



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Efecto de la temperatura de almacenamiento de papaya  
(*Carica papaya*) sobre la sobrevivencia y capacidad  
infectiva de *Salmonella* no tifoidea en una simulación  
gastrointestinal**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**DULCE EDITH SALAZAR VAZQUEZ**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTORES

**DR. JOSE GEOVANNI ROMERO QUINTANA**

**DRA. MARIBEL JIMENEZ EDEZA**

ASESORES

**DRA. GLORIA MARISOL CASTAÑEDA RUELAS**

**DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A JUNIO DE 2023.



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## DEDICATORIA

*A Dios por su gran amor, por permitirme culminar esta etapa.*

*A mi amado esposo Roberto Bañales y a mi amado hijo Ángel Eduardo.*

*Ustedes son mi soporte, mi guía y mi luz.*

*A mi madre Yolanda, por su apoyo incondicional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías (CONACYT), por financiar el presente proyecto dentro de la Maestría en Ciencias biomédicas.

A la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por abrir un espacio para el desarrollo de esta maestría.

Al Laboratorio de Microbiología Molecular, a cargo del Dr. Rosalío Ramos Payán, por brindar espacio y apoyo técnico para poder culminar el proyecto, a sus alumnas de servicio social (2020), por su ayuda al cuidado del bioterio. Al M.C Jorge y M.C Luis, por instruirme para la realización de los sacrificios y estar presentes cuando requiera su ayuda.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico, a cargo de la Dra. Maribel Jiménez Edeza, por brindarme la confianza y el espacio para poder desarrollar el proyecto.

A mis directores de tesis, Dr. José Geovanni Romero Quintana y Dra. Maribel Jiménez Edeza, por hacerme parte de esta investigación y brindarme el apoyo para cerrar tan importante ciclo.

A mi asesora Dra. Gloria Marisol Castañeda Ruelas, por el constante apoyo recibido durante el proceso de esta investigación.

A mis compañeros y amigos de la maestría, especialmente a Enrique, Alma, Fabiola y Gilmar por ser parte de esta gran experiencia, por su apoyo emocional y a veces técnicos.

# Índice

Página

|  |    |
|--|----|
| Índice de figuras .....  | x  |
| Índice de cuadros .....  | xi |
| I Resumen.....   | 1  |
| II Abstract .....  | 2  |
| III Introducción .....   | 3  |
| IV Revisión de literatura.....   | 6  |
| 4.1 Generalidades de <i>Salmonella</i> .....                                       | 6  |
| 4.1.1 Clasificación de <i>Salmonella</i> .....                                     | 6  |
| 4.1.2 Características de <i>Salmonella</i> .....                                   | 7  |
| 4.1.3 Patogénesis de <i>Salmonella</i> no tifoidea .....                           | 8  |
| 4.1.4 Hábitat y Ciclo de transmisión .....   | 11 |
| 4.1.5 Cuadro clínico.....  | 12 |
| 4.1.6 Epidemiología .....  | 13 |
| 4.1.7 Brotes asociados a <i>Salmonella</i> .....                                   | 15 |
| 4.2 <i>Salmonella</i> y su relación con los frutos listos para el<br>consumo ..... | 15 |
| 4.2.1 Características de la papaya ( <i>Carica papaya</i> ).....                   | 17 |
| 4.3 El tracto gastrointestinal como barrera de infecciones.....                    | 19 |
| 4.3.1 Boca.....  | 19 |
| 4.3.2 Estómago .....   | 20 |
| 4.3.3 Intestino delgado.....   | 20 |
| 4.4 Estrategia de sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en el hospedero<br>.....      | 21 |
| 4.4.1 Fisiología en el tracto gastrointestinal .....                               | 21 |
| 4.4.2 Factores moleculares.....  | 22 |
| 4.5 Análisis de riesgos microbiológicos .....                                      | 23 |
| 4.5.1 Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico<br>(ECRM) .....            | 24 |
| 4.5.2 Evaluación de riesgo de <i>Salmonella</i> .....                              | 25 |
| 4.6 Modelos de estudio para <i>Salmonella</i> .....                                | 26 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| V       | Justificación .....   | 29 |
| VI      | Hipótesis.....  | 30 |
| VII     | Objetivo general.....   | 31 |
| VIII    | Objetivos específicos .....   | 32 |
| IX      | Materiales y métodos.....   | 33 |
| 9.1     | Diseño experimental .....   | 33 |
| 9.2     | Materiales.....   | 33 |
| 9.2.1   | Cepa.....   | 33 |
| 9.2.2   | Matriz alimentaria .....  | 34 |
| 9.2.3   | Ratas.....  | 34 |
| 9.3     | Metodología .....   | 35 |
| 9.3.1   | Inoculación de la matriz.....   | 35 |
| 9.3.2   | Evaluación de la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en papaya<br>.....  | 35 |
| 9.3.3   | Preparación de las soluciones del sistema digestivo.....  | 35 |
| 9.3.3.1 | Solución salival.....   | 36 |
| 9.3.3.2 | Solución gástrica .....   | 36 |
| 9.3.3.3 | Solución intestinal .....   | 36 |
| 9.3.4   | Obtención y acondicionamiento de los segmentos de<br>íleon .....  | 37 |
| 9.3.5   | Ensayo gastrointestinal in vitro/ex vivo .....  | 37 |
| 9.3.5.1 | Fase de simulación de boca .....  | 37 |
| 9.3.5.2 | Fase de simulación gástrica .....   | 38 |
| 9.3.5.3 | Fase de simulación intestinal .....   | 38 |
| 9.4     | Análisis microbiológicos .....  | 38 |
| 9.5     | Estimación de la probabilidad de infección por <i>Salmonella</i> ....   | 41 |
| 9.6     | Análisis estadístico .....  | 41 |
| X       | Resultados.....   | 43 |
| 10.1    | Estimar la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en papayas<br>almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) durante 8 días. ....   | 43 |
| 10.2    | Evaluar la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> de manera in<br>vitro/ex vitro en modelo gastrointestinal expuesta a las diferentes<br>condiciones de almacenamiento de la papaya. .... | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 10.3 Realizar una estimación del riesgo de salmonelosis por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento.....  | 56 |
| XI Discusión.....  | 58 |
| 11.1 Estimar la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en papayas almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) durante 8 días. ....  | 58 |
| 11.2 Evaluar la sobrevivencia de <i>Salmonella</i> de manera in vitro/ex vitro en modelo gastrointestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya. .... | 61 |
| 11.3 Determinar la capacidad infectiva de <i>Salmonella</i> en el tejido intestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya. ....                       | 66 |
| 11.4 Realizar una estimación del riesgo de salmonelosis por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento.....  | 68 |
| XII Conclusiones .....   | 71 |
| XIII Bibliografía .....  | 72 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Pasos básicos en la patogenia de <i>Salmonella</i> .  | 10     |
| 2      | Esquema del ensayo gastrointestinal <i>in vitro/ex vivo</i> .   | 40     |
| 3      | Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> en papaya almacenada a 4 °C y 25 °C.   | 44     |
| 4      | Sobrevivencia en el tracto gastrointestinal de <i>Salmonella</i> inoculada en papaya en el tiempo inicial (Día 0).  | 47     |
| 5      | Sobrevivencia de <i>Salmonella</i> aislada papaya almacenada a 4 y 25 °C en el tracto gastrointestinal.   | 48     |
| 6      | Variación logarítmica de <i>Salmonella</i> aislada papaya almacenada a 4 y 25 °C en el tracto gastrointestinal.   | 51     |
| 7      | Evaluación del daño tisular por la infección de <i>Salmonella</i> vehiculada en papaya almacenada a 25 °C.  | 54     |
| 8      | La imagen el daño tisular de muestra de tejidos infectados en los días 0 (A), 2 (B), 4 (C) y 8 (D) de evaluación de <i>Salmonella</i> vehiculada en papaya. | 55     |



## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Brotos asociados a <i>Salmonella</i> en el mundo.  | 16     |
| 2      | Valores nutricionales de la papaya por cada 100 g.   | 18     |
| 3      | Parámetros cinéticos de Supervivencia de <i>Salmonella</i> en papaya almacenada a 25 °C.                                     | 45     |
| 4      | Porcentaje de supervivencia de <i>Salmonella</i> en el tracto gastrointestinal, aislada de papaya almacenada a 4 °C y 25 °C. | 50     |
| 5      | Evaluación del daño tisular por la infección de <i>Salmonella</i> vehiculada en papaya almacenada a 25 °C durante 8 días.    | 53     |
| 6      | Probabilidad de infección por <i>Salmonella</i> Spp. mediante el consumo de papaya.  | 57     |

## I RESUMEN

*Salmonella* es el agente causal de enfermedades infecciosas en humanos, siendo la gastroenteritis la mayormente reportada, con una elevada tasa de morbilidad y mortalidad convirtiéndola en un importante problema de salud pública. Esta bacteria es una de las principales causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos, ya que se ha demostrado que posee habilidades para sobrevivir en la matriz alimentaria y evadir la barrera del sistema digestivo e inmunológico del hospedero. Uno de los frutos que se ha asociado a brotes de salmonelosis es la papaya siendo esta el tercer fruto tropical mayormente consumido mundialmente. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la temperatura en papaya (Carica papaya) sobre la sobrevivencia gastrointestinal, capacidad infectiva y riesgo de infección de *Salmonella* por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento. Para ello, 50 g de pulpa de papaya fue inoculada con una mezcla de cepas de *Salmonella* ( $1.0 \times 10^6$  UFC/mL), y se almacenó a 4 y 25 °C durante 8 días. El conteo de colonias (UFC/g) se realizó los días 0, 1, 2, 4 y 8. Los parámetros cinéticos de crecimiento de *Salmonella* fueron obtenidos utilizando un modelo de regresión no logística. Posteriormente, se realizó un análisis de la capacidad infectiva de *Salmonella* previamente expuesta a condiciones de almacenamiento en la papaya en un modelo *in vitro/ex vivo* del sistema digestivo. Así también, se realizó una estimación del riesgo al consumir papaya contaminada con *Salmonella*. Los resultados demostraron la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir a 4°C durante los 8 días de estudio, sin mostrar cambios significativos a su concentración inicial ( $p > 0.05$ ); sin embargo, a 25 °C, se observó un incremento de más de 2.5 log a las 24 h de almacenamiento. La fase de adaptación, tiempo de generación y tasa de crecimiento promedio se calcularon en 0.99 h, 1.63 h y 2.54 h<sup>-1</sup>, respectivamente, según el modelo de Gompertz. En la SGI *Salmonella* mostró una disminución de la concentración (-2.1 a -1.3 log) en la etapa gástrica en ambas temperaturas y durante los 8 días de estudio, así como también un aumento (+1.29 a +0.1) en la etapa intestinal. Por otra parte, *Salmonella* aumentó su capacidad de adhesión e invasión a 4 °C con el paso del tiempo, de lo contrario a 25 °C se observó una disminución en su capacidad infectiva. Estos resultados muestran que *Salmonella* adquirió una mayor capacidad de ser infectiva durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C, mientras que a 25 °C mostró más sensibilidad a las etapas GI.

**Palabras clave:** *Salmonella*, gastrointestinal, temperatura, papaya

## II ABSTRACT

*Salmonella* is the causative agent of infectious diseases in humans, with gastroenteritis being the most reported, with a high morbidity and mortality rate making it an important public health problem. This bacterium is one of the main causes of foodborne diseases, since it has been demonstrated that it can survive in the food matrix and evade the barrier of the host's digestive and immune system. One of the fruits that has been associated with salmonellosis outbreaks is papaya, which is the third most consumed tropical fruit worldwide. The objective of this project was to evaluate the effect of temperature in papaya (*Carica papaya*) on gastrointestinal survival, infective capacity, and risk of *Salmonella* infection by consumption of papaya exposed to different storage conditions. For this purpose, 50 g of papaya pulp was inoculated with a mixture of *Salmonella* strains ( $1.0 \times 10^6$  CFU/mL) and stored at 4 and 25 °C for 8 days. Colony counts (CFU/g) were performed on days 0, 1, 2, 4 and 8. *Salmonella* growth kinetic parameters were obtained using a non-logistic regression model. Subsequently, an analysis of the infective capacity of *Salmonella* previously exposed to storage conditions in papaya was performed in an in vitro/ex vivo model of the digestive system. An estimation of the risk of consuming papaya contaminated with *Salmonella* was also performed. The results demonstrated the capacity of *Salmonella* to survive at 4°C during the 8 days of study, without showing significant changes to its initial concentration ( $p > 0.05$ ); however, at 25°C, an increase of more than 2.5 log was observed at 24 h of storage. The adaptation phase, generation time and average growth rate were calculated as 0.99 h, 1.63 h and  $2.54 \text{ h}^{-1}$ , respectively, according to the Gompertz model. In SGI *Salmonella* showed a decrease in concentration (-2.1 to -1.3 log) in the gastric stage at both temperatures and during the 8 days of study, as well as an increase (+1.29 to +0.1) in the intestinal stage. On the other hand, *Salmonella* increased its adhesion and invasion capacity at 4 °C with the passage of time, otherwise at 25 °C a decrease in its infective capacity was observed. These results show that *Salmonella* acquired a higher capacity to be infective during storage time at 4 °C, while at 25 °C it showed more sensitivity to GI stages.

**Key words:** *Salmonella*, gastrointestinal, temperature, papaya

### III INTRODUCCIÓN

*Salmonella* es una bacteria gramnegativa, facultativa y con forma de bastoncillo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. se ha convertido, junto con *Escherichia coli*, entre los microorganismos más estudiados. La principal razón de esta atención es que *Salmonella* es un patógeno transmitido por los alimentos en todo el mundo y el segundo más responsable de infecciones gastrointestinales en humanos después de *Campylobacter*. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan mundialmente 93.8 millones de casos de gastroenteritis por *Salmonella* y 155, 000 muertes cada año (Chen *et al.*, 2013; Majowicz *et al.*, 2010; Mead *et al.*, 1999; Sanchez-Vargas *et al.*, 2011).

Se han identificado más de 2500 serotipos *Salmonella*. Actualmente este género comprende dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. La especie tipo, *S. enterica*, se clasifica además en seis subespecies: *enterica* (subesp. I), *arizonae* (subesp. IIIa), *diarizonae* (subesp. IIIb), *houtenae* (subesp. IV), *indica* (subesp. VI) y *salamas* (subespecie II). La mayoría de estos serotipos pertenecen a la subespecie de *Salmonella entérica* y están asociados con >99% de las enfermedades humanas causadas por este género (Chen *et al.*, 2013).

Una vez que, el hospedero ha ingerido un alimento contaminado con *Salmonella*, la bacteria se comporta como un patógenos intracelular facultativo capaz de atravesar la primera barrera del hospedero: “el sistema digestivo”. Se ha descrito que *Salmonella* puede superar el pH gástrico bajo, las sales biliares del intestino y adherirse o invadir las células epiteliales intestinales. La invasión de los enterocitos y células M da como resultado la extrusión de células epiteliales infectadas en la luz intestinal con el

consiguiente desgaste de las vellosidades y pérdida de superficies de absorción (Collazo & Galan, 1997; Eng *et al.*, 2015; Pradhan & Negi, 2019).

*Salmonella* representa una bacteria patógena de importancia para la salud pública y es la principal causa de enfermedades transmitidas por los alimentos. Los alimentos de origen animal, especialmente aves, productos avícolas y huevos crudos, a menudo están implicados en casos esporádicos y brotes de salmonelosis humana (Hassan *et al.*, 2019; Heaton & Jones, 2008). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento de la salmonelosis asociada con verduras y frutas contaminadas listas para el consumo. Particularmente, la papaya es el tercer fruto de mayor consumo en la población mundial, y es una fruta cuya composición química representa un sustrato para el desarrollo de microorganismos, como es *Salmonella* (Jahan *et al.*, 2018; Jajere, 2019; Reddy *et al.*, 2016; Sandoval *et al.*, 2017).

En el 2019 el Centro para el Control y la prevención de Enfermedades, reporto que la papaya participo como vehículo de transmisión de *Salmonella*, generando 81 casos de salmonelosis en Estados Unidos de América (EUA). La viabilidad de la bacteria en la matriz alimentaria, el manejo higiénico del producto y el espectro de salmonelosis observado en el brote son áreas de investigación. En los EUA, se estima que hay alrededor de 1,4 millones de enfermedades y 600 muertes causadas por salmonelosis anualmente (Keerthirathne *et al.*, 2016).

La temperatura es un parámetro que condiciona la tasa de crecimiento del microorganismo en un alimento, así como también su capacidad infectiva (Keerthirathne *et al.*, 2016). Diversos estudios han reportado que el abuso de la temperatura de almacenamiento de >10 °C ha promovido el crecimiento de la bacteria.

Así mismo, la influencia de la matriz alimentaria y la temperatura de almacenamiento son factores que condicionan la respuesta de bacteria para superar el tracto gastrointestinal y favorecer la adherencia e invasión de la bacteria (Penteado & Leitao, 2004).

El análisis cuantitativo del riesgo microbiológico es una herramienta probabilística que son útiles para predecir el crecimiento de bacterias en los alimentos durante el almacenamiento, distribución y consumo (Park *et al.*, 2020).

La implementación de modelos *in vivo/ex vivo* se han convertido en una herramienta integral en el estudio de los mecanismos que subyacen a las interacciones bacterianas huésped-patógeno y huésped-comensal, principalmente para modelos intestinales (Pearce *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar el efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de *Salmonella* en la papaya y la capacidad infectiva en un modelo simulado del sistema digestivo. Además, determinar el riesgo microbiológico del consumo del producto bajo diferentes condiciones del almacenamiento.

## IV REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Generalidades de *Salmonella*

*Salmonella* es un género constituido por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos los cuales poseen flagelos, se han identificado más de 2,500 serotipos según sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) y son pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Fue aislada por primera vez de los intestinos de cerdos infectados con la peste porcina clásica y descubierta por Theobald Smith en 1855, el nombre dado a este género fue en honor al patólogo Daniel Elmer Salmon (Coburn *et al.*, 2007; Lamas *et al.*, 2018).

#### 4.1.1 Clasificación de *Salmonella*

La clasificación del género de *Salmonella* actualmente se ha dividido en dos especies diferentes, *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última se divide en seis subespecies diferentes, cada una designada con números romanos: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). La otra especie, *S. bongori* (V), está compuesta por 22 serotipos que han sido poco estudiados ya que se asocian principalmente a animales de sangre fría y las infecciones humanas son muy poco frecuentes (Agbaje *et al.*, 2011; Eng *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2018).

