



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO
DEL PLASMA FRÍO ATMOSFÉRICO SOBRE ESPECIES
PATOGENICAS DE INTERÉS ALIMENTARIO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO: JESÚS ANDRÉS SAAVEDRA GUERRA
PROFESORES GUÍA: ANIBAL CONCHA MEYER

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1 Hipótesis	7
3. Revisión Bibliográfica	8
3.1 Inocuidad alimentaria	8
3.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	10
3.3 <i>Escherichia coli</i>	12
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.5 <i>Bacillus cereus</i>	18
3.6 Género <i>Salmonella</i>	22
3.7 Género <i>Shigella</i>	24
3.8 Género <i>Listeria</i>	27
Plasma frío atmosférico	31
4. Objetivos	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. Materiales y métodos	34
6. Resultados	47
7. Discusión	52
8. Conclusión	58
9. Bibliografía	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1	35
Figura N° 2	35
Figura N° 3	36
Figura N° 4	37
Figura N° 5	38
Figura N° 6	38
Figura N° 7	39
Figura N° 8	40
Figura N° 9	41
Figura N° 10	42
Figura N° 11	44
Figura N° 12	46
Gráfico N° 1	49
Grafico N° 2	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1	47
Tabla N° 2	48

1. RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, son un importante problema de salud mundial, las cuales son producidas por el consumo de alimentos contaminados con bacterias o toxinas del microorganismo preformadas en el alimento, en donde millones de personas sufren en todo el mundo cada año. Dentro de los patógenos transmitidos por alimentos, encontramos diferentes bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria spp*, *Shigella spp*, entre otras, Además de diferentes parásitos, hongos y virus. La contaminación del alimento puede producirse en cualquier etapa de procesamiento del alimento, por lo que la industria alimentaria utiliza diferentes técnicas de descontaminación, una nueva tecnología en el proceso de descontaminación es la aplicación del plasma frío atmosférico (PFA), el cual usa un gas como el aire, nitrógeno o mezclas de gases nobles, en donde al aplicarle una fuente de energía como la electricidad va a ionizar el gas por lo que pasara al estado de plasma, en donde tendrá un efecto antimicrobiano debido a la luz ultravioleta, presencia de especies reactivas, ozono entre otros elementos.

En este estudio se evaluó *in vitro* el efecto antimicrobiano del plasma frío atmosférico sobre diversas especies patogénicas de interés alimentario y a diferentes alturas de aplicación. Para ello se cuantificó el efecto antimicrobiano del Plasma frío atmosférico sobre inóculos incubados por 12 horas de cada microorganismo, con un tiempo de exposición al plasma frío atmosférico de 30 segundos, a una distancia de 5, 7 y 9 centímetros, en donde se obtuvo inhibición de los microorganismos independiente de la distancia de aplicación, pero existiendo un mayor porcentaje de inhibición a la distancia de 5 cm comparada con la distancia de 7 cm. Se necesitan más estudios en donde se determinen las diferentes condiciones de aplicación del PFA para obtener el máximo efecto de este tratamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos o denominadas como ETA por su abreviación, corresponden a un grupo importante en los problemas de salud tanto a nivel nacional como internacional, ya que pueden afectar a un solo individuo o a un grupo de personas al consumir agua o alimentos contaminados por bacterias, virus, hongos, parásitos o por sustancias tóxicas que estos microorganismos puedan producir.

Las ETA pueden ocurrir debido a que en el alimento se encontrarán dosis infectantes de microorganismos perjudiciales para la salud o también puede suceder como una intoxicación alimentaria cuando en el alimento ingerido no se encuentra propiamente el microorganismo, sino más bien toxinas o venenos que han sido producidas por éste.

La sintomatología presentada por los afectados de ETA son de duración e intensidad variable, presentando desde cuadros gastrointestinales hasta problemas neurológicos, pero esto dependerá de variados factores, en los que encontramos el tipo y concentración del microorganismo, la cantidad de toxina presente en el alimento, el estado de salud de la persona, la porción de alimento consumida, la edad, entre otros factores.

A lo largo de la cadena productiva los alimentos pueden contaminarse con los diferentes microorganismos, ya sea en el proceso de producción, cosecha, faenamiento, post-cosecha, envasado, transporte y almacenamiento, en los cuales se involucran diversos factores tales

como trabajadores, manipuladores de alimentos, entre otros. Además del lugar físico en donde se disponen los alimentos en los diferentes establecimientos son una posible fuente de elementos contaminantes para estos.

Sin embargo, la industria alimentaria ha añadido procesos de detección, descontaminación del alimento y de los espacios físicos, además de normas de calidad nacional e internacional para intentar garantizar que el producto final sea completamente seguro, lo que permite una mayor exportación de las materias primas nacionales favoreciendo el comercio internacional.

