M. (2005). Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), 186–189. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01730.x>

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. Editorial PEARSON – Prentice Hall. 1089 pp.

Marine, S. C., Pagadala, S., Wang, F., Pahl, D. M., Melendez, M. v., Kline, W. L., Oni, R. A., Walsh, C. S., Everts, K. L., Buchanan, R. L., & Micallef, S. A. (2015). The growing season, but not the farming system, is a food safety risk determinant for leafy greens in the Mid-Atlantic Region of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2395–2407. <https://doi.org/10.1128/AEM.00051-15>

Merck & Co (2022a). *Molecular Detection for Rapid Food Pathogen Testing and Identification*. Visto el 20 de mayo de 2020. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/assurance-gds-genetic-detection>

Merck & Co (2022b). Assurance® GDS *Salmonella* Tq. Visto el 29 de mayo de 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/516/403/71008bc-dfu-ds5773en-mk.pdf>

Microbe Notes (2021). *Oxidase Test – Principle, Procedure and Results*. Visto el 27 de mayo de 2022. <https://microbenotes.com/oxidase-test-principle-procedure-and-results/>

- Muchaamba, F., Eshwar, A. K., Stevens, M. J. A., Stephan, R., & Tasara, T. (2022). Different Shades of *Listeria monocytogenes*: Strain, Serotype, and Lineage-Based Variability in Virulence and Stress Tolerance Profiles. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.792162/FULL>
- Naciones Unidas (2022). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Visto el 30 de junio de 2022. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>
- Nguyen, T. K., Bui, H. T., Truong, T. A., Lam, D. N., Ikeuchi, S., Ly, L. K. T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., & Hayashidani, H. (2021). Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 341. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109049>
- Nguz, K., Shindano, J., Samapundo, S., & Huyghebaert, A. (2005). Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control*, 16(7), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.07.001>
- Norma UNE-EN ISO 11290-1 (2017). *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. Part 1: Detection method*. Visto el 28 de mayo de 2022. <https://www.iso.org/standard/60313.html>
- Norma UNE-EN ISO 6579-1 (2017). *Horizontal method for the detection, enumeration, and serotyping of Salmonella. Part 1: Detection of Salmonella spp.* Visto el 28 de mayo de 2022. <https://www.iso.org/standard/56712.html>
- Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.04.016>
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018). *Listeriosis*. Visto el 18 de mayo de 2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2021). Educación en inocuidad de alimentos. Visitado el 30 de mayo de 2022. [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es)
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2022). *Foodborne diseases*. Visto el 11 de mayo de 2022. [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1)
- Ortiz-Solà, J., Viñas, I., Colás-Medà, P., Anguera, M., & Abadías, M. (2020). Occurrence of selected viral and bacterial pathogens and microbiological quality of fresh and frozen strawberries sold in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108392>
- Paniel, N., & Noguer, T. (2019). Detection of *Salmonella* in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/FOODS8090371>
- Parra, M., Máttar, S. & Durango, J. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2),187-200. ISSN: 0122-0268. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69370201>



Rapose, A., Lick, S. D., & Ismail, N. (2008). *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 10(6), 434–436. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3062.2008.00333.X>

Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2018). *Listeria* - Detection by Classical Cultural Techniques. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22614-0>

Scharlau Microbiology (2021a). *Ficha De Datos Técnicos Agar Xilosa Lisina Desoxicolato*. Visto el 30 de mayo de 2022. <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-211-500>

Scharlau Microbiology (2021b). *Ficha De Datos Técnicos Agar Base Palcam*. Visto el 30 de mayo de 2022. <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-470-500>

Tango, C. N., Choi, N. J., Chung, M. S., & Oh, D. H. (2014). Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1411–1417. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-514>