Se ha asociado a diversos serovares de *Salmonella*, a menudo transmitidas por los alimentos, la capacidad de producir enfermedades graves que pueden desarrollar gastroenteritis; no obstante, algunos serovares tienen el potencial de volverse invasivos, dando como resultado una bacteriemia y enfermedad extraintestinal grave,

y un número relativamente pequeño de serovares se asocia con la mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos (Agbaje *et al.*, 2011).

La mayoría de estos serotipos pertenecen a una sola subespecie de *Salmonella*, entérica y están asociados con > 99% de las enfermedades humanas causadas por *Salmonella*, incluidas la gastroenteritis y la fiebre entérica. Ambas enfermedades difieren claramente en cuanto a su etiología. La fiebre entérica es causada por *Salmonella enterica* serotipo *Typhi*, un patógeno estrictamente adaptado a los humanos. Por el contrario, la gastroenteritis es causada por serotipos zoonóticos no tifoideos de *Salmonella*, siendo los serotipos de *Salmonella enterica Typhimurium* y *Enteritidis* los que se aíslan con mayor frecuencia (Godinez *et al.*, 2011; Parry *et al.*, 2013; Raffatellu *et al.*, 2006).

#### **4.1.2 Características de *Salmonella***

La mayoría de los serotipos prosperan y crecen en un rango de temperatura de 5-47 ° C con un óptimo de 32-35 °C. Sin embargo, algunos serotipos pueden crecer a una temperatura mucho más amplia, tan baja como 2-4 °C o tan alta como 54 °C. *Salmonella* es sensible al calor y a menudo muere a temperaturas de 70 °C o más. El pH necesario para el crecimiento de *Salmonella* oscila entre 4 y 9, con un rango óptimo entre 6.5 y 7.5. Aunque la *Salmonella* pueden sobrevivir en una actividad de agua <0.2, como en los alimentos secos, requieren una alta actividad de agua de entre 0.99 y 0.94 para su supervivencia. El crecimiento de *Salmonella* se inhibe completamente a pH <3.8, la actividad del agua <0.94 y temperaturas <7 °C (Jajere, 2019).



#### 4.1.3 Patogénesis de *Salmonella* no tifoidea

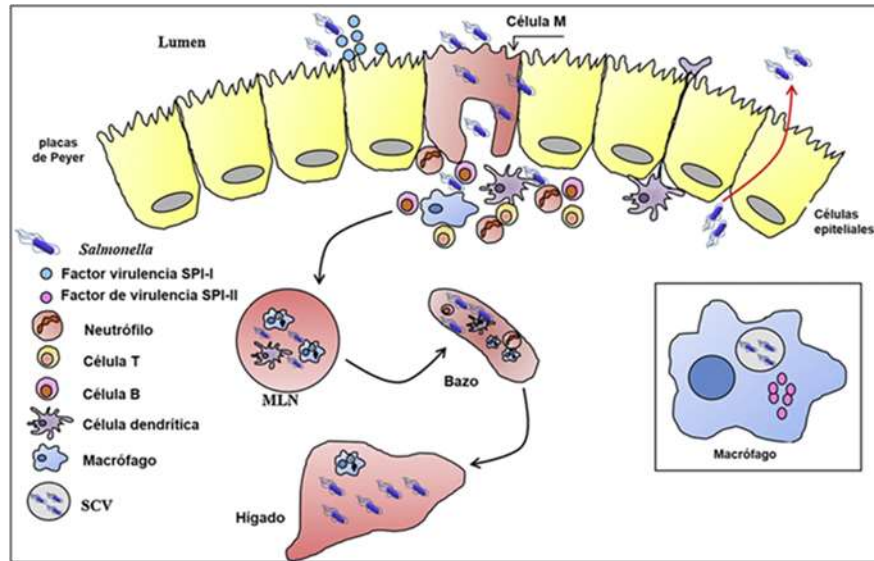
Existe una diferencia entre la fiebre tifoidea y la gastroenteritis, es la respuesta del hospedero provocada en el sitio donde se originan ambas infecciones, la mucosa intestinal. La gastroenteritis es una enfermedad diarreica típica caracterizada por un influjo masivo de neutrófilos en el íleon terminal y el colon. La gravedad de las infecciones por *Salmonella* en humanos varía según el serotipo involucrado y el estado de salud del huésped humano. Los niños menores de 5 años, los ancianos y los pacientes con inmunosupresión son más susceptibles a la infección por *Salmonella* que las personas sanas. Casi todas las cepas de *Salmonella* son patógenas, ya que tienen la capacidad de invadir, replicarse y sobrevivir en las células huésped humanas, lo que resulta en una enfermedad potencialmente mortal (Coburn *et al.*, 2007; Eng *et al.*, 2015).

*Salmonella* son patógenos intracelulares facultativos que involucran a la célula hospedera en una notable interacción bioquímica bidireccional como parte de su ciclo patogénico. Después de la ingestión oral, *Salmonella* enfrenta una serie de barreras, como un pH gástrico bajo, mucosa intestinal y barreras de células epiteliales intestinales. Una vez que entra en el intestino delgado, *Salmonella* atraviesa la capa de moco intestinal antes de encontrar y adherirse a las células del epitelio intestinal en donde expresan varias fimbrias que contribuyen a su capacidad de adherirse a las células epiteliales intestinales. *Salmonella* ingresa a las células huésped a través de las células Microfold (M) de la placa de Peyer. La invasión de enterocitos y células M da como resultado la extrusión de células epiteliales infectadas en la luz intestinal con el consiguiente desgaste de las vellosidades y pérdida de superficies de absorción.

*Salmonella* también provoca una alteración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la mucosa infectada e induce diarrea acuosa, que puede contener sangre.

En la figura 1 se muestra una representación esquemática de la secuencia de eventos durante la patogenia de la enteritis inducida por *Salmonella* (Collazo & Galan, 1997; Eng *et al.*, 2015; Ohi & Miller, 2001; Pradhan & Negi, 2019; Wallis & Galyov, 2000).

*Salmonella* entra a las células hospederas de dos maneras; una es por las células M mediante transcitosis, un proceso pasivo por el cual las bacterias son captadas por estas células desde la luz hasta el lado basolateral. La segunda forma es por inducción de las bacterias al secretar proteínas efectoras SPI-I TTSS que provocan la alteración de la membrana por el reordenamiento citoesquelético de las células epiteliales. Los SPI codifican para sistemas de secreción de tipo III, proteínas multicanal que permiten que *Salmonella* inyectar sus efectores a través de la membrana de la célula epitelial intestinal en el citoplasma. Luego, los efectores bacterianos activan la vía de transducción de señales y desencadenan la reconstrucción del citoesqueleto de actina de la célula huésped, lo que da como resultado la extensión hacia afuera de la membrana de la célula epitelial para ingerir las bacterias (Lamas *et al.*, 2018; Pradhan & Negi, 2019).



**Figura 1.** Pasos básicos en la patogenicidad de *Salmonella*. La entrada de *Salmonella* se produce a través de las células M del parche de Peyer en el epitelio intestinal, seguida de la inflamación debida a la infiltración de las células inmunitarias como neutrófilos, células T, células B, macrófagos y células dendríticas. Estas células transportan las bacterias al MLN, el bazo y el hígado a través de la sangre y el sistema linfático. Las bacterias pueden persistir en estos tejidos durante años, desde donde puede ocurrir una recaída de la infección. (MLN- Ganglio linfático mesentérico, SCV- Vacuola que contiene *Salmonella*, SPI- Isla de patogenicidad de *Salmonella*). Adaptada de Pradhan y Negi, (2019).

La capacidad de las cepas de *Salmonella* para persistir en la célula huésped es crucial para la patogénesis, ya que las cepas que carecen de esta capacidad no son virulentas. Después de la absorción de *Salmonella* en la célula huésped, la bacteria queda encerrada en un compartimento de membrana llamado vacuola, que está compuesto por la membrana de la célula huésped. En circunstancias normales, la presencia del cuerpo extraño bacteriano activaría la respuesta inmune de la célula huésped, dando como resultado la fusión de los lisosomas y la secreción de enzimas digestivas para degradar las bacterias intracelulares. El nicho preferido para la supervivencia de los serotipos de *Salmonella* no tifoideas en la mucosa intestinal es comúnmente dentro de los macrófagos. *Salmonella* utiliza el sistema de secreción de tipo III para inyectar otras proteínas efectoras en la vacuola, provocando la alteración de la estructura del compartimento. La vacuola formada bloquea la fusión de los lisosomas y esto permite la supervivencia intracelular y la replicación de las bacterias dentro de las células huésped. La capacidad de las bacterias para sobrevivir dentro de los macrófagos les permite ser transportadas en el sistema reticuloendotelial (Monack *et al.*, 2004; Santos & Baumler, 2004).

#### **4.1.4 Hábitat y Ciclo de transmisión**

*Salmonella* es una bacteria ubicua y extremadamente persistente en el ambiente y es transmitida por vía fecal-oral, se encuentra con varios microambientes mientras se desplaza desde sus huéspedes naturales humanos o animales a varios microcosmos acuáticos y terrestres, donde se enfrentan a una serie de estrés como temperatura, pH, salinidad, estrés por iones metálicos, osmolaridad, nutrientes

limitantes y, lo más importante, las defensas inmunitarias del huésped, etc. que pueden inhibir su crecimiento o pueden ser letales (Bhan *et al.*, 2005; Jajere, 2019).

*Salmonella* se ha aislado de una amplia gama de animales y sus productos alimenticios, que incluyen aves de corral, bovinos, ovinos, porcinos, pescados, mariscos. Esta bacteria tiene la capacidad de permanecer viable en superficies de contacto con alimentos durante períodos significativos, aumentando el riesgo de eventos de contaminación cruzada entre manipuladores de alimentos, productos alimenticios y superficies de contacto con alimentos.

Diversas investigaciones destacan la aparición frecuente de *Salmonella* en carnes y productos cárnicos, sin embargo, existe una amplia gama de otros alimentos como la leche, los productos lácteos, las frutas, las verduras y los productos pesqueros que pueden ser fuentes de infección por *Salmonella* (Carrasco *et al.*, 2012; Lamas *et al.*, 2018; Waldner *et al.*, 2012).

#### **4.1.5 Cuadro clínico**

La gastroenteritis es una infección que generalmente permanece localizada en el intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos. El período de incubación es corto y puede variar de 4 a 72 horas después de la ingestión de agua o alimentos contaminados y va seguido un breve episodio de la enfermedad (<10 días), lo que sugiere que la infección se elimina eficazmente con el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas. Las infecciones por *Salmonella* no tifoidea (SNT) se caracterizan por afecciones inflamatorias del estómago a menudo asociadas con

diarrea no sanguinolenta, vómitos, náuseas, dolor de cabeza y calambres abdominales (Chen *et al.*, 2013; Ohl & Miller, 2001; Pradhan & Negi, 2019; Raffatellu *et al.*, 2006).

La cantidad de inóculo que deben ingerirse para causar una enfermedad sintomática en adultos sanos es de  $10^6$  a  $10^8$  organismos de SNT. En lactantes y personas con determinadas afecciones subyacentes, un inóculo más pequeño puede producir enfermedades, por lo que a veces se produce la transmisión directa de persona a persona, aunque poco común. Esta es la razón por la que la infección por SNT tiende a ocurrir en niños, especialmente en niños menores de 2 años (Chen *et al.*, 2013).

#### **4.1.6 Epidemiología**

La *Salmonella* es una causa común de enfermedad gastrointestinal transmitidas por alimentos en el mundo. Comúnmente, *Salmonella* no tifoidea ocasiona infecciones gastrointestinales autolimitadas. Sin embargo, pueden manifestarse cuadros de enfermedad severa en pacientes inmunocomprometidos, niños menores de cinco años, y adultos mayores, ocasionando meningitis, sepsis e incluso la muerte. Los países en desarrollo sufren la mayor parte de la carga de las enfermedades diarreicas tanto en mortalidad como en morbilidad. Los casos de salmonelosis humana se limitan casi por completo a los serotipos de la subespecie entérica, siendo los cinco serotipos principales responsables de la enfermedad humana *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Stanley* y *S. Newport* (Braun *et al.*, 2015; Mba-Jonas *et al.*, 2018; Pradhan & Negi, 2019; Thompson *et al.*, 2013).

Se estima que 93.8 millones de casos de gastroenteritis por *Salmonella* ocurren en todo el mundo provocando 155,000 muertes cada año (Majowicz *et al.*, 2010; Sanchez-Vargas *et al.*, 2011). La proporción de brotes transmitidos por alimentos, incluidos los brotes de *Salmonella*, atribuidos a productos crudos, como frutas y verduras, ha aumentado en los Estados Unidos desde la década de 1970. Aproximadamente la mitad de la fruta fresca y alrededor del 20% de las verduras frescas que se consumen en los Estados Unidos se importan de otros países, la mayoría de los cuales provienen de México. Ha habido varios brotes de *Salmonella* en varios estados atribuidos a productos frescos crudos importados durante la última década. Los alimentos implicados incluyen pepinos, mangos, pimientos picantes, melón y papayas (Crump *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2019; Reddy *et al.*, 2016). En el 2019, el Centro para el Control y la prevención de Enfermedades (CDC) reportó un brote de *Salmonella* uganda asociadas a una marca mexicana que exporta papayas a Estados Unidos, la cual dio como resultado 81 personas infectadas por dicha cepa.

Según los datos de morbilidad disponibles del año 2000 a 2013 en la base de datos SINAVE, el número de casos de SNT y *Salmonella Paratyphi A* se presentaron juntos, reportando un total de 1,538,909 casos. A partir de 2014, los datos fueron separados, reportando 317,685 casos de NTS y 48,939 casos de *Salmonella Paratyphi A* hasta 2017. Particularmente en México según la dirección General de Epidemiología (DGE) en el 2020 se reportaron 116,925 casos de enfermedades relacionadas al aparato digestivo asociadas a *Salmonella*, en donde el 24.64% fueron tifoidea, 8.06% paratifoidea y 67.30% fueron relacionadas a otras salmonelosis.

#### **4.1.7 Brotes asociados a *Salmonella***

A pesar de las mejoras en la higiene y el saneamiento, la incidencia de infecciones por SNT ha seguido aumentando, creando una carga tanto en los países industrializados como en los subdesarrollados (Eng *et al.*, 2015). En los últimos años han sido asociados brotes de *Salmonella* por el consumo de papaya exportada de México (CDC, 2019). Hasta el momento son pocas las investigaciones realizadas en el país que ayuden a predecir el riesgo del consumo de dicha fruta contaminada.

En el cuadro 1 se muestran brotes asociados a *Salmonella* asociados al consumo de alimentos.

#### **4.2 *Salmonella* y su relación con los frutos listos para el consumo**

*Salmonella* continúa clasificándose como uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más costosos. La mayoría de las infecciones por *Salmonella* son causadas por productos avícolas; sin embargo, un estudio realizado por la CDC mostró que varios tipos de productos frescos listos para el consumo se han visto implicados y que el 46% de las enfermedades se les puede atribuir. Así también el uso de aguas contaminadas en el riego de los productos agrícola se ha asociado a brotes por *Salmonella*. Recientemente se ha estimado que las frutas y verduras están implicadas en aproximadamente el 50% de las enfermedades por *Salmonella*, asociando a su consumo un factor de riesgo para infecciones entéricas (Heaton & Jones, 2008; Reddy *et al.*, 2016).



**Cuadro 1.** Brotes asociados a *Salmonella* en el mundo.

| <b>Año</b> | <b>País</b> | <b>Serovar</b>    | <b>Fuente de alimento</b> | <b>No. de casos</b> | <b>Referencia</b>            |
|------------|-------------|-------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|
| 2002       | EUA         | S.<br>Oranienburg | Chocolate                 | 439                 | Werber <i>et al</i> , (2005) |
| 2010-2011  | EUA         | S. enteritidis    | Huevos                    | 1939                |                              |
|            |             | S. thompson       |                           |                     |                              |
|            |             | S. kiambu         |                           |                     |                              |
| 2017       | EUA         | S. agona          | Papaya<br>maradol         | 220                 | CDC, (2017)                  |
|            |             | S. gaminara       |                           |                     |                              |
|            |             | S. senftenberg    |                           |                     |                              |
| 2018       | Corea       | S. Thomson        | Pastel de<br>chocolate    | 2,207               | Eun <i>et al</i> , (2019)    |
| 2018       | EUA         | S. Newport        | Coco rallado<br>congelado | 27                  | CDC, (2018)                  |
| 2019       | EUA         | S. uganda         | Papaya                    | 81                  | CDC, (2019)                  |

En México, diversos estudios muestran la presencia de *Salmonella* en vegetales crudos y procesados, tales como lechuga, cilantro, melón, papaya, chile, etc. Además de estos reportes es necesario señalar que se han asociado brotes por *Salmonella* ocasionados por el consumo de productos frescos tales como papaya, pepino, melón, mango y tomates importados de México (Contreras-Soto *et al.*, 2019).

#### **4.2.1 Características de la papaya (*Carica papaya*)**

*Carica papaya* (papaya) de la familia *Caricaceae*, originaria de México y el norte de Sudamérica, ahora está naturalizada en muchas partes del mundo, incluidas las regiones tropicales y subtropicales. Es una planta semiherbácea parecida a un árbol que crece hasta 8 pies con tallo, hueco y cilíndrico. La papaya tiene un alto valor nutrimental como se muestra en el cuadro 2, por ello es una fuente importante de vitaminas A, C y E (Anuar *et al.*, 2008; Krishna *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2020).

La demanda de frutas tropicales ha ido en constante aumento durante los últimos años. La producción de frutas tropicales alcanzó los 73.02 millones de toneladas en el año 2010. Particularmente la papaya (*Carica papaya*) es una de las frutas tropicales más consumidas en el mundo, ocupando el tercer sitio de preferencia; además es una de las frutas de mayor importancia económica. Siendo los países de América Latina como: México, Brasil y Guatemala los principales productores (Evans & Ballen, 2012; Sandoval *et al.*, 2017).

**Cuadro 2.** Valores nutricionales de la papaya por cada 100 g.

| Parámetro         | Contenido (g) |
|-------------------|---------------|
| Agua              | 88.10         |
| Carbohidratos     | 10.82         |
| Azúcares          | 7.82          |
| Fibra alimentaria | 1.5           |
| Grasas            | 0.26          |
| Proteína          | 0.47          |
| Ceniza            | 0.39          |
| Kcal              | 43.00         |

Adaptada de USDA, (2019).