En la industria alimentaria, las técnicas de descontaminación y limpieza de alimentos frescos se basan en la aplicación de calor, pasteurización, refrigeración, congelación, enjuague con agua, uso de pH ácidos y lavados con hipoclorito de sodio, pero actualmente han surgido nuevas técnicas de descontaminación, en donde se busca que el alimento tenga el menor riesgo biológico y seguro para cada consumidor, pero sin afectar las propiedades organolépticas de los productos tratados y con una utilización eficiente de los recursos, en donde encontramos el plasma frío atmosférico (PFA).

El plasma frío atmosférico es una tecnología que no requiere agentes químicos antimicrobianos, en cambio utiliza electricidad y un gas portador como el aire, oxígeno, nitrógeno o helio, en donde la producción de radicales libres y la exposición a rayos UV, actúan para romper las membranas celulares de las bacterias, desnaturalizar las proteínas y causar daño al ADN bacteriano.

2.1 Hipótesis

El tratamiento con plasma frío atmosférico, reduce la concentración *in vitro* de unidades formadoras de colonias de diversos patógenos, independiente de la distancia de aplicación.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria hace referencia a la garantía de que los alimentos no causarán un daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinen(1), considerándose de esta forma un alimento seguro, pero para poder cumplir con tal característica, ya sea el alimento y/o el agua que se ingieren diariamente no deben tener microorganismos peligrosos como lo serían las bacterias, virus, parásitos y hongos, además de no contener químicos como alérgenos, residuos de medicamentos veterinarios, agroquímicos y toxinas o simplemente contener agentes físicos externos como tierra, pelo, insectos, entre otros, los cuales se consideran como un riesgo para la salud(2).

La pérdida de la inocuidad afectará la salud de quienes consuman los alimentos, siendo los grupos más vulnerables los menores de 5 años, embarazadas, inmunocomprometidos y adultos mayores, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial(3). En la actualidad se está convirtiendo en un tema prioritario de la salud pública en donde la normativa sobre la calidad alimentaria nacional se ha ido perfeccionando hasta armonizarse con los estándares internacionales, manteniendo una vigilancia sanitaria y epidemiológica(4).

Chile es un gran exportador de alimentos por lo que es necesario que la política nacional asegure los estándares internacionales, siendo sus atributos básicos intransables en las exigencias comerciales para ser una opción en el mercado, esos atributos son la inocuidad, la

autenticidad, la integridad y la composición. Siendo la capacidad de ofrecer garantías de cumplimiento de estándares elevados de inocuidad y calidad un rol determinante frente a otros exportadores(5).

La actual normativa se basa en dos principios para prevenir efectos peligrosos sobre la salud de los individuos, los cuales son el principio precautorio en donde se respalda la adopción de medidas protectoras por parte de la autoridad ante sospechas fundadas de que ciertos productos o tecnologías alimentarias representan un riesgo grave para salud pública o el medio ambiente, pero sin que se cuente con una prueba científica definitiva de tal riesgo, tomando medidas de protección determinadas sobre una base científica, sin embargo si hay motivos razonables para temer efectos peligrosos y los datos disponibles no permiten una evaluación de riesgo concluyente, es aceptado internacionalmente como estrategia de gestión de los riesgos(5).

El otro principio de la política nacional de inocuidad y calidad de los alimentos es el principio preventivo, el cual busca hacerse cargo de la problemática del control del producto final, buscando solucionar problemas ya presentes, detectados a través de vigilancia y control de los procesos, en donde se detecta la presencia de contaminación previo, cuyo origen, diseminación, exposición y proyección es difícil de conocer, lo que complica las acciones de mitigación y resolución(5).

3.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos son infecciones o intoxicaciones al consumir agua o alimento contaminado con agentes biológicos, químicos y/o físicos que puedan ocasionar un daño en la salud de las personas. Sus características clínicas se pueden clasificar según signos y síntomas iniciales y predominantes, los cuales pueden afectar el tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, signos o síntomas alérgicos y/o de infección generalizada dependiendo del cuadro específico que se trate. Se debe sospechar cuando más de una persona presente una sintomatología similar después de haber estado expuesto a la ingestión del alimento o agua de una fuente común(6).

Dentro de los virus, los más comunes que ocasionan este tipo de infecciones son el *Norovirus* y el virus de la hepatitis A. los parásitos que más se asocian con esta patología son los que se encuentran presentes en el alimento, ya sea carne o pescados, otros se introducen en la cadena alimentaria a través del agua y/o suelo, contaminando el alimento. Dentro de las bacterias encontramos géneros como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Vibrio*, entre otros(7).

Existen factores que influyen en que este tipo de brotes se considere un problema emergente, ya sea factores económicos, sociales y culturales, como el envejecimiento de la población, migraciones, cambios ambientales que afectan la producción primaria, emergencia y reemergencia de microorganismos, el uso de antibióticos no controlado, la globalización, cambios en las conductas y hábitos de alimentación, mayor oferta de materias primas y productos terminados, la creciente demanda por alimentos cada vez más variados y exóticos(8).