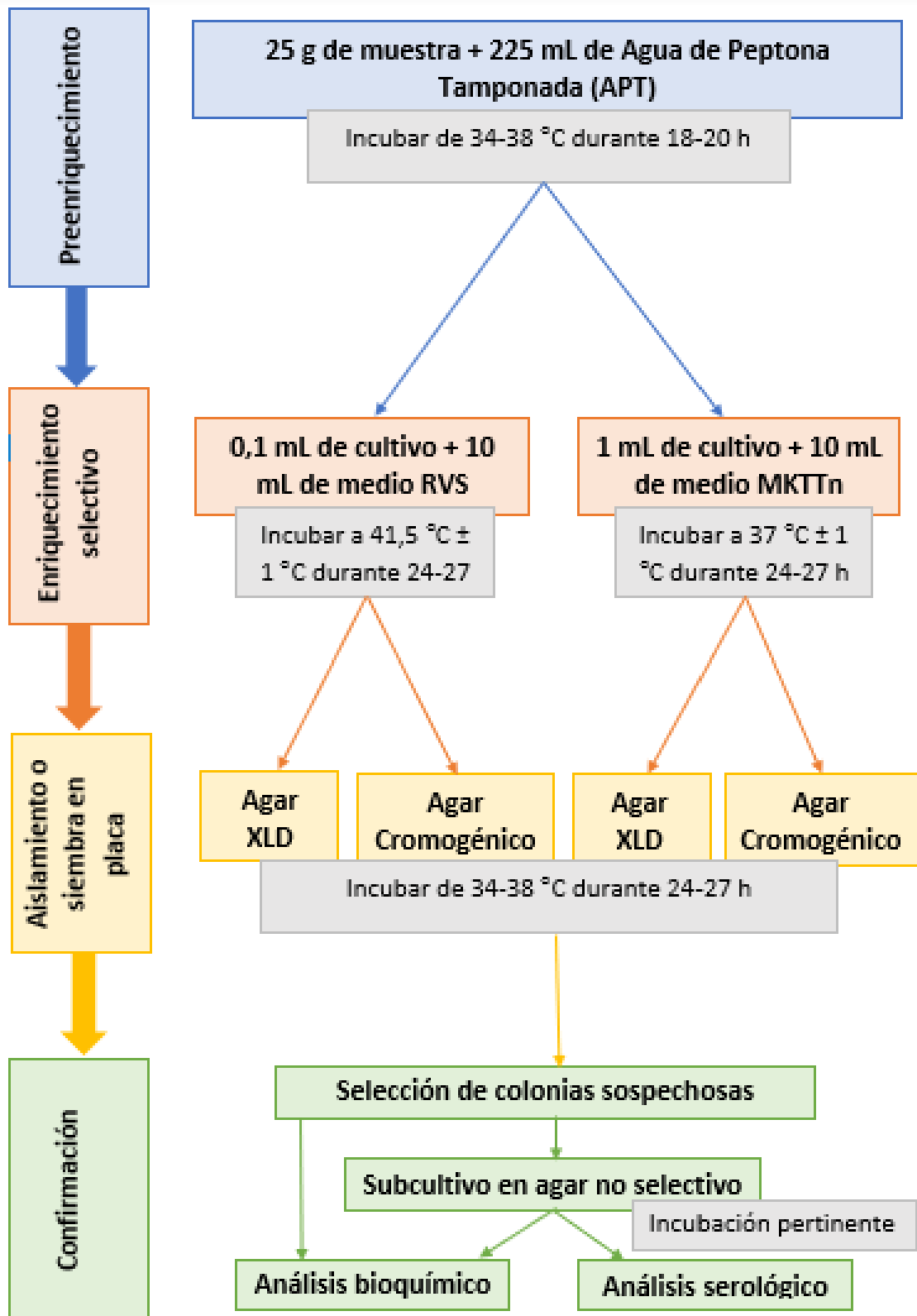
Vesga, F. J., Moreno, Y., Ferrús, M. A., Campos, C., & Trespalacios, A. A. (2018). Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(4), 595–601. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2018.04.010>

Wang, H., & Hammack, T. S. (2014). *SALMONELLA* - Detection by Classical Cultural Techniques. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 332–338. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00297-4>