La vida útil de la papaya madura se limita a 4 a 7 días a 25 °C y 2 semanas a 12 °C. El almacenamiento por debajo de 10 °C provoca daños por frío en la fruta. Estas razones la hacen ser un producto muy perecedero por lo que lo hace susceptible al crecimiento de patógenos como *Salmonella* (Sharma *et al.*, 2020). Según datos estadísticos, la media de consumo anual de papaya en México por persona es de 7.3 kilogramos (SADER, 2020).

### **4.3 El tracto gastrointestinal como barrera de infecciones**

Como cualquier otro patógeno, *Salmonella* tiene que atravesar diversas barreras para llegar a invadir al hospedero. Para ello *Salmonella* tiene que ser lo suficientemente eficiente para detectar y responder a estas tensiones, así como para adaptarse a estos entornos no solo para sobrevivir sino también para diseminar y retener su patogenicidad adaptarse a estos entornos no solo para sobrevivir sino también para diseminar y retener su patogenicidad. Después de la ingestión oral, *Salmonella* coloniza los intestinos e invade la mucosa intestinal (Pradhan & Negi, 2019; Wallis & Galyov, 2000).

#### **4.3.1 Boca**

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* suelen invadir a sus hospederos a través de la ingestión oral de alimentos o agua contaminados. La pared celular de las bacterias Gram negativas difiere notablemente de la de las bacterias Gram positivos, ya que se encuentran protegidos por su membrana externa que actúa

como una barrera que impide el acceso de lisozima a su objetivo por lo que generalmente son resistentes a la lisozima pudiendo atravesar con éxito la fase bucal (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2018; Masschalck & Michiels, 2003).

#### **4.3.2 Estómago**

El primer desafío real que enfrentan las bacterias después la ingestión es el pH ácido del estómago del hospedero. El valor de pH de esta sección del tracto gastrointestinal es variable. En condiciones normales el pH se encuentra en un rango de 1.0 a 3.0, sin embargo, se ha observado un pH de 1.3 en humanos sanos en ayunas, mientras que el pH aumentó hasta 4.9 después de la ingestión de alimentos relacionándolo con los efectos amortiguadores que poseen (Ramos-Morales, 2012).

Diferentes especies bacterianas han desarrollado mecanismos eficientes para promover la supervivencia durante el paso por el estómago. La capacidad de enteropatógenos como *Salmonella* para adaptarse y sobrevivir al estrés ácido es fundamental para su patogénesis (Audia *et al.*, 2001; Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2018; Ramos-Morales, 2012).

#### **4.3.3 Intestino delgado**

Las células epiteliales del intestino humano están cubiertas con secreciones mucosas que protegen el epitelio del medio ambiente. La barrera mucosa está compuesta por al menos dos capas de glicanos que a su vez incorporan múltiples capas de glicoproteínas (mucina) y oligosacáridos (glucocálix) que protegen a las

células del entorno local y la infección. Los patógenos intestinales intracelulares deben penetrar las capas de mucina y posteriormente acceder a la membrana celular. Para lograr esto, *Salmonella* usa un conjunto de glicosil hidrolasas (GH) que pueden degradar los glicanos. Antes de invadir las células huésped apropiadas y convertirse en un patógeno intracelular, *Salmonella* tiene que competir con el microbiota intestinal residente. El lumen del tracto gastrointestinal es rico en nutrientes y proporciona un nicho apropiado para una la sobrevivencia de una diversidad de bacterias (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2018; Marcobal *et al.*, 2013).

Las defensinas y catelicidinas son péptidos microbianos que juegan un papel importante en el tracto, gastrointestinal. En condiciones normales, la superficie epitelial y la capa mucosa del colon están casi carentes de bacterias. La producción constante de péptidos antimicrobianos en el tracto intestinal ayuda a limitar la invasión y adherencia de bacterias tanto patógenas como comensales. Las defensinas más abundantes, expresadas constitutivamente se encuentran en las células de Paneth del intestino delgado (Wehkamp *et al.*, 2007).

#### **4.4 Estrategia de sobrevivencia de *Salmonella* en el hospedero**

##### **4.4.1 Fisiología en el tracto gastrointestinal**

En condiciones de limitación de nutrientes, las bacterias alcanzan rápidamente la fase estacionaria de crecimiento. Cuando esto ocurre, cesa la replicación bacteriana y la densidad celular comienza a disminuir. El cese del crecimiento es asociado a

diversos factores ambientales, como el pH ácido, el estrés osmótico, el choque térmico y el potencial redox (Dunkley *et al.*, 2009).

#### **4.4.2 Factores moleculares**

Este patógeno ha desarrollado mecanismos moleculares para prevenir la presentación de antígenos bacterianos logrando evitar el inicio de la inmunidad adaptativa. Durante las últimas décadas han sido estudiada las bases moleculares de la invasión de células eucariotas por *Salmonella* mediante técnicas *in vitro*; sin embargo, actualmente se ha buscado estudiar la invasión desde una perspectiva de estudios *in vivo*. *Salmonella* es capaz de inducir la fagocitosis en las células epiteliales por acción de la translocación de los efectores T3SS1 que modulan el citoesqueleto de actina. Diversos estudios han demostrado que el TTSS-1 tiene una gran relación en la invasividad de *Salmonella*. Dado que las mutaciones en genes que codifican proteínas estructurales de TTSS-1 bloquean la invasión bacteriana de células cultivadas *in vitro* y la invasión de intestinos bovinos y murinos *in vivo* (Wallis & Galyov, 2000).

Muchos de los rasgos de virulencia de *Salmonella* están directamente vinculados a genes codificados dentro de grandes regiones del cromógeno bacteriano algunas llamadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). Después de la internalización, el establecimiento de una infección sistémica depende del patógeno la capacidad de sobrevivir dentro de las células huésped y de evadir la respuesta inmune. En ese sentido, diversos estudios han encontrado proteínas de virulencia de *Salmonella* que favorecen la supervivencia intracelular y diseminación en el anfitrión. Una de las estrategias más relevantes empleadas por *Salmonella* para sobrevivir y replicarse

intracelularmente es la disrupción de la maquinaria de tráfico endocítico del huésped para evitar su degradación lisosomal dentro de la SCV. La capacidad de sobrevivir depende de los efectores SPI2 (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2018; Coburn *et al.*, 2005; Valdez *et al.*, 2009).

#### **4.5 Análisis de riesgos microbiológicos**

Los análisis de laboratorio son instrumentos que carecen de valor preventivo ya que estos son considerados solo para productos finales. El análisis de riesgos microbiológicos (ARM) integra todas las etapas de producción del alimento, esto ayuda a generar información para protección de la salud pública, por lo que el ARM representa una forma de gestionar la seguridad alimentaria (Ramos *et al.*, 2021).

La evaluación de riesgo en un contexto de seguridad alimentaria es toda evaluación que da a lugar algún tipo de estimación de la importancia de un peligro transmitido por alimentos que tiene una probabilidad de desarrollar enfermedad en el humano (Lambertini *et al.*, 2012).

La evaluación del riesgo microbiológico es la etapa más compleja, que requiere varias habilidades. Puede ofrecer datos cualitativos generados por datos descriptivos (como alta, media o baja probabilidad de contaminación) o datos cuantitativos, basados en valores de prevalencia y enumeración de patógenos y ecuaciones matemáticas generadas por modelos predictivos (Ramos *et al.*, 2021).

La microbiología predictiva ofrece varias herramientas en forma de modelos matemáticos útiles para predecir el crecimiento de bacterias en los alimentos durante



el almacenamiento, distribución y consumo (Gumudavelli *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2020).

#### **4.5.1 Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (ECRM)**

La ECRM es un método con base científica para evaluar la cantidad de un microorganismo al que los humanos están expuestos a través del consumo de alimentos y de tal manera estimar la probabilidad y la gravedad de los efectos adversos sobre la salud como consecuencia del consumo (Campagnollo *et al.*, 2018; Collineau *et al.*, 2020).

Los modelos de ECRM se basan principalmente en cuatro pasos (Campagnollo *et al.*, 2018; Kundu *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2021):

1. Identificación del peligro: se basa en la selección del patógeno-alimento que serán objeto de estudio. Se realiza también, una búsqueda de información epidemiológica sobre la combinación establecida en la etapa de identificación de peligros.

2. Evaluación de la dosis-respuesta: se busca la relación entre el número de patógenos ingeridos (dosis) y la probabilidad de ocurrencia de una consecuencia adversa en términos de infección, enfermedad o muerte se incluyó en QMRA.

3. Evaluación de la exposición: determina la intensidad y la duración de un evento de exposición que podría tener efectos adversos en la salud humana utilizando modelos predictivos que describen las respuestas conductuales del microorganismo, así como la posibilidad de recontaminación en puntos específicos del procesamiento.

4. Caracterización del riesgo: involucra la integración de los resultados, proporcionando una estimación, en probabilidad, de la ocurrencia del problema definido y su magnitud para caracterizar el riesgo de infección o enfermedad asociado con el consumo de un producto específico del patógeno dado mediante el uso de una ecuación matemática simple.

#### **4.5.2 Evaluación de riesgo de *Salmonella***

Las ECRM proporcionan una estimación cuantitativa de *Salmonella* y la probabilidad de un efecto adverso en la salud humana después de una exposición a un alimento contaminado (Rajan *et al.*, 2017).

Los modelos utilizados en la ECRM ayudan a identificar eventos que aumentan significativamente el riesgo de desarrollar salmonelosis. Modelar el crecimiento de *Salmonella* ayuda a identificar los parámetros óptimos para controlar su incidencia durante el procesamiento de los alimentos. Actualmente existen diversos modelos para la evaluación del riesgo, los cuales pueden ser primarios (exponencial, logístico, Gompertz, Weibull y Baranyi) que son utilizados para describir el comportamiento microbiano en la matriz alimentaria; mientras que los modelos secundarios (Arrhenius, polinomio, etc.) se utilizan para estudiar la cinética de crecimiento microbiano en ambientes específicos (Oscar, 2011; Rajan *et al.*, 2017).

Seguido de la evaluación de la exposición, los datos epidemiológicos pueden ser utilizados para calcular la relación dosis-respuesta, pudiendo aumentar el límite de evaluación del riesgo lo cual proporciona evaluaciones más realistas de peligros al

consumir un alimento contaminado por *Salmonella*. La respuesta de la estimación de la dosis de *Salmonella* varía según la virulencia de los serotipos, las características de la matriz alimentaria y la susceptibilidad de los humanos expuestos a salmonelosis (Rajan *et al.*, 2017; Teunis *et al.*, 2010).

Posterior a los modelos primarios, los datos obtenidos deben someterse a un modelo terciario para definir la relación entre diversas distribuciones de parámetros y estimar la probabilidad de riesgo microbiológico y peligros para la salud. Dichos modelos pueden ser deterministas los cuales utilizan estimaciones promedias de sus variables sin tomar en cuenta la incertidumbre y variabilidad de sus predicciones y estocásticos como la red bayesiana y la simulación Monte Carlo que usan distribuciones de probabilidad para plantear predicciones y conocer la variabilidad de las entradas para predecir los resultados como un rango de resultados posibles (Evers & Chardon, 2010; Rajan *et al.*, 2017; Valero *et al.*, 2014)

#### **4.6 Modelos de estudio para *Salmonella***

Con el paso del tiempo se han desarrollado diversos modelos experimentales que ayudan a estudiar las infecciones por *Salmonella*, incluidos varios modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Finlay & Brumell, 2000; Yin & Zhou, 2018).

Los modelos *in vitro* de líneas celulares son los más utilizados ya que han permitido realizar estudios de análisis genético, biológico celular y bioquímico del proceso de infección por *Salmonella*. Las líneas de cultivo celular *in vitro* se caracterizan por ser relativamente fáciles de mantener y proporcionar un nicho

ambiental más controlado para evaluar la supervivencia y replicación bacteriana que la mayoría de los hospederos animales.

No obstante, los modelos de líneas celulares inmortalizadas poseen una desventaja de gran peso, ya que carecen de la complejidad de los tipos de células y los componentes inmunes, por lo que no pueden imitar del todo el proceso de infección natural (Finlay & Brumell, 2000; Laparra & Sanz, 2009; Pearce *et al.*, 2018; Yin & Zhou, 2018).

Los modelos *in vitro* en *Salmonella* han ayudado a evaluar la capacidad de adherencia de las cepas bacterianas a la mucosa intestinal, por ejemplo, las líneas celulares Caco-2 han permitido avances significativos en los estudios de interacción celular ya que crecen en cultivo formando una monocapa celular homogénea y polarizada, asemejando a los enterocitos humanos maduros en el intestino delgado; sin embargo, carece de la capa de moco lo que representa una limitante para el uso de esta. Por otra parte, la línea celular HT29-MTX que es el resultado del aislamiento de células HT29 adaptadas al metotrexato (MTX), que se diferencian en células caliciformes caracterizadas por la secreción de mucina, la hace una buena elección para el estudio de adhesión bacteriana (Laparra & Sanz, 2009; Pearce *et al.*, 2018)

Los modelos *ex vivo* integran procedimientos con tejidos u órganos funcionales vivos que han sido aislados de un organismo y que son adaptados fuera de él en un entorno artificial en condiciones muy controladas. Los modelos *ex vivo* pretenden eliminar la complejidad del entorno asociado con el huésped proporcionan un área experimental en la que se pueden probar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes del contacto entre el hospedero y el microorganismo. Estos tipos de

modelos pueden ser utilizados en una amplia variedad de estudios, incluida la investigación de la interacción huésped-microbiota. Una gran ventaja, además de la semejanza anatómica de la situación *in vivo*, es que se pueden usar tejidos de diferentes partes del intestino (desde el duodeno hasta el colon), de varias especies que representan microbiota específico, antecedentes genéticos o de enfermedades, y de animales o humanos, que han sido sometidos *in vivo* a ingredientes alimentarios o compuestos farmacológicos. Sin embargo, las principales restricciones del uso de este modelo en la práctica son el requerimiento de una preparación cuidadosa y laboriosa del tejido, así como también, la viabilidad de este ya que tiene cierto período de tiempo y no se puede utilizar para estudios a más largo plazo (> 5 h) (Pearce *et al.*, 2018; Roeselers *et al.*, 2013).

Los modelos animales son utilizados principalmente para estudiar los mecanismos de virulencia de los serotipos de *Salmonella* que desarrollan enfermedades humanas, como la fiebre tifoidea y la enteritis. El ganado se ha utilizado para estudiar la enfermedad entérica causada por este organismo, mientras que los ratones infectados desarrollan una infección sistémica que comparte características con la fiebre tifoidea humana. Los animales poseen tipos de células complejas, organizaciones arquitectónicas y estructuras de órganos especializados. Más importante aún, los sistemas inmunes intactos de los animales tienen ventajas obvias sobre todos los demás modelos y, por lo tanto, se consideran los más cercanos a los entornos clínicos sobre los modelos de células *in vitro* o de órganos y tejidos *ex vivo* (Coombes *et al.*, 2005; Yin & Zhou, 2018).

## V JUSTIFICACIÓN

*Salmonella* es un bacilo intracelular capaz de causar infecciones intestinales y extraintestinales en el humano. La salmonelosis es una importante enfermedad transmitida por los alimentos que continúa representando una amenaza para la salud pública humana tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. Aunque su prevalencia y mortalidad varía entre regiones, se reporta que hay hasta el 7% de mortalidad. La distribución mundial de alimentos y el movimiento continuo de personas en todo el mundo facilitan la propagación de este agente, lo que permite la introducción de serotipos emergentes de *Salmonella* en los países importadores. *Salmonella* tiene la capacidad de permanecer viable en superficies de contacto con alimentos durante períodos significativos. Se ha reportado la aparición frecuente de *Salmonella* en carnes y productos cárnicos; sin embargo, existe una amplia gama de otros alimentos como lácteos, verduras, productos pesqueros y frutas, que pueden ser fuentes de infección por *Salmonella*. La papaya se encuentra en el tercer lugar de los frutos tropicales más consumidos en el mundo, siendo México el país principal exportador de América Latina. En los últimos años, en EUA se han asociado brotes de salmonelosis al consumo de papayas exportadas de México. Debido a esto, es importante realizar estudios que evalúan la sobrevivencia del patógeno en el fruto una vez que está expuesto a él, así como también evaluar el daño causado una vez que entra al sistema gastrointestinal humano. Los resultados obtenidos aportarán información para realizar una estimación del riesgo al consumir papaya contaminada por *Salmonella*.

## VI HIPÓTESIS

La temperatura de almacenamiento es un factor determinante para el crecimiento de *Salmonella* en papaya, favoreciendo su sobrevivencia en el tracto gastrointestinal, aumentando su capacidad infectiva y el riesgo de desarrollar salmonelosis.

## VII OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura en papaya (*Carica papaya*) sobre la sobrevivencia gastrointestinal, capacidad infectiva y riesgo de infección de *Salmonella*.



## VIII OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 8.1 Estimar la sobrevivencia de *Salmonella* en papayas almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) durante 8 días.
- 8.2 Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella* de manera in vitro/ex vitro en modelo gastrointestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.
- 8.3. Determinar la capacidad infectiva de *Salmonella* en el tejido intestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.
- 8.4 Realizar una estimación del riesgo de salmonelosis por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento.

## IX MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Diseño experimental

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico y en el Laboratorio de Inmunología, ubicados en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El estudio se consideró de tipo transversal, descriptivo y analítico debido a que se realizó en un momento determinado sin tomar en cuenta trabajos anteriores del mismo tema.

### 9.2 Materiales

#### 9.2.1 Cepa

En este estudio se utilizó un pool de 7 cepas de *Salmonella* (*S. Give*, *S. Pomona*, *S. Kedougou*, *S. Stanley*, *S. Oranienburg*, *S. Sandiego* y *S. Muenchen*) previamente aisladas en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico. En la selección de cepas de *Salmonella* se contemplaron los siguientes criterios: (i) serotipo no tifoideo, (ii) estar asociado a un brote epidemiológico y (iii) ser endémico de la región. Para la activación de las cepas almacenadas a -80 °C, se transfirieron 20 µL del cultivo a caldo TSB y se incubó a 35 °C durante 24 h. Posteriormente, se sembró por estriado con la ayuda de un asa en una placa de agar hektoen (BD DIFCO) y se incubó (Yamato, US) en las mismas condiciones. Se tomó una colonia del crecimiento en la placa de agar y se transfirió a TSB para incubarse a 35 °C por 19 h. El inóculo se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X) después de la centrifugación (ThermoFisher, Alemania) (15000 × g, 3 min) y el sedimento resultante

se re-suspendió en 1 mL de PBS 1X. El inóculo se estandarizó a una concentración de  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/mL.

### **9.2.2 Matriz alimentaria**

Se utilizó la pulpa de la papaya como matriz alimentaria. Para ello, se lavó la fruta entera con agua y jabón; posteriormente, la superficie externa de la fruta se desinfectó con una solución alcohólica de yodo (2%) y se dejó secar al aire dentro de una cabina de flujo de aire laminar. La piel de la fruta se retiró asépticamente con una cuchara estéril, y las porciones de la pulpa de fruta se transfirieron a una bolsa estéril y se homogeneizaron. Después de mezclar, se tomó una porción de 50 g de la pulpa con una cuchara estéril y se transfirió a un vaso de precipitado estéril (250 ml). Antes de la inoculación de la pulpa de papaya, se pasteurizó a 80 °C/1 min para eliminar la microflora de fondo.

### **9.2.3 Ratas**

Para el ensayo ex vivo de la fase intestinal se utilizaron segmentos de intestinales de ratas Wistar (hembras y machos) de 250-300 g/peso corporal, de 6-8 semanas de edad. Estas ratas fueron provistas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la misma. Éstos cumplieron con las Guías del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

### **9.3 Metodología**

#### **9.3.1 Inoculación de la matriz**

Se inoculó una porción de 50 g de la pulpa homogeneizada con 0.5 mL ( $10^8$  UFC/mL) del pool de *Salmonella*. Esto corresponde a una muestra en evaluación, por lo que se repitió el procedimiento según las réplicas del experimento, la temperatura de almacenamiento y el número de día de toma de muestra.

#### **9.3.2 Evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella* en papaya**

Debido a la viscosidad de la papaya, se homogeneizó mecánicamente la pulpa antes de cada muestreo. Para ello, se preparó una mezcla con 1 ml de PBS 1X y una muestra de papaya inoculada, la cual se homogeneizó por dos minutos. Posteriormente, se procedió a realizar diluciones seriadas (1:9) en PBS 1X de la mezcla homogenizada y, de cada dilución, se sembraron por spot 10 $\mu$ l en medio hektoen. Para realizar el recuento de colonias después de 24 horas de incubación a 35 °C, Y con el número de UFC/mL se calculó el tiempo de generación de la bacteria. Este procedimiento se replicó utilizando mezclas con muestras de papaya sin inocular con bacteria, lo cual fue utilizado como un procedimiento control del ensayo.

#### **9.3.3 Preparación de las soluciones del sistema digestivo**

La composición y preparación del fluido gastrointestinal simulado (SG) y el fluido intestinal simulado (SI) se basaron en el método descrito previamente por Wijnands *et al.*, (2017).

### **9.3.3.1 Solución salival**

La solución salival (SS) está constituida de 125.6 mg/L NaCl, 963.9 mg/L KCl, 227.8 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 178 mg/L NH<sub>4</sub>Cl, 189.2 mg/L KSCN, 336.5 mg/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 630.8 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, 654.5 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y α-amilasa (75 U/mL; A1031; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), los cuales se agregaron a un bote de vidrio de 1L estéril y se mezclaron.

### **9.3.3.2 Solución gástrica**

La solución gástrica (SG) consistió en una solución que contenía 175.0 g/L de cloruro de sodio, 88.8 g/L de fosfato de sodio dihidrógeno, 89.6 g/L de cloruro de potasio, 22.2 g/L de cloruro de calcio, 30.6 g/L de cloruro de amonio, 65.0 g/L de glucosa, 2.0 g/L de ácido glucurónico, 25.0 g/L de urea, 33.0 g/L de glucosamina, 1.3 g/L de pepsina porcina (2000 U/ mL; P7000; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). El pH se ajustó a 2.5 con ácido clorhídrico 1N. El SG final se mezcló durante la noche a temperatura ambiente.

### **9.3.3.3 Solución intestinal**

La solución intestinal (SI) consistía en 175.3 g/L de cloruro de sodio, 84.7 g/L de bicarbonato de sodio, 8.0 g/L de fosfato de potasio dihidrógeno, 89.6 g/L de cloruro de potasio, 5.0 g/L de cloruro de magnesio, 29.8 g/L de cloruro de calcio deshidratado, sales biliares (10 mM; B8756; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y pancreatina (100

U/ mL; 76190; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). El pH se fijará a 7.0 con hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1N.

#### **9.3.4 Obtención y acondicionamiento de los segmentos de íleon**

Antes del experimento, las ratas Wistar se mantuvieron en ayunas durante la noche (16-20 h) solamente facilitándole el consumo de agua *ad libitum*. Antes de la simulación intestinal, los animales fueron anestesiados con cloroformo durante 15-20 minutos, y posteriormente se realizó una dislocación cervical. Se procedió a hacer una incisión abdominal en la línea media para extirpar el segmento de íleon. El tejido se cortó en secciones de 3 cm y se le aplicó la técnica de saco intestinal evertido, se lavó con PBS 1X hasta eliminar residuos intestinales y se amarró con hilo quirúrgico un extremo para adicionarle 1mL de solución de Krebs-Ringer, finalmente se amarró el otro extremo.

#### **9.3.5 Ensayo gastrointestinal *in vitro* *ex vivo***

##### **9.3.5.1 Fase de simulación de boca**

Se tomó 1g de muestra de papaya con o sin *Salmonella*, posteriormente se transfirió a una bolsa estéril con 5 mL de la solución salival a 37 °C y se homogeneizó durante 1 minuto para simular la masticación.

### **9.3.5.2 Fase de simulación gástrica**

La mezcla de saliva-matriz (con o sin *Salmonella*) (5 mL) se transfirió a un tubo estéril de 50 mL que contenía 5 mL de solución gástrica simulada a pH  $2.0 \pm 0.1$ , previamente realizada. Estas soluciones se incubaron en agitación (150 rpm) durante 2 horas a 37 °C. Para imitar la secreción del jugo gástrico que ocurre cuando los alimentos/bebidas llegan al estómago, se agregaron de 50-100 $\mu$ L HCl 1N cada 30 minutos para disminuir 0.5 unidades de pH hasta alcanzar un pH estable de 2.0.

### **9.3.5.3 Fase de simulación intestinal**

Se agregó a la mezcla gástrica-salival, 10 mL de la solución intestinal simulada pH  $6.9 \pm 0.1$ , a la par se agregó el segmento de íleon previamente acondicionado, finalmente las muestras se incubaron en agitación constante (150 rpm) durante 2 h a 37 °C.

## **9.4 Análisis microbiológicos**

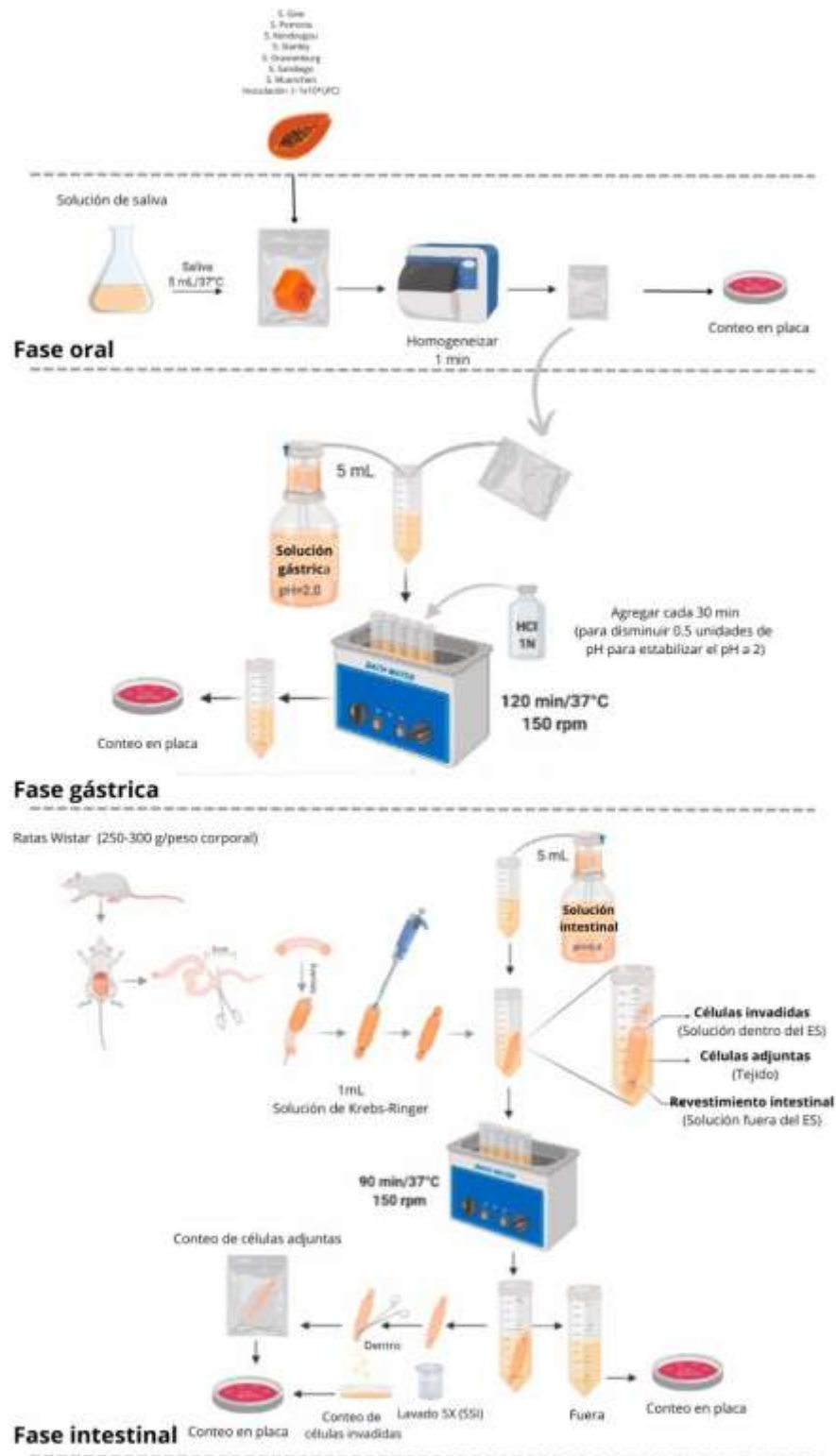
Al final de cada fase (etapas bucal, estomacal e intestinal), se determinó la concentración del patógeno, haciendo diluciones seriadas de las muestras en PBS 1X y sembrando por la técnica de goteo en placa. Para la fase intestinal se determinó la concentración del patógeno en la solución exterior (revestimiento intestinal), en el tejido (células adheridas) y la solución interior (células invadidas) para evaluar el comportamiento en la solución simulada, y la adherencia/capacidad de invasión del patógeno también.

El esquema procedimental del ensayo gastrointestinal in vitro/ex vivo se describe en la figura 2. Brevemente, para evaluar las células adheridas e invadidas, el saco se lavó 5 veces con PBS para eliminar las células que no estaban adheridas al tejido. Luego, el líquido interno restante de los sacos se eliminó sobre un tubo (10 mL) estéril mediante una intervención quirúrgica con tijeras estériles. El líquido interno se utilizó para cuantificar las células invadidas y posteriormente el tejido se transfirió a una bolsa estéril con 10 mL de PBS homogeneizándola durante 10 minutos para evaluar las células adheridas. Todas las placas se incubaron a 35 °C/24 h. El recuento de células adheridas se obtuvo considerando las bacterias adheridas e invadidas, asumiendo que todas las bacterias tienen que adherirse antes de la invasión (Godínez-Oviedo et al., 2021).

## **9.5 Análisis histológicos**

Para evaluar el daño tisular, se utilizó un control negativo de tejido expuesto a muestras no inoculadas con *Salmonella*. Se analizaron tres tejidos diferentes por tratamiento. Las secciones de íleon se fijaron en una solución de formalina tamponada al 15 %. Tras un proceso de deshidratación gradual en series de etanol (70-100 %), los tejidos se embebieron en parafina y se seccionaron (4-5 µm) en un micrótopo. A continuación, los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las muestras teñidas se visualizaron en un microscopio invertido de contraste de fase utilizando un filtro 54 HE C/Y/HR a 2,3 V y 100x. La evaluación de los daños se llevó a cabo utilizando el siguiente análisis de puntuación: ausencia de cambios (grado: 1), edema leve (grado: 2), edema moderado (grado: 3) y edema severo (grado: 4).





**Figura 2.** Esquema del ensayo gastrointestinal in vitro/ex vivo.

## 9.6 Estimación de la probabilidad de infección por *Salmonella*

La probabilidad de infectar por *Salmonella* se obtendrá mediante la fórmula propuesta por Wijnands *et al.* (2017), considerando el número de células de *Salmonella* en cada etapa (boca/estómago/intestino/inserción/invasión). En cada etapa, se asumirá que el recuento bacteriano estará distribuido por Poisson y la concentración una distribución normal.

El cambio de las concentraciones de bacterias entre etapas ( $D_n$ ) se determinó mediante la ecuación:

$$\log (c_n) = \log (c_{n-1}) + D_n \quad (1)$$

Donde:

$\log (c_n)$ : es la concentración de *Salmonella* en una etapa específica ( $n$ ).

$\log (c_{n-1})$ : es la concentración del patógeno en la etapa anterior ( $n-1$ ).

La probabilidad de infección ( $P_{inf}$ ) se calculó mediante una simulación de Monte Carlo (10,000 interacciones) en @RISK Versión 5.0 (Palisade Corporation, Ithaca, NY USA), siguiendo la ecuación:

$$\log (P_{inf}) = \sum_{n=1}^5 D_n \quad (2)$$

## 9.7 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos de sobrevivencia de *Salmonella* en papaya y tracto gastrointestinal se obtuvieron por el método de conteo en placa por duplicado y cuadruplicado respectivamente.

Para la evaluación de los datos se realizó un análisis descriptivo (media y desviación estándar) de la concentración de *Salmonella* (papaya y tracto gastrointestinal) empleando el software procesador de datos Microsoft Excel versión 2007. Además, se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor (tiempo o condición gastrointestinal) y una correlación de Pearson. Un valor de  $P \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Para la determinación de la cinética de crecimiento de *Salmonella* en papaya almacenada a 25 °C, se utilizó el modelo Gompertz para determinar los siguientes parámetros:

(A) = Concentración inicial (Log UFC/g).

(B) = Tasa máxima de crecimiento relativo (UFC/H).

(C) = Valor de la asíntota inferior (UFC/g)

(M) = Tiempo de la tasa de crecimiento absoluta máxima (h).

Estos parámetros sirvieron para calcular las variables de la cinética de crecimiento del microbio incluyendo:  $g$  que indica el tiempo de generación (h), la tasa de crecimiento  $K$  ( $h^{-1}$ ) y  $N$  la concentración máxima esperada (Log UFCg $^{-1}$ ). También se calcularon los valores de  $R^2$  y MSE (error cuadrático medio) como indicadores de la calidad del modelo.

Las fórmulas utilizadas para las variables de crecimiento fueron las siguientes

$$Fase\ Lag = M - \left(\frac{1}{B}\right) \quad (3) \quad K = \frac{BC}{e} \quad (5)$$

$$g = \frac{\log 2e}{BC} \quad (4) \quad N = A + C \quad (6)$$

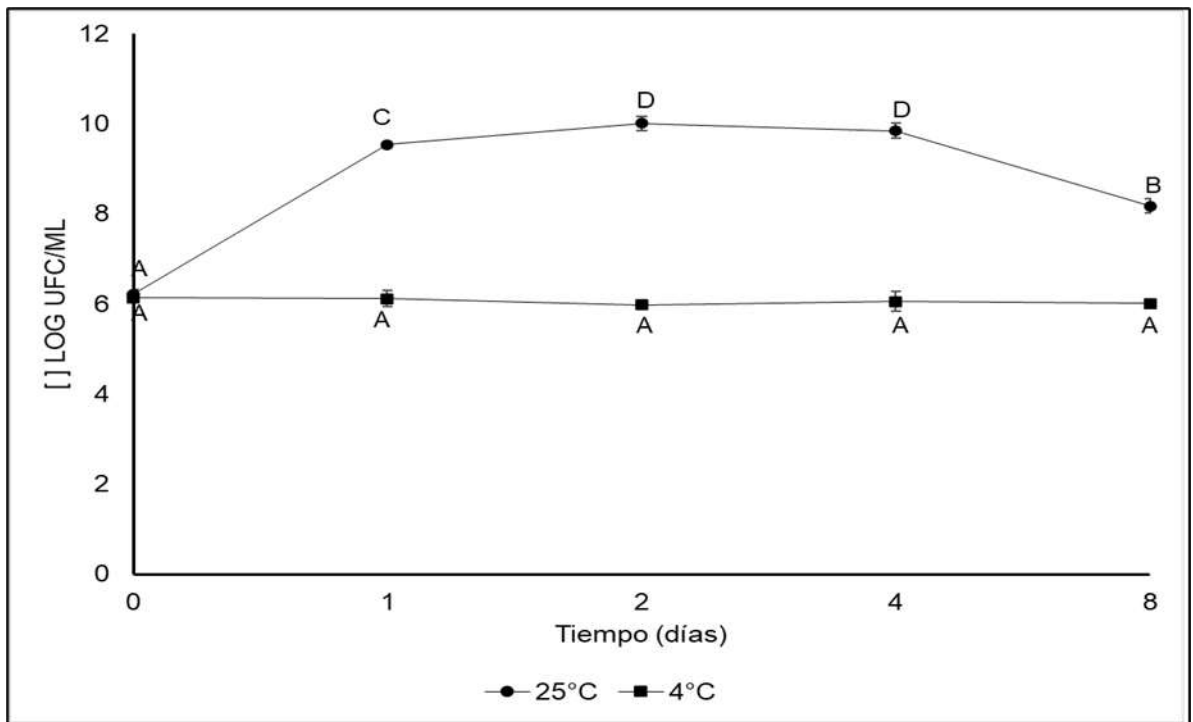
## X RESULTADOS

### 10.1 Estimar la sobrevivencia de *Salmonella* en papayas almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) durante 8 días.