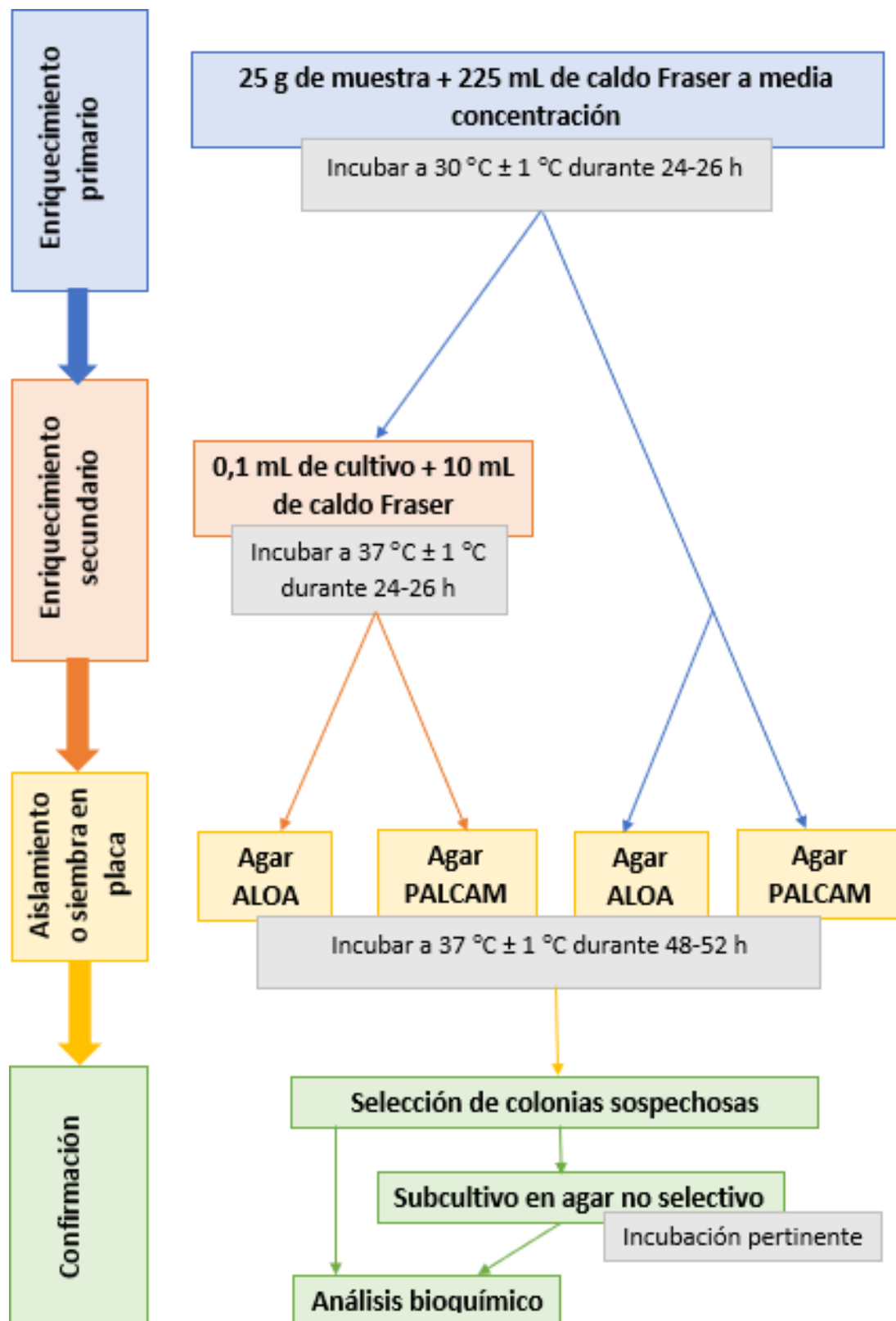
Willer, H., Meier, C., Schlatter, B., Dietemann, L., Kemper, L., & Trávnicek, J. (2021). The World of Organic Agriculture 2021: Summary, in: *The world of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2021*. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and IFOAM – Organics International, Bonn.

Wu, F., Xu, X., Xie, J., Yi, S., Wang, J., Yang, X., Yang, C., Liang, B., Ma, Q., Li, H., Song, H., & Qiu, S. (2016). Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Aberdeen Negative for H<sub>2</sub>S Production in China. *PLOS ONE*, 11(8), e0161352. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161352>

## 7. ANEXOS



**Anexo 1:** Diagrama del procedimiento de detección de *Salmonella* spp. en productos alimenticios para el consumo humano siguiendo la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017.



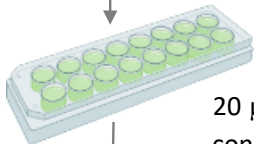
**Anexo 2:** Diagrama del procedimiento de detección de *Listeria monocytogenes* en productos alimenticios para el consumo humano siguiendo la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017.

### *Salmonella* spp.

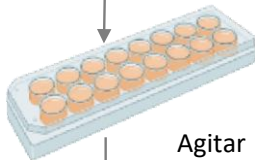
25 g de muestra + 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT)

Incubar a 37 °C ± 1 °C durante 18-24 h

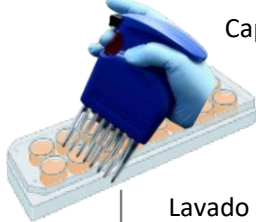
1 mL muestra/pocillo



20 µL reactivo concentración

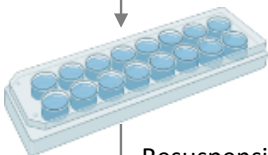


Agitar 10-20 min a 900 rpm

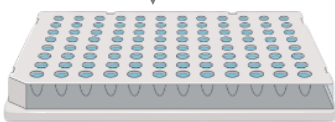


Captura 30 seg

Lavado 10 seg en 1 mL tampón de lavado



Resuspensión en 45 µL tampón resuspensión



Incorporar 30 µL a tubos de amplificación

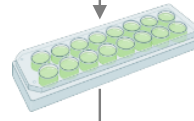


### *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp.

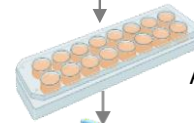
25 g de muestra + 225 mL de caldo Fraser a media concentración