Los resultados de este primer objetivo mostraron una curva de sobrevivencia de *Salmonella* en la pulpa de papaya. Cabe señalar que cuando la papaya fue almacenada a 25 °C la bacteria logró crecer exponencialmente; mientras que, a 4 °C, la bacteria se mantuvo en las mismas concentraciones durante 8 días (figura 3). El análisis estadístico confirmó que existe una relación positiva entre el crecimiento de *Salmonella* en la papaya almacenada a 25 °C y el paso de los días de almacenamiento ( $P=0.000$ ), sin embargo, para el almacenamiento a 4 °C *Salmonella* no presentó crecimiento en los 8 días de almacenamiento ( $p>0.05$ ). Además, se observó que *Salmonella* tiene la capacidad de aumentar su población inicial hasta 2.5 Log a 25 °C después de las 24 h de almacenamiento.

Al utilizar el modelo de Gompertz, se logró describir describir ( $MSE=0.4179$  y  $R^2=0.9162$ ) los parámetros de crecimiento de *Salmonella* en papaya almacenada a 25 °C (cuadro 3), sin embargo, cuando la papaya fue almacenada a 4 °C, no se obtuvo un modelo significativo no para evaluar la cinética de crecimiento de *Salmonella*. Los resultados reportados para la fase de adaptación, tiempo de generación y tasa de crecimiento promedio fueron de 0.99 h, 1.63 h y  $2.54 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Por otra parte, el modelo de Gompertz no fue apropiado para evaluar la cinética de *Salmonella* almacenada a 4 °C. Esto se debe a que el inóculo de *Salmonella* en la papaya mantuvo una concentración constante durante el tiempo de evaluación, lo que impidió generar una función (lineal o no lineal) para la explicación de su crecimiento.



**Figura 3.** Supervivencia de *Salmonella* en papaya almacenada a 4 °C y 25 °C. Los valores de la concentración (Log UFC/mL) de *Salmonella* corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar. Los valores con letras mayúsculas diferentes denotan significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 3.** Parámetros cinéticos de Supervivencia de *Salmonella* en papaya almacenada a 25 °C.

| <b>Parámetro</b>       | <b>Unidad</b>   | <b>Valor</b> |
|------------------------|-----------------|--------------|
| Concentración inicial  | Log UFC/mL      | 5.68         |
| Fase de adaptación     | h               | 0.99         |
| Tiempo de generación   | h               | 1.63         |
| Constante de velocidad | h <sup>-1</sup> | 2.54         |
| Concentración máxima   | Log UFC/mL      | 9.39         |
| MSE                    | -               | 0.4179       |
| R <sup>2</sup>         | -               | 0.9169       |

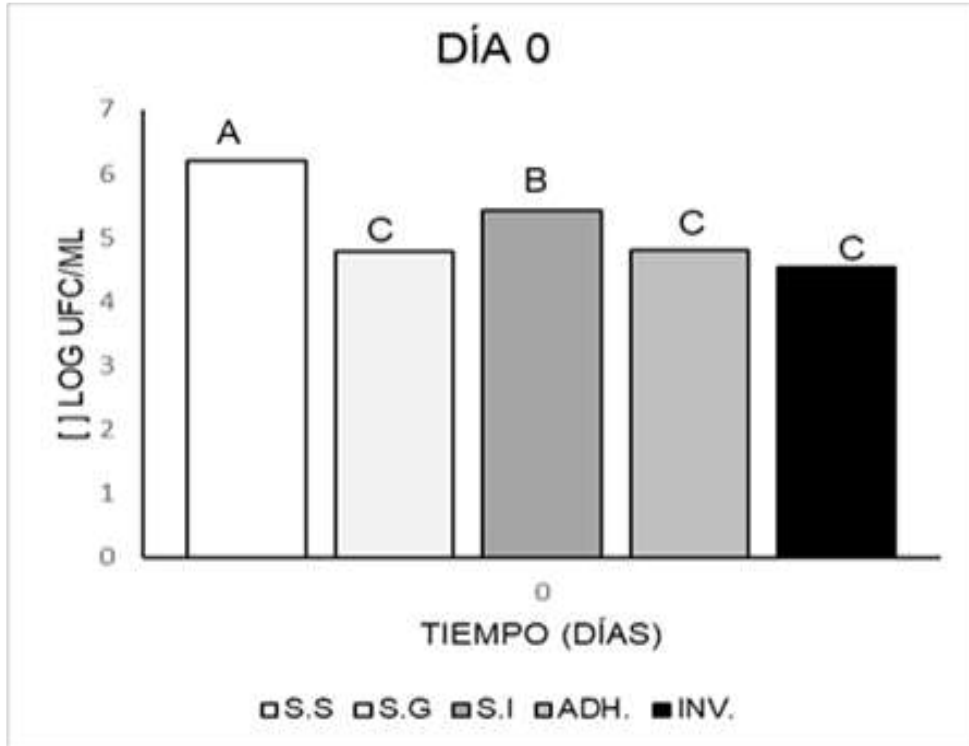
\* Para 4 °C no se realizó el modelo de Gompertz.

Al respecto, el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) ha informado en los últimos 12 años diversos brotes asociados al consumo de papaya importadas de México, en donde se vieron involucrados serovares como *S. Uganda*, *S. Urbana*, *S. Newport*, *S. Agona*, entre otros (CDC, 2011; CDC, 2017; CDC, 2019).

### **10.2 Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella* de manera *in vitro/ex vitro* en modelo gastrointestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.**

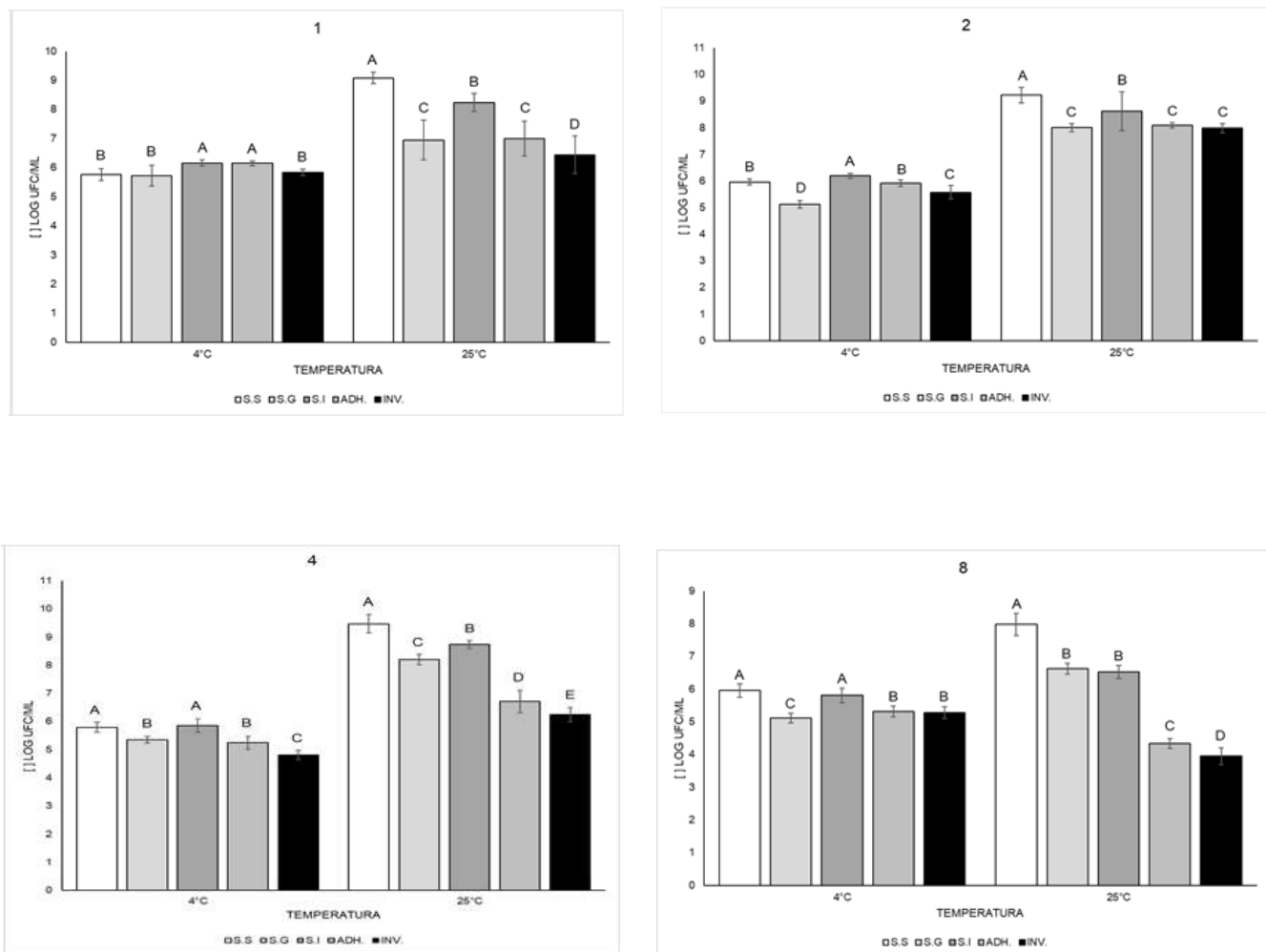
La sobrevivencia en el tracto gastrointestinal de *Salmonella* inoculada en papaya en el tiempo inicial (Día 0) se ilustra en la figura 4. La concentración de *Salmonella* en el tiempo 0 aún no se sometían a las temperaturas de almacenamiento por lo que este valor se considera como el dato inicial para ambos tratamientos.

La evaluación de la sobrevivencia de *Salmonella* en simulación por el paso gastrointestinal previamente inoculada en papaya y almacenada a 4 y 25 °C se observa en la figura 5. Los resultados mostraron que en ambas temperaturas la sobrevivencia de *Salmonella* en cada día de almacenamiento esta modulada por la condición del SGI simulado (P=0.000). De manera general, se reporta que no hubo diferencias significativas en la concentración de *Salmonella* en la matriz inicial (papaya) y la fase bucal en ningún tiempo y en ninguna temperatura.



**Figura 4.** Sobrevivencia en el tracto gastrointestinal de *Salmonella* inoculada en papaya en el tiempo inicial (Día 0). Los valores de la concentración (Log UFC/mL) de *Salmonella* corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar. Dentro de cada día, los valores con letras mayúsculas diferentes denotan significancia estadística ( $P < 0.05$ )





**Figura 5.** Sobrevivencia de *Salmonella* aislada papaya almacenada a 4 y 25 °C en el tracto gastrointestinal. Los valores de la concentración (Log UFC/mL) de *Salmonella* corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar. Dentro de cada día, los valores con letras mayúsculas diferentes denotan significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

La etapa gástrica se observó como un factor de condicionamiento para la sobrevivencia de *Salmonella* siendo la temperatura de 25 °C en donde se obtienen mayores reducciones logarítmicas (-2.1 a -1.3) y en la temperatura de 4 °C *Salmonella* presenta mayor resistencia (-0.04 a -0.84) a la acidez gástrica (**cuadro 4**), sin embargo, la condición gástrica no deja de ser una limitante significativa presentándose como la principal barrera que limita el crecimiento de la bacteria en todos los tiempos y ambas temperatura debido al pH ácido que presenta.

En el presente estudio, la condición intestinal favoreció la población de *Salmonella*. Los resultados mostraron que *Salmonella* se comportó de manera diferente en la etapa intestinal según la temperatura de almacenamiento a la que fue expuesta previamente, de tal forma que a temperatura de 4 °C favoreció su sobrevivencia al paso del tiempo (+0.44 a +1.07), por otra parte, a 25 °C se volvía más susceptible conforme pasaban los días (+1.29 a +0.1) (figura 6).

Para colonizar el intestino, *Salmonella* debe adherirse a la capa superficial epitelial. Posteriormente, un aspecto clave de la patogenia de *Salmonella* es la capacidad de penetrar y atravesar la monocapa epitelial intestinal (Oliveira *et al.*, 2011).

Finalmente, el cuadro 4 muestra el porcentaje de sobrevivencia celular de *Salmonella* aislada de papaya almacenada a 4 y 25 °C durante 8 días. Para ambas temperaturas el % de adherencia e invasión de *Salmonella* tienden a disminuir para el día 8 de almacenamiento. No obstante, su eficiencia de invasión en todos los días es >99%. La capacidad de adherencia (%) está correlacionada con el tiempo de almacenamiento (P=0.022).

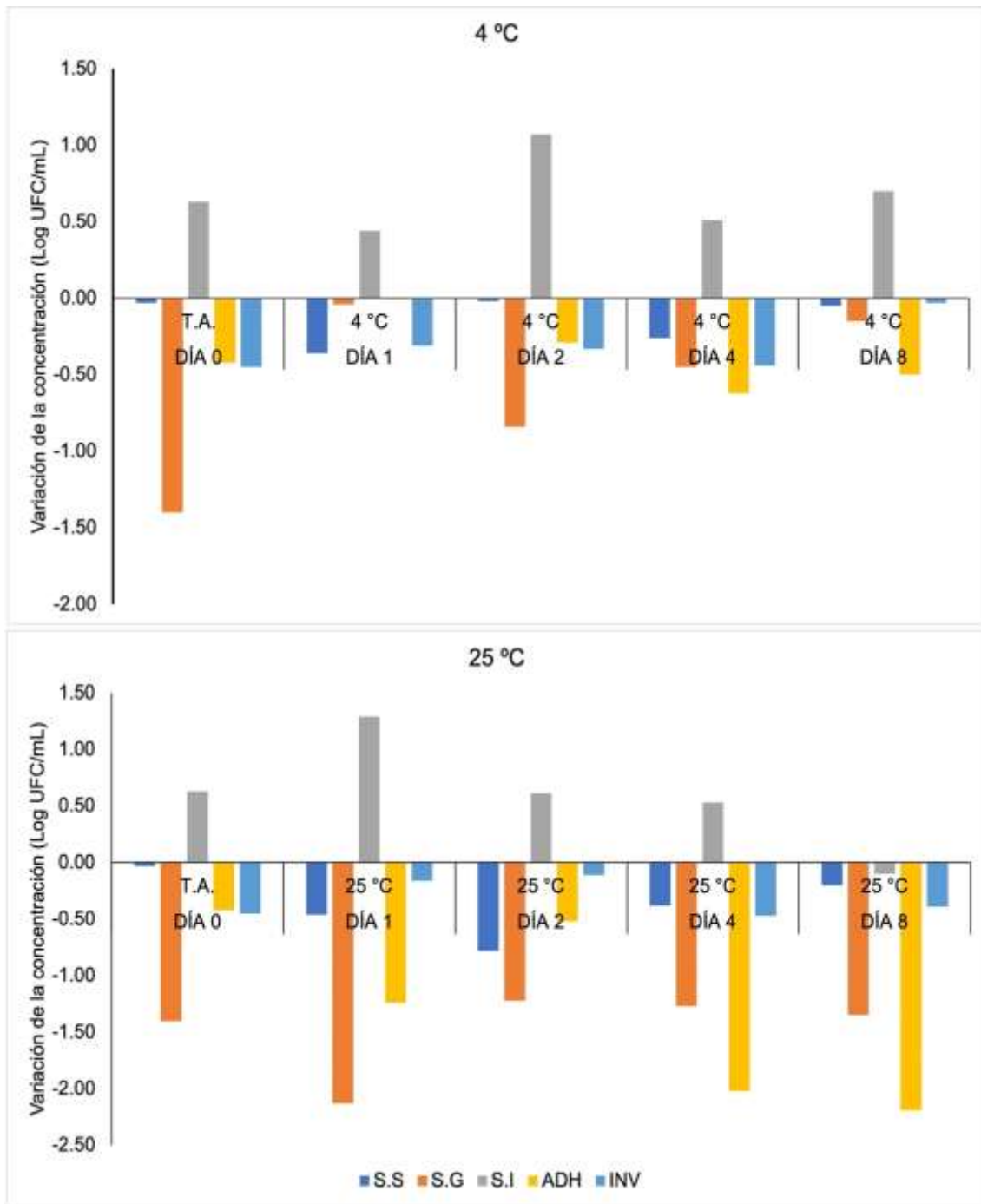
**Cuadro 4.** Porcentaje de sobrevivencia de *Salmonella* en el tracto gastrointestinal, aislada de papaya almacenada a 4 °C y 25 °C.

|                    |                   | <b>DÍA 0</b>      |                   | <b>DÍA 1</b>      |                   | <b>DÍA 2</b>      |                   | <b>DÍA 4</b>      |                   | <b>DÍA 8</b>     |              |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------|
| <b>TEMPERATURA</b> |                   |                   |                   | <b>4 °C</b>       | <b>25 °C</b>      | <b>4 °C</b>       | <b>25 °C</b>      | <b>4 °C</b>       | <b>25 °C</b>      | <b>4 °C</b>      | <b>25 °C</b> |
| <b>ETAPA</b>       | <b>UNIDAD</b>     |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                  |              |
| <b>Papaya</b>      | %<br>(log UFC/mL) | 100<br>(6.22)     | 100<br>(6.12)     | 100<br>(9.54)     | 100<br>(5.99)     | 100<br>(10.01)    | 100<br>(6.06)     | 100<br>(9.85)     | 100<br>(6.01)     | 100<br>(8.18)    |              |
| <b>S.S</b>         | %<br>(log UFC/mL) | 99.50<br>(-0.03)  | 94.08<br>(-0.36)  | 95.22<br>(-0.46)  | 99.62<br>(-0.02)  | 92.21<br>(-0.78)  | 95.69<br>(-0.26)  | 96.17<br>(0.38)   | 99.06<br>(0.05)   | 97.61<br>(-0.20) |              |
| <b>S.G</b>         | %<br>(log UFC/mL) | 77.34<br>(-1.40)  | 99.34<br>(-0.04)  | 76.51<br>(-2.13)  | 85.94<br>(-0.84)  | 86.75<br>(-1.22)  | 92.31<br>(-0.45)  | 86.62<br>(-1.27)  | 85.81<br>(-0.15)  | 83.03<br>(-1.35) |              |
| <b>S.I</b>         | %<br>(log UFC/mL) | 113.19<br>(+0.63) | 107.61<br>(+0.44) | 118.61<br>(+1.29) | 120.84<br>(+1.07) | 107.67<br>(+0.61) | 109.41<br>(+0.51) | 106.45<br>(+0.53) | 113.67<br>(+0.70) | 98.48<br>(-0.10) |              |
| <b>ADH</b>         | %<br>(log UFC/mL) | 92.28<br>(-0.42)  | 99.83<br>(-0.01)  | 84.97<br>(-1.24)  | 95.43<br>(-0.29)  | 93.93<br>(-0.52)  | 89.57<br>(-0.62)  | 76.82<br>(-2.02)  | 91.43<br>(-0.50)  | 66.50<br>(-2.19) |              |
| <b>INV</b>         | %<br>(log UFC/mL) | 90.91<br>(-0.45)  | 94.94<br>(-0.31)  | 92.00<br>(-0.16)  | 94.30<br>(0.33)   | 98.58<br>(-0.11)  | 91.57<br>(-0.44)  | 93.07<br>(-0.47)  | 99.31<br>(-0.03)  | 90.96<br>(0.39)  |              |

CC: Coeficiente de correlación.