Incubar a 30 °C durante 22-26 h

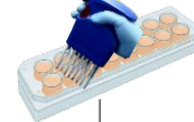
1 mL muestra/pocillo



20 µL reactivo concentración

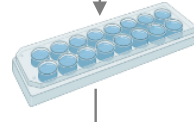


Agitar 10-20 min a 900 rpm

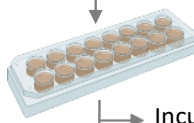


Captura 30 seg

Lavado 10 seg en 1 mL tampón de lavado



Resuspensión en 0,5 mL de caldo Fraser a media concentración



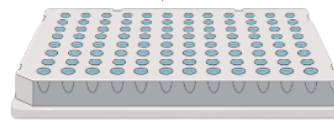
Incubar a 30 °C durante 4-6 h

Agitar 10-20 min a 900 rpm

Captura 30

Lavado 10 seg en 1 mL tampón de lavado

Resuspensión en 45 µL tampón resuspensión



Incubar a 60 °C durante 15-60 min

Incorporar 30 µL a tubos de amplificación



**Anexo 3:** Diagrama del procedimiento de detección de *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. en productos alimenticios para el consumo humano mediante el sistema comercial Assurance® GDS de la empresa Merck.

# BIOCONTROL

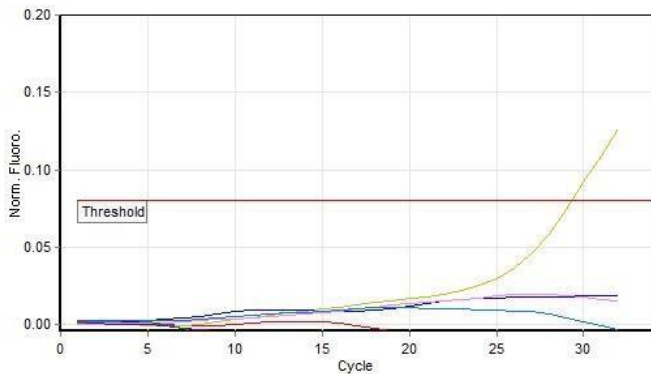
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

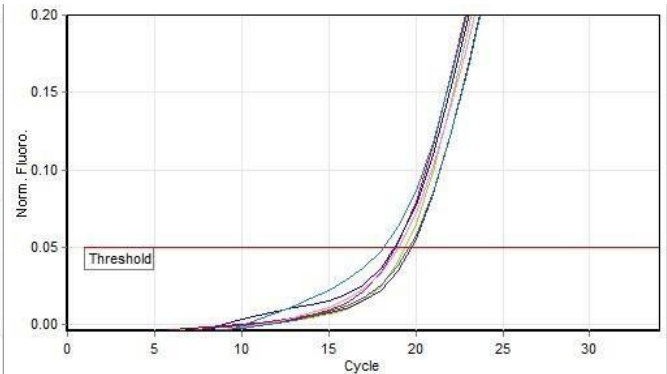
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-04-04 (1)
Run Start	04/04/2022 11:01:23 am
Run Finish	04/04/2022 12:26:39 pm
Operator	Assurance GDS User
Notes	SEGUNDA PRUEBA
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Salmonella*

#### *Salmonella*



#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> result	Ct	Assay	Kit
1	■	EF100	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02
2	■	EF101	Positive	+	29.35	<i>Salmonella</i>	011321-02
3	■	EF102	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02
4	■	EF92	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02
5	■	EF93	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02
6	■	EF94	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02
7	■	CONTROL NEGATIVO	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-02

# BIOCONTROL

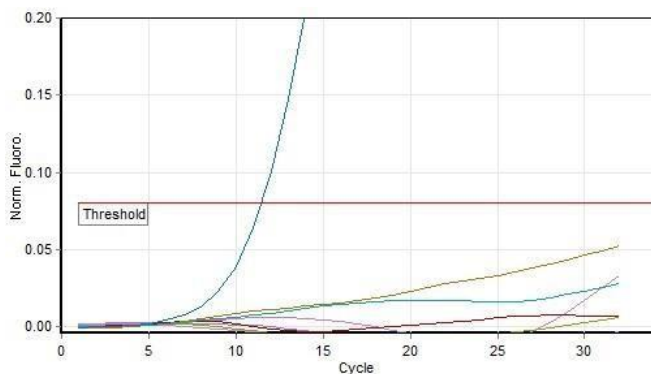
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