IC<sub>95</sub>: Intervalo de confianza de 95%.

% de sobrevivencia= (No. de bacterias en la etapa posterior/No. de bacterias en la etapa anterior)100.



**Figura 6.** Variación logarítmica de *Salmonella* aislada papaya almacenada a 4 y 25 °C en el tracto gastrointestinal. S.S: Solución salival, S.G: Solución gástrica, S.I: Solución intestinal, ADH: Adherencia, INV: Invasión.

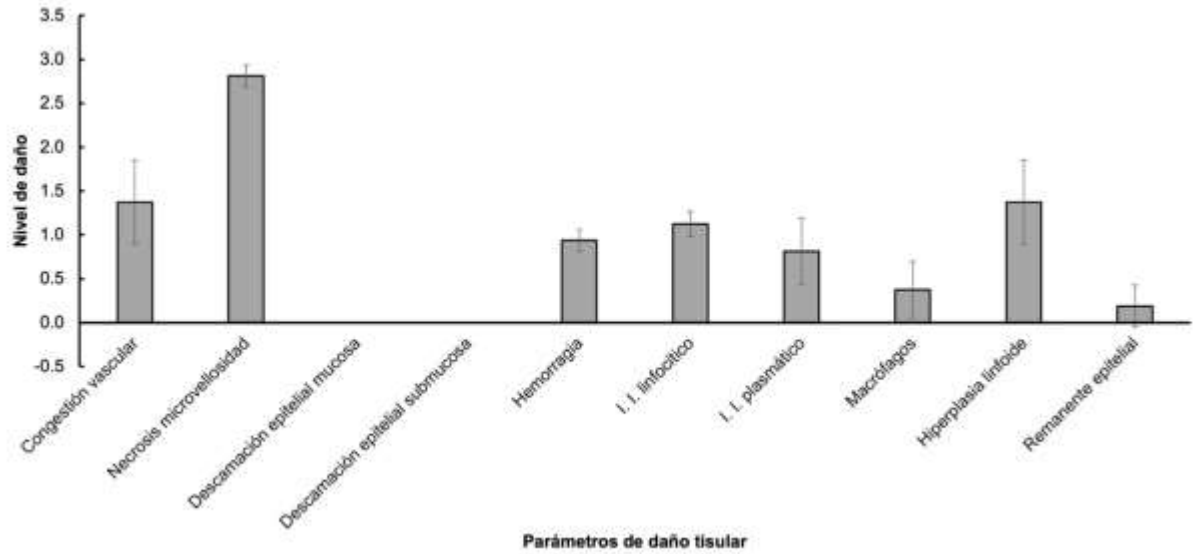
**10.3 C. Determinar la capacidad infectiva de *Salmonella* en el tejido intestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.**

Los resultados del análisis histopatológico de las secciones de íleon infectadas con *Salmonella* vehiculada en papaya almacenada a 25 °C durante 8 días se muestra en la Cuadro 5. El análisis estadístico descarta que el tiempo de almacenamiento de la papaya refrigerada a 25 °C inflencie la capacidad de *Salmonella* para causar daño celular ( $P > 0.05$ ). De manera global, cuando *Salmonella* esta vehiculada en papaya almacenada a 25 °C causa necrosis severa a las microvellosidades con congestión vascular e hiperplasia linfoide de moderada a leve (Figura 7 y 8).

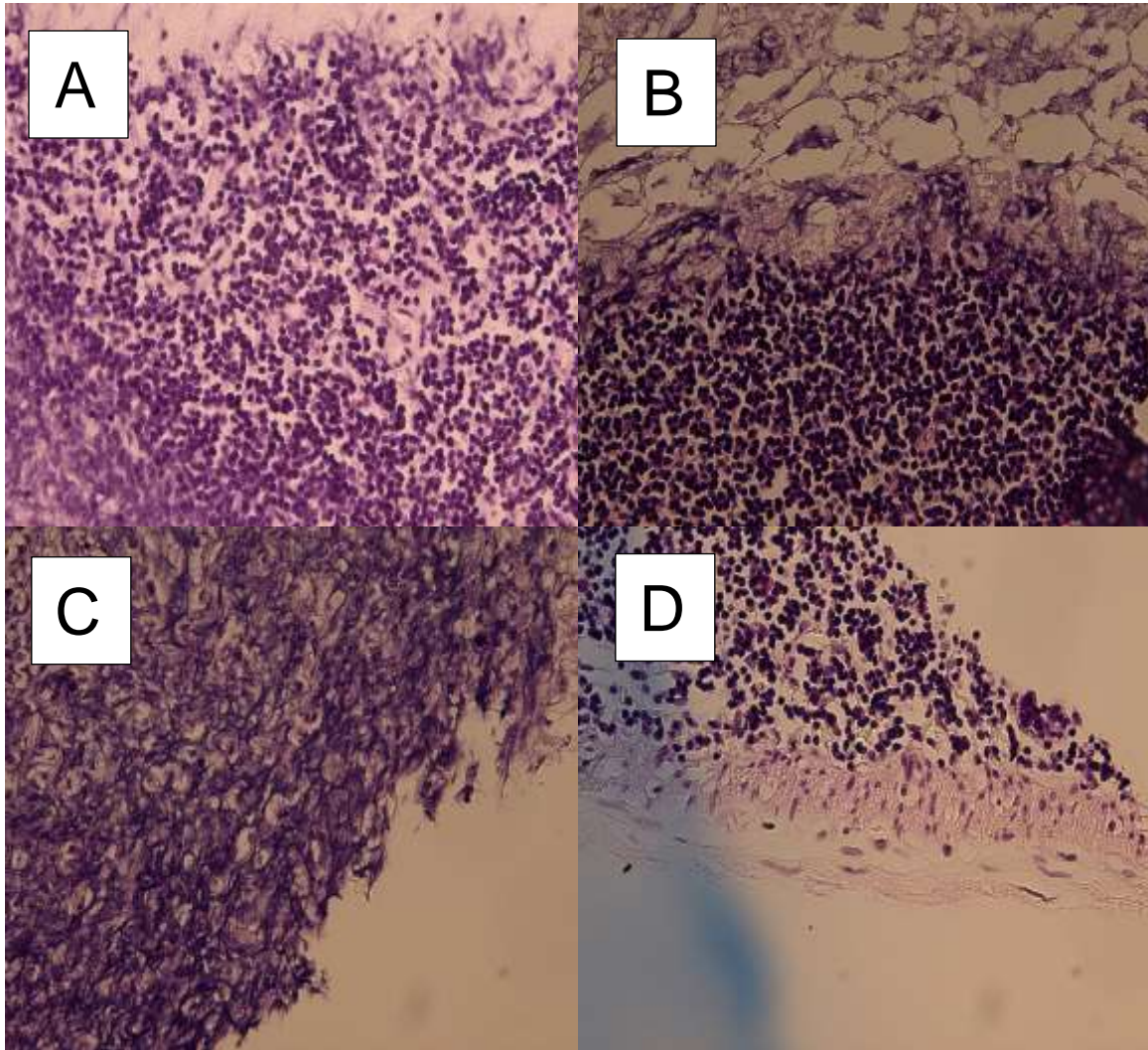
**Cuadro 5.** Evaluación del daño tisular por la infección de *Salmonella* vehiculada en papaya almacenada a 25 °C durante 8 días.

| Parámetro                       | Día       |           |           |           | Valor p |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
|                                 | 1         | 2         | 4         | 8         |         |
| Descamación epitelial mucosa    | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | **      |
| Descamación epitelial submucosa | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | **      |
| Remanente epitelial             | 0.0 ± 0.0 | 0.5 ± 0.6 | 0.3 ± 0.5 | 0.0 ± 0.0 | 0.248   |
| Macrófagos                      | 0.5 ± 0.6 | 0.3 ± 0.5 | 0.8 ± 0.5 | 0.0 ± 0.0 | 0.168   |
| Hemorragia                      | 1.0 ± 0.8 | 1.0 ± 0.0 | 0.8 ± 0.5 | 1.0 ± 0.0 | 0.844   |
| I. I. plasmático                | 1.0 ± 0.8 | 1.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.0 | 0.3 ± 0.5 | 0.907   |
| I. I linfocítico                | 1.3 ± 1.3 | 1.3 ± 0.5 | 1.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.0 | 0.113   |
| Hiperplasia linfoide            | 1.0 ± 0.8 | 1.5 ± 0.6 | 1.0 ± 0.8 | 2.0 ± 0.8 | 0.248   |
| Congestión vascular             | 1.8 ± 1.0 | 1.3 ± 0.5 | 1.8 ± 0.5 | 0.8 ± 0.5 | 0.141   |
| Necrosis microvellosidad        | 2.8 ± 0.5 | 2.8 ± 0.5 | 2.8 ± 0.5 | 3.0 ± 0.0 | 0.802   |

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de cuatro muestras de tejido por tratamiento. Se obtuvo una muestra de tejido por rata Wistar. El nivel de daño del tejido se clasificó como: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (severo).



**Figura 7.** Evaluación del daño tisular por la infección de *Salmonella* vehiculada en papaya almacenada a 25 °C. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro muestras de tejido por tratamiento. Se obtuvo una muestra de tejido por rata Wistar. El nivel de daño del tejido se clasificó como: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (severo).



**Figura 8.** La imagen el daño tisular de muestra de tejidos infectados en los días 0 (A), 2 (B), 4 (C) y 8 (D) de evaluación de *Salmonella* vehiculada en papaya.



#### **10.4 Realizar una estimación del riesgo de salmonelosis por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento.**

Los resultados de evaluación de la probabilidad de infección ( $P_{inf}$ ) por *Salmonella* utilizando como vehículo la pulpa de la papaya fresca previamente almacenadas a dos temperaturas diferentes (4 y 25 °C) mostraron que la temperatura fue un predictor para el incremento de la probabilidad de infectarse al consumir el alimento en la simulación. En comparación con la temperatura de almacenamiento de 25 °C los datos obtenidos indican que *Salmonella* es capaz de aumentar la probabilidad de infección cuando el vehículo es almacenado previamente a 4 °C hasta un tiempo de estudio de 8 días siendo ese último día de estudio en donde se muestra la mayor  $P_{inf}$  ( $1.99 \times 10^{-01}$ ), por lo contrario, a 25 °C *Salmonella* disminuye la probabilidad de causar infección con el aumento de días de almacenamiento como se muestra en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Probabilidad de infección por *Salmonella* spp. mediante el consumo de papaya.

| Temperatura | Día | P <sub>inf</sub>       | D.E                    | PERCENTIL              | PERCENTIL              |
|-------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|             |     |                        |                        | 25                     | 75                     |
| 4 °C        | 0   | 4.22×10 <sup>-02</sup> | 3.89×10 <sup>-02</sup> | 8.40×10 <sup>-03</sup> | 7.65×10 <sup>-02</sup> |
|             | 1   | 7.08×10 <sup>-01</sup> | 4.29×10 <sup>-01</sup> | 2.76×10 <sup>-01</sup> | 9.29×10 <sup>-01</sup> |
|             | 2   | 4.28×10 <sup>-01</sup> | 1.78×10 <sup>-01</sup> | 2.49×10 <sup>-01</sup> | 5.88×10 <sup>-01</sup> |
|             | 4   | 5.80×10 <sup>-02</sup> | 1.44×10 <sup>-02</sup> | 4.38×10 <sup>-02</sup> | 7.02×10 <sup>-02</sup> |
|             | 8   | 1.99×10 <sup>-01</sup> | 8.67×10 <sup>-02</sup> | 1.25×10 <sup>-01</sup> | 2.87×10 <sup>-01</sup> |
| 25 °C       | 0   | 3.46×10 <sup>-02</sup> | 3.16×10 <sup>-02</sup> | 6.89×10 <sup>-03</sup> | 6.27×10 <sup>-02</sup> |
|             | 1   | 2.12×10 <sup>-03</sup> | 3.20×10 <sup>-03</sup> | 2.47×10 <sup>-04</sup> | 5.39×10 <sup>-03</sup> |
|             | 2   | 9.89×10 <sup>-03</sup> | 5.07×10 <sup>-03</sup> | 6.64×10 <sup>-03</sup> | 1.26×10 <sup>-02</sup> |
|             | 4   | 2.60×10 <sup>-04</sup> | 1.24×10 <sup>-04</sup> | 1.90×10 <sup>-04</sup> | 3.33×10 <sup>-04</sup> |
|             | 8   | 6.69×10 <sup>-05</sup> | 3.87×10 <sup>-05</sup> | 3.47×10 <sup>-05</sup> | 1.07×10 <sup>-04</sup> |

P<sub>inf</sub>= probabilidad de infección por *Salmonella* spp.; D.E= desviación estándar.

## XI DISCUSIÓN

### 11.1 Estimar la sobrevivencia de *Salmonella* en papayas almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C) durante 8 días.

*Salmonella* es un patógeno transmitido principalmente a través del consumo de alimentos (Hoelzer *et al.*, 2011). En los últimos años han sido asociados diversos brotes por *Salmonella* asociados al consumo de frutas tropicales (mango, papaya, piña, coco, plátano, pitahaya, aguacate, mamey, etc.), la sobrevivencia del patógeno se le atribuye al alto contenido de azúcares y alta actividad de agua, brindando así, condiciones para el crecimiento y la supervivencia microbiana (Ma *et al.*, 2016; Strawn & Danyluk, 2010).

Particularmente, la papaya maradol presenta un contenido de azúcar y actividad de agua de 6% y >0.980, respectivamente (Saeed *et al.*, 2014), lo que pudiera representar un entorno favorable para el desarrollo de microorganismos. Al respecto, el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) ha informado en los últimos 12 años diversos brotes asociados al consumo de papaya importadas de México, en donde se vieron involucrados serovares como *S. Uganda*, *S. Urbana*, *S. Newport*, *S. Agona*, entre otros (CDC, 2011; CDC, 2017; CDC, 2019).

En un estudio realizado por Penteadó & Leitao, (2004), se observó un aumento de hasta 4 log UFC/g en la concentración de *Salmonella* después de un periodo de almacenamiento de 24 h a 20 °C en pulpa de papaya. Strawn & Danyluk, (2010) evaluaron el crecimiento de *Salmonella* en papaya pre-cortada almacenada a 23 ±2 °C previamente inoculadas en concentraciones 5, 3 y 1 log UFC/g, reportando durante

un almacenamiento de 24 h un aumento de la concentración de 2.3, 3.6 y 3.8 log UFC/g respectivamente. De manera similar, Feng *et al.*, (2017) evaluaron el crecimiento de *Salmonella* spp. en frutas frescas (melones, sandías, pitayas, mangos y papayas) precortadas, en estos alimentos se alcanzó una concentración de 8.0 log UFC/g después del día 3. Wang y col., (2018) reportaron un incremento en la concentración de *S. Typhimurium* en fresas de 2 a 7.7 log UFC/g durante su almacenamiento a 25 ° C durante 3 días. Los datos reportados por dichos autores son similares a los obtenidos en el presente estudio, en donde *Salmonella* creció bien bajo la temperatura de incubación de 25 °C observándose una curva de crecimiento completa, incluidas todas las fases de retardo, exponencial y estacionaria como se muestra en la figura 2.

En la actualidad la congelación y la refrigeración siguen siendo uno de los métodos más comunes de conservación de alimentos ya que mediante la reducción de la temperatura durante el almacenamiento se logra afectar diversos mecanismos funcionales de los microorganismos, incluido el metabolismo. Dicha exposición a temperaturas frías (< 4°C) es un determinante para inhibir el crecimiento de *Salmonella*, y que esta desencadene procesos de adaptación adaptación para su supervivencia y, finalmente, pueda llevarse a cabo un crecimiento reducido bajo temperaturas ambientales (Ricke *et al.*, 2018).

Los resultados de este estudio también muestran que *Salmonella* no logró multiplicarse significativamente a la temperatura de frío que fue expuesta (4 °C) ( $p > 0.05$ ) durante los 8 días de almacenamiento, manteniendo su concentración inicial en conteos logarítmicos constantes (6 log UFC/mL). Los resultados reportados por Huang *et al.*, (2019) fueron muy similares ya que observaron que *Salmonella* logró

sobrevivir a una temperatura constante de 4 °C en diversos frutos (incluyendo melón) y mantuvo la concentración del inóculo inicial sin cambios significativos (2.6 log UFC/g) durante 7 días de almacenamiento. En un estudio realizado por Singh & Yemmireddy, (2021) no se observaron cambios significativos de *Salmonella* inoculada en papaya, manteniéndose cercano a su inóculo inicial (3,7 log UFC/g) en un periodo de 14 días de almacenamiento. Así también Singh *et al.*, (2021) informaron una reducción de 0.85 log UFC g<sup>-1</sup> en un lapso de 7 días del inóculo inicial de *Salmonella* en papaya almacenada a 4 °C. Ma *et al.*, (2016) informaron que las poblaciones de *Salmonella* en su estudio permanecieron iguales al nivel de inóculo inicial después de 6 días de almacenamiento a 4 °C, lo que indica que no hubo crecimiento en todas las frutas analizadas. Los resultados obtenidos demuestran que *Salmonella* es capaz de sobrevivir durante periodos prolongados de tiempo a una temperatura de refrigeración <4 °C lo que podría representar un peligro para la salud pública especialmente cuando este se encuentra almacenado a temperaturas de abuso.

Wang *et al.*, (2018) reportaron que el modelo de Gompertz modificado ( $R^2=0.98$  y  $MSE=0.26$ ) fue apto para describir los patrones de crecimiento de *S. Typhimurium* en fresas. Por su parte Penteado & Leitao, (2004) reportaron un tiempo de generación de 1.74 h de *Salmonella* en pulpa de papaya almacenada a 20 °C. Sant'Ana *et al.*, (2012) evaluaron el tiempo de generación de las cepas *S. Typhimurium* (# 277), *S. Typhimurium* (386) y *S. Enteritidis* ATCC 13076 en lechuga almacenada a 25 °C los resultados mostrados fueron de  $1.4\pm 0.4$ ,  $2.2\pm 0.7$  y  $1.8\pm 0.1$ , respectivamente. Por lo descrito anteriormente la papaya es considerada como un vehículo potencial de transmisión de la bacteria si ocurre la pérdida de las buenas prácticas higiénicas.