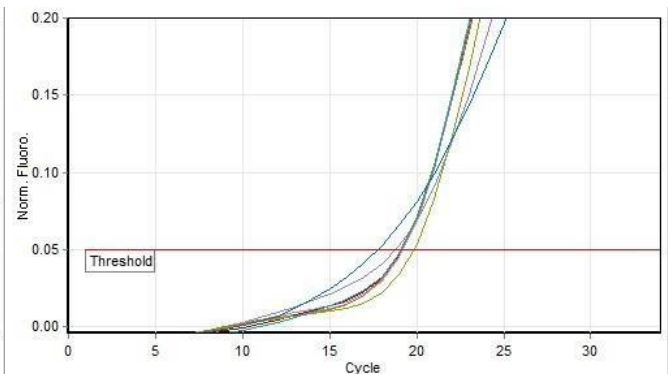
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-04-08 (1)
Run Start	08/04/2022 9:48:31 am
Run Finish	08/04/2022 11:14:56 am
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Salmonella*

#### *Salmonella*



#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> result	Ct	Assay	Kit
17		63	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
18		64	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
19		65	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
20		66	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
21		67	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
22		68	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
23		Control -	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
24		Control +	Positive	+	11.48	<i>Salmonella</i>	011321-03

# BIOCONTROL

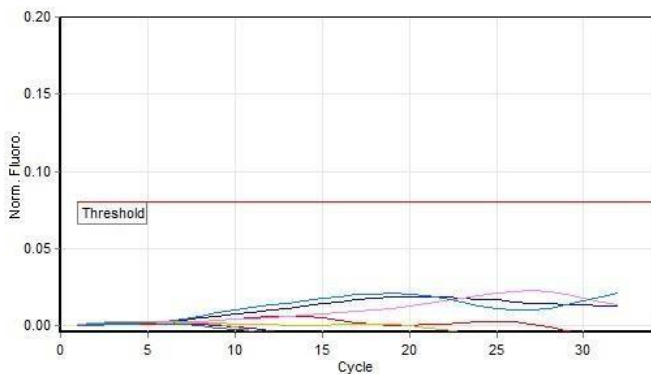
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

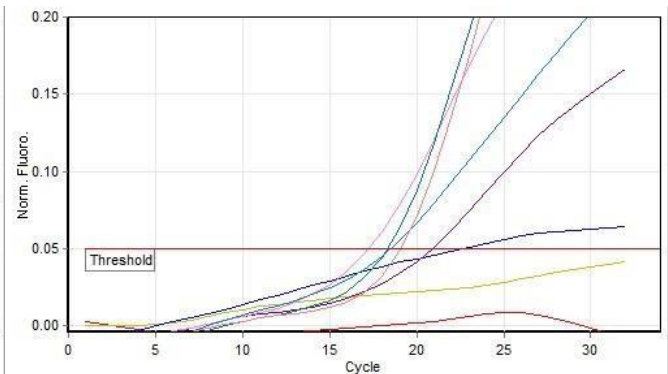
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-02 (1)
Run Start	02/05/2022 12:35:19 pm
Run Finish	02/05/2022 2:00:05 pm
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Salmonella*

**Salmonella**



**Internal Control**



No.	C	Name	Salmonella	Salmonella result	Ct	Assay	Kit
1	■	103	No Amp	-		Salmonella	011321-03
2	■	104	No Amp	-		Salmonella	011321-03
3	■	105	Negative	-		Salmonella	011321-03
4	■	80	Negative	-		Salmonella	011321-03
5	■	81	Negative	-		Salmonella	011321-03
6	■	82	Negative	-		Salmonella	011321-03
7	■	83	Negative	-		Salmonella	011321-03
8	■	84	Negative	-		Salmonella	011321-03

Las dos muestras no amplificadas (EF103 y 104) se volvieron a analizar en la siguiente qPCR.

# BIOCONTROL

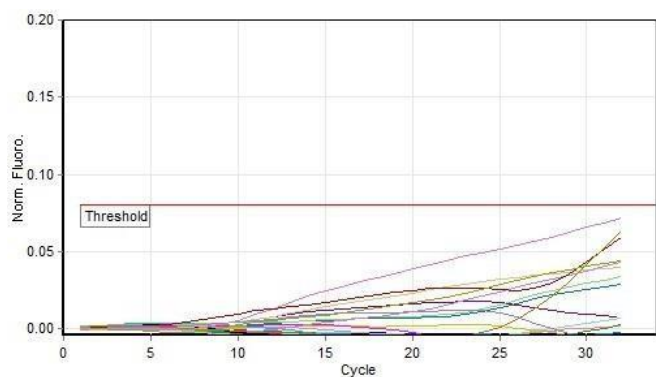
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

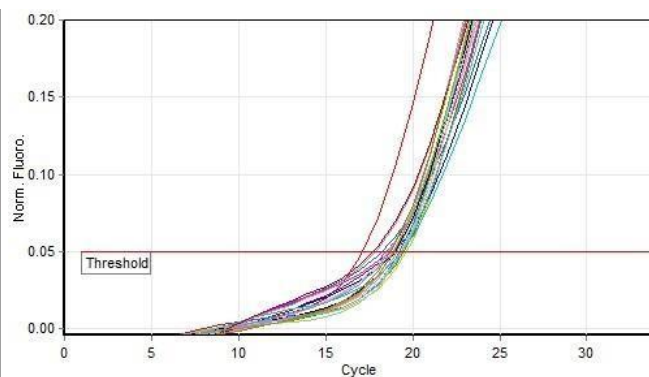
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-11 (1)
Run Start	11/05/2022 10:49:49 am
Run Finish	11/05/2022 12:16:18 pm
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Salmonella*

#### *Salmonella*















#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> result	Ct	Assay	Kit
1		77	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
2		78	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
3		79	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
4		85	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
5		86	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
6		87	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
7		88	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
8		89	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
9		90	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
10		91	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03

Continued on next page...



11		95	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
12		96	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
13		97	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
14		98	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
15		99	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
16		103	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
17		104	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
18		106	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
19		107	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
20		108	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
21		109	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03
22		110	Negative	-		<i>Salmonella</i>	011321-03

# BIOCONTROL

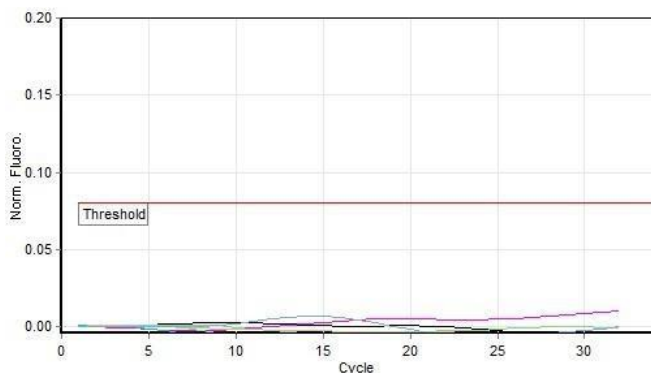
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

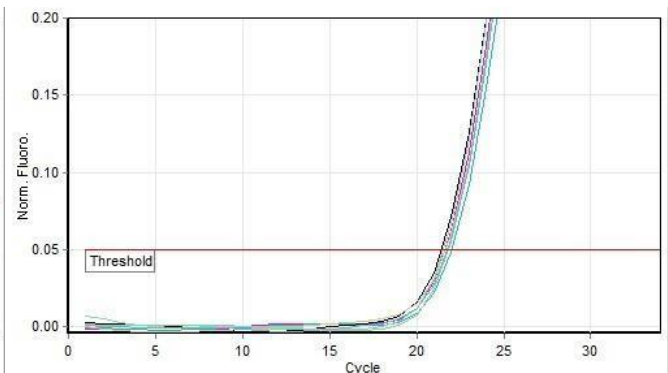
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-05 (1)
Run Start	05/05/2022 10:15:58 am
Run Finish	05/05/2022 11:41:48 am
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519








### Assay: *Listeria monocytogenes*

#### *Listeria monocytogenes*



#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. mono.</i> result	Ct	Assay	Kit
10		95	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
11		96	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
12		97	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
13		98	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
14		99	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
15		106	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
16		107	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04

# BIOCONTROL

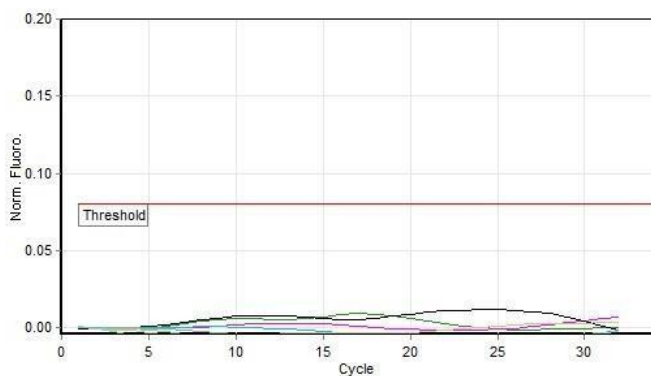
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