## **11.2 Evaluar la sobrevivencia de *Salmonella* de manera *in vitro*/ex vitro en modelo gastrointestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.**

Antes de llegar a un sitio en el huésped adecuado para la colonización, los patógenos inoculados deben atravesar múltiples barreras, cada una con una probabilidad variable de sobrevivencia. El sistema gastrointestinal (SGI) es el encargado de la digestión y absorción de los alimentos y líquidos ingeridos (Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2017).

Se ha descrito a *Salmonella* como un patógeno capaz de cruzar las barreras presentadas por el SGI permitiéndole así llegar al intestino delgado y adherirse directamente a la barrera epitelial intestinal e invadirla (Gagnon *et al.*, 2013; König *et al.*, 2016).

La saliva se considera como la primera línea de defensa contra microorganismos, saliva humana contiene una serie de agentes físicos, fisicoquímicos y químicos que protegen los tejidos orales contra compuestos nocivos, en particular los producidos por diversos microorganismos. Sin embargo, *Salmonella* es capaz de sobrevivir casi en un 100% a la exposición de fluidos salivales simulados.

Una vez del consumo del alimento y atravesar con facilidad la etapa salival los patógenos como *Salmonella* están expuestos al pH estomacal extremo y luego a las sales biliares, alta osmolaridad y baja tensión de oxígeno en el intestino. Además, la competencia por los nutrientes con las bacterias comensales gastrointestinales y la producción por parte de estos últimos de bacteriocinas y metabolitos con actividad

antimicrobiana representan un desafío importante (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2012; Godínez-Oviedo *et al.*, 2021).

Estudios recientes han señalado que los alimentos se pueden comportar como un amortiguador aumentando así su probabilidad de sobrevivencia por el paso gástrico. Así también, *Salmonella* pueden presentar mayor adaptación a condiciones de estrés cuando presentan previo estrés ambiental como el pH bajo, estrés por frío y componentes antimicrobianos (Godínez-Oviedo *et al.*, 2021; Karabiyikli *et al.*, 2014).

Akbar & Anal, (2015) reportaron una reducción mayor a 4 log UFC/g de la concentración de *S. enterica* inoculado en carne de ave a un pH= 2 y alrededor de 1 log a un pH= 3. Diversos estudios han demostrado que los alimentos sólidos ricos en proteínas son capaces de proteger a *Salmonella* de la acidez estomacal (de Melo *et al.*, 2017). En este caso la papaya fresca presenta un contenido proteico de 0.61% (Saeed *et al.*, 2014), lo cual pudiera favorecer a su capacidad de resistencia al ácido.

Karabiyikli *et al.*, (2014) evaluaron la sobrevivencia de *Salmonella* previo a una exposición de almacenamiento a 4 °C inoculado en jugo de naranja agria neutralizado (pH= 7) obteniendo una disminución de apenas 1 log UFC/mL. En un estudio realizado por Silva *et al.*, (2016) al someter cepas de *S. Enteritidis* (CCS3 y ATCC 13076) inoculadas en carne de cerdo a fluido gástrico simulado (FGS) previamente expuestas a un tratamiento ácido (pH 4.0–5.0) y un almacenamiento frío a 4 °C durante 7 días, reportaron que la cepa CCS3 fue más tolerante al FGS cuando se expuso a un pH de 4, por lo tanto concluyen que la exposición a un ambiente ácido y frío durante el procesamiento mejoró la capacidad de *S. Enteritidis* para sobrevivir en el ambiente gástrico del estómago humano, aumentando así el riesgo de infección por *Salmonella*

posterior al consumo del alimento contaminado. Alvarez-Ordóñez *et al.*, (2012) en un estudio demostraron que las temperaturas de refrigeración protegen a *S. Typhimurium* de la inactivación en alimentos ácidos e indica que la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) de *S. Typhimurium* está determinada por la temperatura de almacenamiento y la composición del alimento. Se ha documentado que cuando *Salmonella* es expuesta a un estrés por frío es capaz de inducir múltiples genes asociados con el metabolismo de los aminoácidos, el estrés oxidativo y la reparación del ADN, lo que le permite un efecto protector para una posterior exposición al estrés ácido que se enfrenta en el estómago (Shah *et al.*, 2013).

Así también se han descrito sistemas de resistencia a los ácidos que se puede presentar *S. entérica*, los cuales se clasifican: (i) una resistencia a los ácidos (AR) independiente del pH, que se expresa al entrar el patógeno en la fase estacionaria como parte de una respuesta de estrés generalizada; y (ii) sistemas de respuesta de tolerancia al ácido (ATR) inducibles por pH bajo, que se manifiestan tanto en los niveles de fase logarítmica como estacionaria y que confieren protección al patógeno contra la exposición posterior a condiciones ácidas letales ( $\text{pH} < 4.0$ ) (Lianou *et al.*, 2017).

*Salmonella* es tolerante a las sales biliares y capaz de sobrevivir al paso GI, pudiendo adherirse a las células epiteliales, en donde se ha demostrado que el moco intestinal puede comportarse como un nutriente para bacterias macrobióticas y algunos patógenos como *Salmonella* promoviendo el crecimiento bacteriano y así la colonización intestinal por parte de las bacterias adheridas proporcionándole la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en las regiones externas de la capa mucosa (de Melo *et al.*, 2017; Gagnon *et al.*, 2013).



Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con estudios previos, ya que para ambas temperaturas y en todos los días de almacenamiento *Salmonella* logro aumentar su concentración comparada con la etapa gástrica previamente expuesta. Al respecto Vieira *et al.*, (2019) en un estudio demostraron que *S. Typhimurium* es más resistente y sobrevive mejor a la barrera gastrointestinal con un pH de 1.5 en comparación con *L. monocytogenes*. Así mismo, Godinez-Oviedo *et al.*, (2021), quienes evaluaron la probabilidad y gravedad de la infección de *Salmonella* transmitida en diferentes matrices (queso y agua) mediante un modelo de gastrointestinal *in vitro/ex vivo*, mostraron resultados con reducciones significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de *Salmonella* en la fase gástrica. En la fase intestinal se registró un incremento en la concentración de *Salmonella*, principalmente en el queso, así también observo una asociación entre la concentración de células que llegan a la fase intestinal y la concentración de células adheridas e invadidas.

Oliveira *et al.*, (2011) evaluaron el potencial patogénico de *S. Typhimurium* DT104 inoculada en lechuga, mediante la capacidad de sobrevivir en un sistema simulado del tracto gastrointestinal y la capacidad de adherirse e invadir células Caco-2, con previo almacenamiento a una temperatura fría (4 °C, 4 días) y a temperatura ambiente (25 °C, 1 día), en donde se observó una diferencia significativa ( $P = 0.027$ ) en la reducción de *Salmonella* entre las temperaturas en la etapa gástrica, encontrando que cuando fue almacenado a 4 °C presenta la mayor resistencia a la sobrevivencia, de la misma manera en la fase intestinal muy similar a nuestro estudio en ambas temperaturas de almacenamiento mostraron un aumento siendo también la temperatura de 4 °C la que más favoreció al aumento de su población.

Estudios realizados por Shah *et al.*, (2014) demostraron que la exposición previa de *Salmonella* al estrés por frío aumentó significativamente (  $P < 0,05$ ) la adhesión y la invasión de células epiteliales intestinales cultivadas (Caco-2), esto se relacionó a los resultados de un perfil génico realizado en donde observaron que *Salmonella* tuvo expresión de varios genes asociados con la virulencia y genes asociados con la secreción y el tráfico de proteínas, el metabolismo y la reparación del ADN y la degradación del ARN cuando fue sometida al estrés por frío.

### **11.3 Determinar la capacidad infectiva de *Salmonella* en el tejido intestinal expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de la papaya.**

Los patógenos intestinales infecciosos, incluidas bacterias como *Salmonella* tienen diferentes mecanismos para acceder al huésped. Algunos se adhieren directamente a la barrera epitelial intestinal y la invaden, mientras que otros rompen esta barrera a través de la secreción de toxinas. La barrera intestinal se compone principalmente de la capa de moco, la capa epitelial y la lámina propia subyacente (Konig *et al.*, 2016). En la literatura se ha evidenciado la variabilidad de la capacidad infectiva de *Salmonella*. Gagnon *et al.*, (2013) evaluaron la capacidad de adhesión e invasión de diferentes serovares de *Salmonella* en tres modelos celulares (HT29-MTX, Caco-2 y HT-29), en donde se reportó una mayor adhesión en el modelo celular HT29-MTX lo cual se relacionó a la presencia de moco que produce particularmente ese modelo celular, otra parte la invasión mostro diferencias significativas del % de invasión entre cada sepa, sin embargo se mostró una mayor invasión en el modelo HT29-MTX y HT-29 respectivamente. Verma *et al.*, (2018) informaron que los aislados de *Salmonella* tuvieron mayor supervivencia/replicación intracelular en comparación con una cepa de referencia *Salmonella* ATCC 13076, aumentando su capacidad de sobrevivencia y replicación intracelular de 2 a 8 h después de la infección. Godinez-Oviedo *et al.*, (2021) reportaron que cuanto mayor era la carga bacteriana que llegaba al intestino, mayor era el número de células que se adherían e invadían el tejido.

Estas diferencias en los resultados son asociados a las propiedades que brinda el moco intestinal debido a la alta adhesividad de las mucinas presentes, así también a la cantidad de las estructuras adhesivas que presenta cada serovar.

Actualmente, los estudios de capacidad de adhesión e invasión se centran en la utilización de líneas de células intestinales como Caco-2 y HT-29. Sin embargo, aún existen limitaciones, dado a que carecen de complejidad del tejido intestinal, como la producción de moco, los transportadores intestinales, la conformación del tejido, la fabricación enzimática y la interacción entre las células inmunitarias y el microbiota intestinal. Por su parte los ensayos *ex vivo* incluyen tejido u órganos previamente aislados, los cuales conservan su estructura histológica lo que permite estudiar procesos *in vivo* en condiciones *ex vivo* controladas, proporcionando condiciones más reales para probar mecanismos celulares y moleculares subyacentes de la interacción entre el hospedero y la microbiota. No obstante, la viabilidad del tejido es uno de los parámetros limitantes para la implementación de dichos modelos (Gagnon *et al.*, 2013; Laparra & Sanz, 2009; Roeselers *et al.*, 2013).

La técnica del saco intestinal evertido es un método utilizado principalmente para la evaluación de los mecanismos y la cinética de la absorción de fármacos (Alam *et al.*, 2012). Por lo que la información disponible para la evaluación de la adhesión e invasión de patógenos en dicho modelo es limitada. Debido a esto, se sugiere realizar más estudios que puedan respaldar los resultados obtenidos en el presente estudio.

#### **11.4 Realizar una estimación del riesgo de salmonelosis por el consumo de papaya expuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento.**

Los estudios de evaluación cuantitativa de riesgos microbianos (ECRM) han sido de gran aporte para la predicción de casos de salmonelosis a partir de la simulación de escenarios más realistas por los que pasa el alimento contaminado previo a ser consumido por el humano.

Después de contaminar intencionadamente la pulpa de papaya y almacenarla (a 4 y 25 °C), la cinética de crecimiento de *Salmonella* spp. fue estimada por los modelos matemáticos desarrollados en este estudio de acuerdo con el tiempo y temperatura a la que la pulpa de la papaya fue almacenada, así también, se evaluó la probabilidad de infección por *Salmonella* después de enfrentarse a un modelo *in vitro/ex vivo* del SGI.

El modelo de infección utilizado en el presente estudio permitió agregar un escenario de infección más cercano a la realidad, pudiendo evaluar la temperatura y tiempo de almacenamiento como factores que pueden predisponer a una mayor o menor probabilidad de infección por *Salmonella* posterior al consumo de la pulpa de papaya contaminada. Los resultados mostraron que en la temperatura de 4 °C la probabilidad de infección por *Salmonella* aumenta ( $4.22 \times 10^{-02}$  a  $1.99 \times 10^{-01}$ ) durante los 8 días de estudio, esto puede ser asociado a que la concentración de *Salmonella*, esto puede estar asociado al aumento de una resistencia de *Salmonella* dada al estrés por frío. Por otro lado, en la temperatura de 25 °C *Salmonella* logró aumentar su concentración inicial durante los 8 días de estudio, lo cual se vio reflejado en los resultados de la probabilidad de infección, se observó que la probabilidad de infección

se mantuvo alta en los primeros 2 días, cuando *Salmonella* se encontraba en su fase logarítmica ( $3.46 \times 10^{-02}$  a  $6.69 \times 10^{-05}$ ). En la literatura se ha reportado que *Salmonella* es capaz de aumentar su capacidad de virulencia cuando es expuesta a un estrés previo, como el frío, el calor o a la acidez. Esto puede explicar por qué la probabilidad de infección en el presente estudio es más alta cuando *Salmonella* fue expuesta al frío (4 °C) en comparación al almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C). Shaha *et al.*, (2014), demostraron que *Salmonella entérica* aumento significativamente la capacidad de adhesión e invasión en líneas celulares Caco-2 cuando el patógeno fue expuesto previamente a frío (4°C/5h), la evaluación de la expresión génica de *Salmonella* en células Caco-2 infectadas reveló la inducción de genes de proliferación intracelular, *spvR* y *spvABC* y varios genes relacionados con respuesta al estrés, incluidos los genes de choque por frío *cspA*, *cspB* y *cspE*, así también genes asociados al T3SS ubicados en las islas de patogenicidad (I y II) de *Salmonella*, lo que indico una mayor patogenicidad tras la exposición al frío. Otros estudios han reportado que el estrés por frío también induce genes que ayudan a la supervivencia y persistencia de *Salmonella* a una exposición posterior a los ácidos (Shaha *et al.*, 2013), lo que nos lleva a sugerir que el estrés por frío podría, de hecho, aumentar la patogenicidad general en *Salmonella* y, por lo tanto, aumentar el riesgo de infección.

Diversos autores han implementado en sus estudios los ECRM para cuantificar el riesgo de salmonelosis bajo diversos escenarios sobre el consumo de alimentos contaminados, principalmente en carnes como el pollo. Zhu *et al.*, (2017) informaron que el riesgo medio estimado de salmonelosis por el consumo de una ración de pollo comprado al por menor en hogares de China fue de  $1.2 \times 10^{-4}$ . Jeong *et al.*, (2018),

evaluaron el riesgo de salmonelosis por el consumo de pollos en Corea del Sur mediante un modelo de simulación Monte Carlos usando @RISK, en donde encontraron que el consumo de pollos de ventas al por menor y la temperatura de cocción previa aumentaban la probabilidad de salmonelosis. Por otra parte en el Collineau et al., (2020), evaluaron el riesgo de Salmonelosis por *S. Heidelberg*, en donde el escenario de referencia (sin intervenciones) predijo una probabilidad promedio de enfermedad de 1.07 por 100,000 porciones, lo que correspondía a un promedio de 21,732 casos por *Salmonella* resistente a ceftiofur por año.

La herramienta de modelado permite a los usuarios evaluar, comparar y clasificar los riesgos planteados por múltiples pares de peligros alimentarios en todas las etapas del sistema de suministro de alimentos, desde la producción primaria, pasando por la fabricación y el procesamiento, hasta la distribución minorista y, en última instancia, hasta el consumidor.

Sin bien los ECRM son de gran importancia para cuantificar el riesgo, existen aún lagunas de información debido a la dificultad de predecir el comportamiento de los diferentes serovares de *Salmonella* estudiados ya que muchos difieren en su capacidad para crecer/sobrevivir en un determinado ambiente o el mecanismo de infección en los humanos (virulencia), los que podría tener un impacto significativo en la estimación del número de casos. Estas características también pueden influir en el modelo de dosis-respuesta, que usualmente solo son representativos de las cepas de *Salmonella* que han causado enfermedades clínicas en humanos. Como resultado de esto, es bastante común que los ECRM sobrestimen el número de casos (Snary et al., 2016).

## XII CONCLUSIONES

- La capacidad de sobrevivencia de *Salmonella* en la pulpa de papaya es un factor que está condicionado por la temperatura de almacenamiento. Cuando la papaya es almacenada a una temperatura de 4 °C *Salmonella* no presenta cambios significativos en su crecimiento; sin embargo, a 25 °C la bacteria incrementa su concentración logrando aumentar hasta 2.5 log posterior a las 24 h de almacenamiento.
- En el modelo gastrointestinal se observó que *Salmonella* aumenta su capacidad de resistencia a la etapa gástrica cuando esta fue expuesta previamente a 4 °C; sin embargo, seguía siendo un ambiente adverso para la bacteria en todas las temperaturas y días de almacenamiento. Por otra parte, en la etapa intestinal *Salmonella* se ve favorecida a las condiciones por lo que tiende a aumentar su concentración hasta 1 log UFC/g. Así también se observa que *Salmonella* aumentó su capacidad de invasión cuando estuvo previamente expuesta a 4 °C en la pulpa de la papaya y a 25 °C se observa una mayor invasividad en el día 2 de almacenamiento.
- Estos resultados muestran que *Salmonella* es capaz de aumentar su capacidad infectiva cuando es expuesta a factores estresantes como la temperatura, por lo que es de gran importancia seguir realizando estudios mediante modelos adecuados para desarrollar estrategias efectivas para disminuir el riesgo de infecciones por *Salmonella* por el consumo de papaya.



### XIII BIBLIOGRAFÍA

- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E., & Adenubi, O. T. (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note [Article]. *Folia Microbiologica*, 56(6), 497-503. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0075-4>
- Akbar, A., & Anal, A. K. (2015). Isolation of *Salmonella* from ready-to-eat poultry meat and evaluation of its survival at low temperature, microwaving and simulated gastric fluids [Article]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(5), 3051-3057. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1354-2>
- Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I., & Al-mohizea, A. M. (2012). Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications [Review]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(3), 326-336. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x>
- Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & Lopez, M. (2012). The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45(2), 482-492. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>
- Anuar, N. S., Zahari, S. S., Taib, I. A., & Rahman, M. T. (2008). Effect of green and ripe *Carica papaya* epicarp extracts on wound healing and during pregnancy [Article]. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2384-2389. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.025>
- Audia, J. P., Webb, C. C., & Foster, J. W. (2001). Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria [Review].

*International Journal of Medical Microbiology*, 291(2), 97-106.

<https://doi.org/10.1078/1438-4221-00106>

Bernal-Bayard, J., & Ramos-Morales, F. (2018). Molecular Mechanisms Used by *Salmonella* to Evade the Immune System [Review]. *Current Issues in Molecular Biology*, 25, 133-167. <https://doi.org/10.21775/cimb.025.133>

Bhan, M. K., Bahl, R., & Bhatnagar, S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever [Review]. *Lancet*, 366(9487), 749-762. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67181-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67181-4)

Braun, S., Spalloni, W., Ferreccio, F., Postigo, J., Fernandez, A., Porte, L., . . . Triantafilo, V. (2015). *Salmonella* spp. gastroenteritis associated to pet turtles in three infants [Article]. *Revista Chilena De Infectologia*, 32(3), 334-338. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182015000400013>

Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V. A. P., Sant'Ana, A. S., & Schaffner, D. W. (2018). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food Control*, 92, 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.019>

Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & Garcia-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review [Review]. *Food Research International*, 45(2), 545-556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>

Chen, H. M., Wang, Y., Su, L. H., & Chiu, C. H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy [Review].

*Pediatrics and Neonatology*, 54(3), 147-152.

<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>

Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review [Review]. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112-118.

<https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>

Coburn, B., Li, Y. L., Owen, D., Vallance, B. A., & Finlay, B. B. (2005). *Salmonella* enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infection and Immunity*,

73(6), 3219-3227. <https://doi.org/10.1128/iai.73.6.3219-3227.2005>

Collazo, C. M., & Galan, J. E. (1997). The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* - A review [Article; Proceedings Paper]. *Gene*, 192(1), 51-

59. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00825-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00825-6)

Collineau, L., Chapman, B., Bao, X., Sivapathasundaram, B., Carson, C. A., Fazil, A., . . . Smith, B. (2020). A farm-to-fork quantitative risk assessment model for *Salmonella* Heidelberg resistant to third-generation cephalosporins in broiler chickens in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 330, Article

108559. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108559>

Coombes, B. K., Coburn, B. A., Potter, A. A., Gomis, S., Mirakhur, K., Li, Y. L., & Finlay, B. B. (2005). Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine heal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infection and Immunity*, 73(11), 7161-

7169. <https://doi.org/10.1128/iai.73.11.7161-7169.2005>

- Crump, J. A., Sjolund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections [Review]. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901-937. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-15>
- de Melo, A. N. F., de Souza, G. T., Schaffner, D., de Oliveira, T. C. M., Maciel, J. F., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2017). Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses [Article]. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.022>
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., . . . Ricke, S. C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract [Review]. *Anaerobe*, 15(1-2), 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.007>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance [Review]. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Eun, Y., Jeong, H., Kim, S., Park, W., Ahn, B., Kim, D., . . . Son, H. (2019). A large outbreak of *Salmonella* enterica serovar Thompson infections associated with chocolate cake in Busan, Korea [Article]. *Epidemiology and Health*, 41, 8, Article e2019002. <https://doi.org/10.4178/epih.e2019002>

- Evans, E. A., & Ballen, F. H. (2012). An overview of global papaya production, trade, and consumption. *EDIS*, 2012(9).
- Evers, E. G., & Chardon, J. E. (2010). A swift Quantitative Microbiological Risk Assessment (sQMRA) tool. *Food Control*, 21(3), 319-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.013>
- Feng, K., Hu, W. Z., Jiang, A. L., Saren, G. W., Xu, Y. P., Ji, Y. R., & Shao, W. J. (2017). Growth of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on Fresh-Cut Fruits Stored at Different Temperatures [Article]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(9), 510-517. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2255>
- Finlay, B. B., & Brumell, J. H. (2000). *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 355(1397), 623-631. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0603>
- Gagnon, M., Berner, A. Z., Chervet, N., Chassard, C., & Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- Godinez, I., Keestra, A. M., Spees, A., & Baumler, A. J. (2011). The IL-23 axis in *Salmonella* gastroenteritis [Review]. *Cellular Microbiology*, 13(11), 1639-1647. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01637.x>

- Godinez-Oviedo, A., Cuellar-Nunez, M., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., & Hernandez-Iturriaga, M. (2021). A dynamic and integrated in vitro/ex vivo gastrointestinal model for the evaluation of the probability and severity of infection in humans by *Salmonella* spp. vehiculated in different matrices [Article]. *Food Microbiology*, 95, 11, Article 103671. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103671>
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. In B. Greenwood-Van Meerveld (Ed.), *Gastrointestinal Pharmacology* (pp. 1-16). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_118](https://doi.org/10.1007/164_2016_118)
- Gumudavelli, V., Subbiah, J., Thippareddi, H., Velugoti, P. R., & Froning, G. (2007). Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* enteritidis in egg yolk [Article]. *Journal of Food Science*, 72(7), M254-M262. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00444.x>
- Hassan, R., Whitney, B., Williams, D. L., Holloman, K., Grady, D., Thomas, D., . . . Outbreak Invest, T. (2019). Multistate outbreaks of *Salmonella* infections linked to imported Maradol papayas - United States, December 2016-September 2017 [Article]. *Epidemiology and Infection*, 147, 8, Article e265. <https://doi.org/10.1017/s0950268819001547>
- Heaton, J. C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 613-626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>

- Huang, J. W., Luo, Y. G., Zhou, B., Zheng, J., & Nou, X. W. (2019). Growth and survival of *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce and their juice extracts: Impacts and interactions of food matrices and temperature abuse conditions [Article]. *Food Control*, 100, 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.035>
- Jahan, N., Noor, R., & Munshi, S. K. (2018). Microbiological analysis and determination of antimicrobial traits of green banana (*Musa* spp.) and papaya (*Carica papaya*). *Stamford Journal of Microbiology*, 8(1), 41-45.
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504-521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jeong, J., Chon, J. W., Kim, H., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2018). Risk Assessment for Salmonellosis in Chicken in South Korea: The Effect of *Salmonella* Concentration in Chicken at Retail. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(5), 1043-1054. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e37>
- Karabiyikli, S., Degirmenci, H., & Karapinar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* [Article]. *Lwt-Food Science and Technology*, 55(2), 421-425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.037>
- Keerthirathne, T. P., Ross, K., Fallowfield, H., & Whiley, H. (2016). A Review of Temperature, pH, and Other Factors that Influence the Survival of *Salmonella* in

- Mayonnaise and Other Raw Egg Products. *Pathogens*, 5(4), Article 63.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens5040063>
- Konig, J., Wells, J., Cani, P. D., Garcia-Rodenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., . . . Brummer, R. J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease [Review]. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7, 13, Article e196. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>
- Krishna, K., Paridhavi, M., & Patel, J. A. (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.).
- Kundu, A., Wuertz, S., & Smith, W. A. (2018). Quantitative microbial risk assessment to estimate the risk of diarrheal diseases from fresh produce consumption in India. *Food Microbiology*, 75, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.017>
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vazquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, 206, 60-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- Lambertini, E., Danyluk, M. D., Schaffner, D. W., Winter, C. K., & Harris, L. J. (2012). Risk of salmonellosis from consumption of almonds in the North American market. *Food Research International*, 45(2), 1166-1174.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.039>
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium [Article]. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695-701. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x>



- Lianou, A., Nychas, G. J. E., & Koutsoumanis, K. P. (2017). Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. *Food Microbiology*, 62, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.011>
- Ma, C., Li, J., & Zhang, Q. (2016). Behavior of *Salmonella* spp. on fresh-cut tropical fruits. *Food Microbiology*, 54, 133-141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.006>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., . . . Int Collaboration Enteric Dis, B. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Marcobal, A., Southwick, A. M., Earle, K. A., & Sonnenburg, J. L. (2013). A refined palate: Bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology*, 23(9), 1038-+. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt040>
- Masschalck, B., & Michiels, C. W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 29(3), 191-214. <https://doi.org/10.1080/713610448>
- Mba-Jonas, A., Culpepper, W., Hill, T., Cantu, V., Loera, J., Borders, J., . . . Neil, K. P. (2018). A Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Agona Infections Associated With Consumption of Fresh, Whole Papayas Imported From Mexico-United States, 2011. *Clinical Infectious Diseases*, 66(11), 1756-1761. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1094>

- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607-625. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990502>
- Monack, D. M., Mueller, A., & Falkow, S. (2004). Persistent bacterial infections: The interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9), 747-765. <https://doi.org/10.1038/nrmicro955>
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001). *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Oliveira, M., Wijnands, L., Abadias, M., Aarts, H., & Franz, E. (2011). Pathogenic potential of *Salmonella* Typhimurium DT104 following sequential passage through soil, packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract [Article]. *International Journal of Food Microbiology*, 148(3), 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.013>
- Oscar, T. P. (2011). Development and Validation of a Predictive Microbiology Model for Survival and Growth of *Salmonella* on Chicken Stored at 4 to 12 degrees C. *Journal of Food Protection*, 74(2), 279-284. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-10-314>
- Park, J. H., Kang, M. S., Park, K. M., Lee, H. Y., Ok, G. S., Koo, M. S., . . . Kim, H. J. (2020). A dynamic predictive model for the growth of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in fresh egg yolk and scenario-based risk estimation.

*Food Control*, 118, Article 107421.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107421>

Parry, C. M., Thomas, S., Aspinall, E. J., Cooke, R. P. D., Rogerson, S. J., Harries, A. D., & Beeching, N. J. (2013). A retrospective study of secondary bacteraemia in hospitalised adults with community acquired non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Bmc Infectious Diseases*, 13, Article 107.

<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-107>

Pearce, S. C., Coia, H. G., Karl, J. P., Pantoja-Feliciano, I. G., Zachos, N. C., & Racicot, K. (2018). Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors. *Frontiers in Physiology*, 9, Article 1584.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01584>

Penteado, A. L., & Leitao, M. F. F. (2004). Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures [Article].

*Food Control*, 15(5), 369-373. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(03\)00099-9](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(03)00099-9)

Pradhan, D., & Negi, V. D. (2019). Stress-induced adaptations in *Salmonella*: A ground for shaping its pathogenesis. *Microbiological Research*, 229, Article 126311.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126311>

Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tukel, C., Akcelik, M., & Baumler, A. J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, 74(1), 19-27.

<https://doi.org/10.1128/iai.74.1.19-27.2006>

- Rajan, K., Shi, Z. H., & Ricke, S. C. (2017). Current aspects of *Salmonella* contamination in the US poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding emerging hazards. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 370-392. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1223600>
- Ramos, G., Nascimento, J. S., Margalho, L. P., Duarte, M., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., . . . Sant'Ana, A. S. (2021). Quantitative microbiological risk assessment in dairy products: Concepts and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.017>
- Ramos-Morales, F. (2012). Acidic pH Enemy or ally for enteric bacteria? *Virulence*, 3(2), 103-106. <https://doi.org/10.4161/viru.19382>
- Reddy, S. P., Wang, H., Adams, J. K., & Feng, P. C. H. (2016). Prevalence and Characteristics of *Salmonella* Serotypes Isolated from Fresh Produce Marketed in the United States. *Journal of Food Protection*, 79(1), 6-16. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-274>
- Ricke, S. C., Dawoud, T. M., Kim, S. A., Park, S. H., & Kwon, Y. M. (2018). *Salmonella* Cold Stress Response: Mechanisms and Occurrence in Foods. In G. M. Gadd & S. Sariaslani (Eds.), *Advances in Applied Microbiology, Vol 104* (Vol. 104, pp. 1-38). Elsevier Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.03.001>
- Roeselers, G., Ponomarenko, M., Lukovac, S., & Wortelboer, H. M. (2013). Ex vivo systems to study host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract

- [Article]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 101-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.018>
- Saeed, F., Arshad, M. U., Pasha, I., Naz, R., Batool, R., Khan, A. A., . . . Shafique, B. (2014). NUTRITIONAL AND PHYTO-THERAPEUTIC POTENTIAL OF PAPAYA (CARICA PAPAYA LINN.): AN OVERVIEW [Article]. *International Journal of Food Properties*, 17(7), 1637-1653.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2012.709210>
- Sanchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gomez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9(6), 263-277.  
<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>
- Sandoval, K. V., Avila, D. D., & Gracia, T. J. H. (2017). Study of the Mexican papaya market: an analysis of its competitiveness (2001-2015). *Suma De Negocios*, 8(18), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.sumneg.2017.10.002>
- Sant'Ana, A. S., Franco, B., & Schaffner, D. W. (2012). Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce [Article]. *Food Microbiology*, 30(1), 267-273.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.003>
- Santos, R. L., & Baumler, A. J. (2004). Cell tropism of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(4), 225-233.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.029>

- Shah, J., Desai, P. T., Chen, D., Stevens, J. R., & Weimer, B. C. (2013). Preadaptation to Cold Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Increases Survival during Subsequent Acid Stress Exposure [Article]. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7281-7289. <https://doi.org/10.1128/aem.02621-13>
- Shah, J. N., Desai, P. T., & Weimer, B. C. (2014). Genetic Mechanisms Underlying the Pathogenicity of Cold-Stressed *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Cultured Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6943-6953. <https://doi.org/10.1128/aem.01994-14>
- Sharma, A., Bachheti, A., Sharma, P., Bachheti, R. K., & Husen, A. (2020). Phytochemistry, pharmacological activities, nanoparticle fabrication, commercial products and waste utilization of *Carica papaya* L.: A comprehensive review. *Current Research in Biotechnology*, 2, 145-160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.11.001>
- Silva, S. Q., dos Santos, M. T., Paes, S. A., & Vanetti, M. C. D. (2016). Acid and low temperature treatments on *Salmonella* Enteritidis inoculated in pork and its subsequent survival in simulated gastric fluid [Article]. *Ciencia Rural*, 46(3), 530-535. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141582>
- Singh, A., Rahman, M. A., Sharma, R., & Yemmireddy, V. (2021). Papaya ripeness and post-harvest storage conditions affect growth, survival and death kinetics of *Salmonella* and spoilage organisms [Article]. *Postharvest Biology and Technology*, 181, 11, Article 111659. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111659>

- Singh, A., & Yemmireddy, V. (2021). Fate of *Salmonella* spp. in fresh-cut papaya (*Carica papaya* L.) at different storage temperature and relative humidity [Article]. *Lwt-Food Science and Technology*, 148, 7, Article 111810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111810>
- Snary, E. L., Swart, A. N., Simons, R. R. L., Domingues, A. R. C., Vigre, H., Evers, E. G., . . . Hill, A. A. (2016). A Quantitative Microbiological Risk Assessment for *Salmonella* in Pigs for the European Union. *Risk Analysis*, 36(3), 437-449. <https://doi.org/10.1111/risa.12586>
- Strawn, L. K., & Danyluk, M. D. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas [Article]. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.002>
- Teunis, P. F. M., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, L. D., Rotariu, O., & Strachan, N. J. C. (2010). Dose-response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.026>
- Thompson, C. N., Phan, V. T. M., Le, T. P. T., Pham, T. N. T., Hoang, L. P., Ha, V., . . . Baker, S. (2013). Epidemiological features and risk factors of *Salmonella* gastroenteritis in children resident in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Epidemiology and Infection*, 141(8), 1604-1613. <https://doi.org/10.1017/s0950268812002014>

- Valdez, Y., Ferreira, R. B. R., & Finlay, B. B. (2009). Molecular Mechanisms of *Salmonella* Virulence and Host Resistance. *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection Via the Gut*, 337, 93-127. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01846-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01846-6_4)
- Valero, A., Hernandez, M., De Cesare, A., Manfreda, G., Garcia-Gimeno, R. M., Gonzalez-Garcia, P., & Rodriguez-Lazaro, D. (2014). Probabilistic approach for determining *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* concentration in pork meat from presence/absence microbiological data. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 60-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.025>
- Verma, P., Saharan, V. V., Nimesh, S., & Singh, A. P. (2018). Phenotypic and virulence traits of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from vegetables and fruits from India [Article]. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 270-281. <https://doi.org/10.1111/jam.13754>
- Waldner, L. L., MacKenzie, K. D., Köster, W., & White, A. P. (2012). From Exit to Entry: Long-term Survival and Transmission of *Salmonella*. *Pathogens*, 1(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens1020128>
- Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36(5), 997-1005. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01892.x>
- Wang, W., Zhou, Y., Xiao, X. N., Yang, G. L., Wang, Q., Wei, W., . . . Yang, H. (2018). Behavior of *Salmonella* Typhimurium on Fresh Strawberries Under Different Storage Temperatures and Wash Treatments [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 9, 10, Article 2091. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02091>



- Wehkamp, J., Schaubert, J., & Stange, E. F. (2007). Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(1), 32-38. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32801182c2>
- Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., . . . Ammon, A. (2005). International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *Bmc Infectious Diseases*, 5, Article 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-7>
- Yin, Y. B., & Zhou, D. G. (2018). Organoid and Enteroid Modeling of *Salmonella* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, Article 102. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00102>
- Zhu, J. H., Bai, Y., Wang, Y. R., Song, X. Y., Cui, S. H., Xu, H. B., . . . Li, F. Q. (2017). A risk assessment of salmonellosis linked to chicken meals prepared in households of China. *Food Control*, 79, 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.003>

## XIV ANEXOS

### 14.1 Documentos complementarios

(Como Cartas de Consentimiento Informado; Formatos de Encuestas; Resultados de experimentos específicos que complementan los resultados mostrados, como cromatogramas, secuencias de genes, y/o ensambles de genomas, etc.)

### 14.2 Productos Académicos

**XXIV Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos**  
XXXIX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos.  
Edición Online 3, 4 y 5 de noviembre 2022

La Universidad de Guadalajara a través del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías Otorga la presente

**CONSTANCIA**

A: Salazar Vázquez, D.E., Jiménez Edeza, M., Romero Quintana, J.G y Castañeda Ruelas G.M.

Por su participación como:  
**Autores del trabajo libre presentado en modalidad cartel**  
"Efecto de la temperatura de almacenamiento de papaya (*Carica papaya*) sobre la sobrevivencia de *Salmonella* spp."

Dr. Marco Antonio Pérez Cisneros  
Rector del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

Dr. Humberto Gutiérrez Pulido  
Secretario Académico del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

## XV SIGLAS Y ABREVIACIONES

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Pinf: probabilidad de infección por *Salmonella* spp.

D.E: Desviación Estándar

S.S: Solución Salival

S.G: Solución gástrica

S.I: Solución Intestinal

ADH.: Adhesión

INV.: Invasión

T3SS: Sistema de Secreción Tipo III