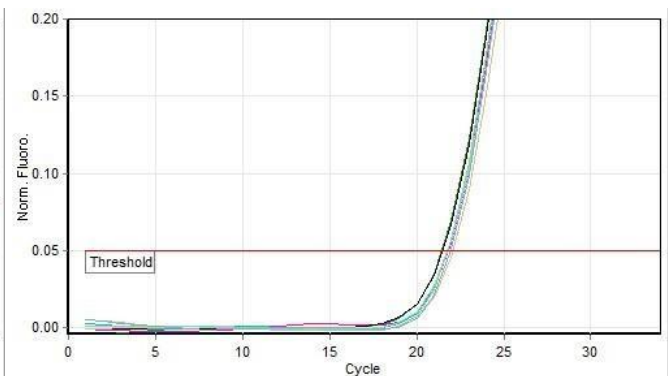
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-12 (1)
Run Start	12/05/2022 10:33:31 am
Run Finish	12/05/2022 11:59:24 am
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes*



Internal Control



No.	C	Name	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. mono.</i> result	Ct	Assay	Kit
9		86	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
10		89	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
11		92	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
12		96	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
13		100	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
14		101	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
15		103	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04
16		105	Negative	-		<i>Listeria monocytogenes</i>	122719-04

# BIOCONTROL

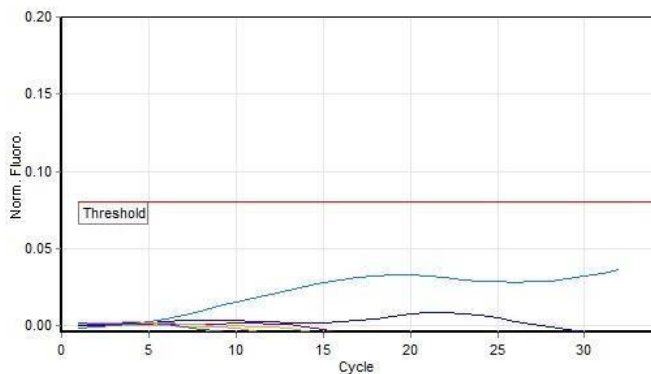
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

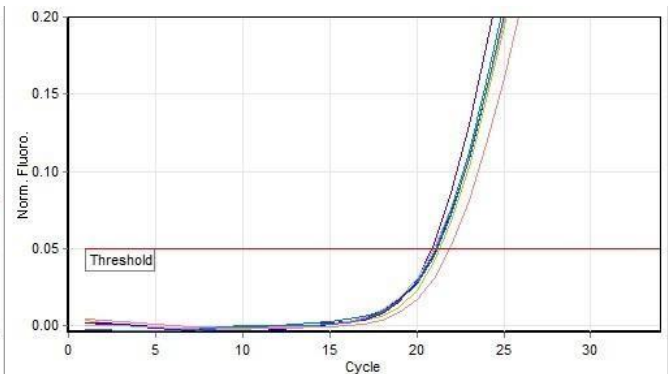
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-05 (1)
Run Start	05/05/2022 10:15:58 am
Run Finish	05/05/2022 11:41:48 am
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Listeria* spp.

#### *Listeria* spp.



#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp. result	Ct	Assay	Kit
2	95	95	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
3	96	96	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
4	97	97	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
5	98	98	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
6	99	99	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
7	106	106	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
8	107	107	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03

# BIOCONTROL

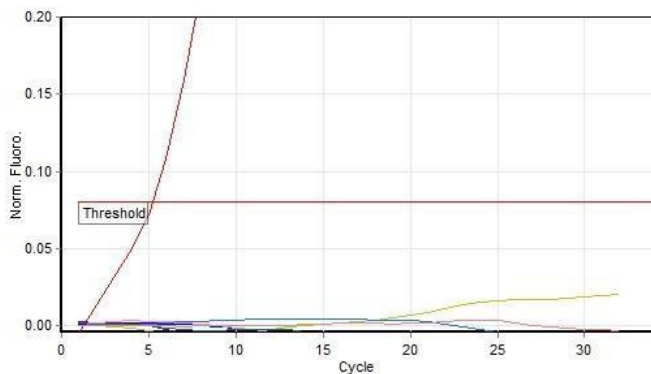
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

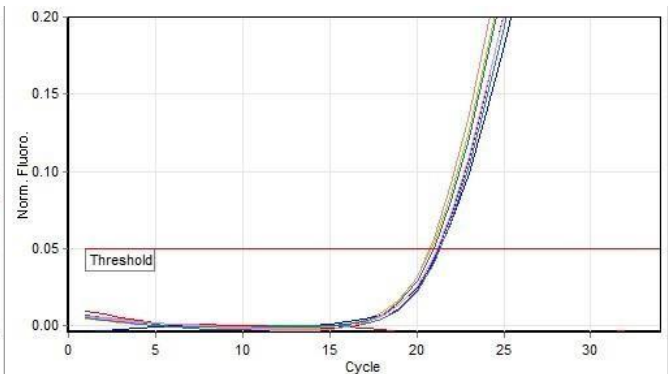
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-12 (1)
Run Start	12/05/2022 10:33:31 am
Run Finish	12/05/2022 11:59:24 am
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Listeria* spp.

#### *Listeria* spp.



#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp. result	Ct	Assay	Kit
1	<span style="color: red;">■</span>	86	Positive	+	5.28	<i>Listeria</i> spp.	100520-03
2	<span style="color: yellow;">■</span>	89	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
3	<span style="color: blue;">■</span>	92	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
4	<span style="color: purple;">■</span>	96	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
5	<span style="color: pink;">■</span>	100	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
6	<span style="color: cyan;">■</span>	101	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
7	<span style="color: teal;">■</span>	103	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
8	<span style="color: lightcoral;">■</span>	105	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03

# BIOCONTROL

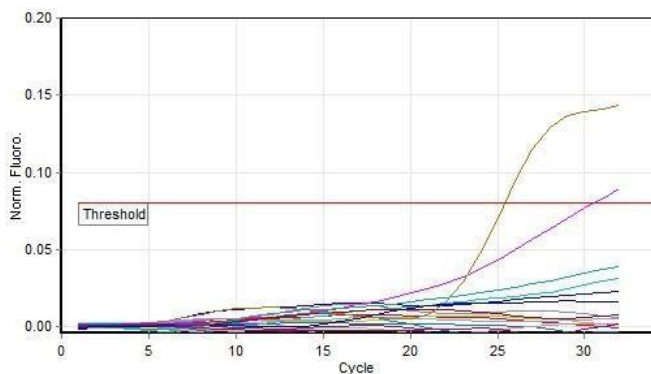
## Assurance GDS Results Report

### Run Information

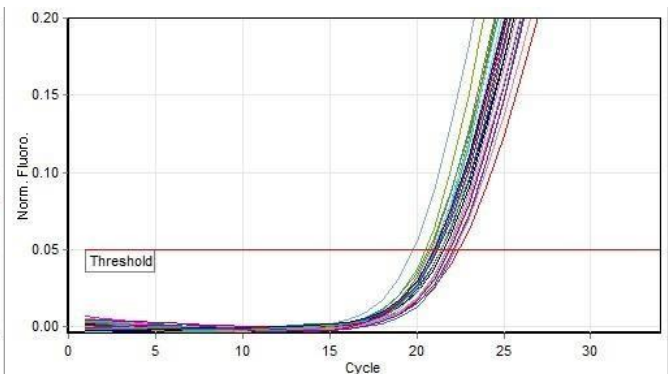
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-05-18 (1).rex listeria spp + ASO
Run Start	18/05/2022 10:32:57 am
Run Finish	18/05/2022 12:00:58 pm
Operator	Assurance GDS User
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0819519

### Assay: *Listeria* spp.

#### *Listeria* spp.




















#### Internal Control



No.	C	Name	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp. result	Ct	Assay	Kit
1	■	77	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
2	■	78	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
3	■	79	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
4	■	90	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
5	■	91	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
6	■	92	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
7	■	93	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
8	■	94	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
9	■	85	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
10	■	86	Positive	+	30.53	<i>Listeria</i> spp.	100520-03

Continued on next page...

11		87	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
12		88	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
13		89	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
14		80	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
15		81	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
16		82	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
17		83	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
18		84	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
19		100	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
20		101	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
21		102	Positive	+	25.40	<i>Listeria</i> spp.	100520-03
22		103	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
23		104	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
24		105	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
25		108	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
26		109	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03
27		110	Negative	-		<i>Listeria</i> spp.	100520-03

**Anexo 4:** Resultados tras el análisis qPCR para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* de la mayoría de las muestras. Los resultados positivos aparecen en rojo, mientras que los resultados negativos aparecen en verde.