Un brote de ETA está definido como un evento en el que dos o más personas enferman, presentando sintomatología similar, luego de haber consumido un mismo tipo de alimento o agua y donde la evidencia epidemiológica sugiera que esos fueron la causa de la enfermedad. Y un brote de ETA de importancia de salud pública es aquel brote que cumpla con al menos uno de los siguientes criterios, que sea de una magnitud mayor o igual a 10 casos, que existan casos hospitalizados o fallecidos, que exista una sospecha de un agente presente en el agua de consumo, identificada como vehículo de transmisión, que sea un brote institucional, lo cual hace referencia que son ocurridos en establecimientos educacionales, lugares de trabajo, recintos penitenciarios, establecimientos de larga estadía para adultos mayores, entre otros, y por último que el brote sea de importancia mediática o priorizado por autoridades(8).

Según el Decreto Supremo N°158 del año 2004, establece que los brotes de ETA son de notificación universal, obligatoria e inmediata. Por lo que los establecimientos de salud deben notificar por la vía más expedita ante la sospecha de la ocurrencia de cualquier brote a la SEREMI de Salud, quienes avisaran al MINSAL, el personal de salud que atiende los primeros casos es el responsable de iniciar la investigación epidemiológica entrevistando al caso índice(8).

Si a partir de la investigación epidemiológica se establece que la exposición de los casos y la pérdida de inocuidad del alimento han ocurrido en un ambiente domiciliario o privado, como medida de control se realizará educación sanitaria al grupo afectado, reforzando las medidas de prevención. En cambio si la pérdida de inocuidad del alimento tuvo origen en una instalación de elaboración o expendio de estos productos, aun cuando se haya consumido en un ambiente domiciliario se iniciara una investigación ambiental. Si se establece que la exposición ocurrió en una región diferente a la notificadora, la región de exposición iniciará la investigación ambiental y se informará del resultado a la región notificadora, en caso que se estime pertinente se procederá a la clausura del establecimiento(8).

3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli enterohemorrágica es un patógeno zoonótico humano, que se transmite a través del consumo de alimentos contaminados como carne de res, productos lácteos, verduras, frutas y en verduras listas para comer (9). El ganado bovino es el principal reservorio de *Escherichia coli* O157: H7, siendo estos portadores asintomáticos en su tracto gastrointestinal (10), además de encontrarse en otros animales domésticos como ovejas, cerdos, cabras, perros y gatos (11). También existe transmisión directa de persona a persona principalmente en jardines maternas o infantiles, hogares para ancianos e instituciones para enfermos mentales. Se han descrito casos de contaminación por *E.coli* debido a contaminación cruzada por manipuladores, equipamiento y utensilios (12).

Las dosis infectiva de este microorganismo es bajo, alrededor de 10 células bacterianas, siendo del orden de 1 a 100 unidades formadoras de colonias (13), se asocia con un amplio espectro de manifestaciones clínicas la cual puede variar desde una diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, generando ocasionalmente secuelas como colitis hemorrágica o síndrome hemolítico urémico (14),(15). En personas infectadas la duración media de excreción fecal es de 2 a 3 semanas, siendo clínicamente asintomáticos durante las últimas etapas(16).

Dentro de los factores de virulencia encontramos la producción de citotoxinas llamadas verotoxina, siendo el factor que define este patotipo, la cual puede ser Stx1 y Stx2, siendo enfermedades más severas las causadas por la Stx2 (17). Aunque otros serotipos de *E.coli* y *Shigella spp* pueden producir citotoxinas semejantes y desencadenar la misma patología. Existe una predominancia en niños menores de 5 años, ocasionando un síndrome hemolítico urémico (18). Otro factor de virulencia es un plásmido de gran tamaño que tiene el gen *ehxA*

que codifica una hemolisina, además de presentar una isla de patogenicidad que contiene genes para la codificación de intimina y para el receptor translocado de intimina junto con genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III (19),(20). La intimina tipo α se adhieren principalmente a nivel del intestino delgado y las cepas con intimina γ_1 y γ_2 se unen fundamentalmente en el colon (21).

Los miembros de la familia Stx son toxinas compuestas, una subunidad A catalítica, y una subunidad B multimérica que participa en la unión de la toxina a receptores glicolípidos específicos en la superficie de las células diana (22). Una vez que se unen a la membrana de la célula diana, las toxinas se internalizan mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor (23). En algunas células las vesículas unidas a las toxinas se fusionan con los lisosomas celulares, lo que resulta en la degradación de la toxina, sin embargo en las células que son sensibles a la citotoxina, las vesículas endosómicas que contienen los complejos de receptores de toxinas experimentan un transporte retrógrado a través del aparato de Golgi al retículo endoplásmico antes de ser translocadas al citosol (24).

Durante el proceso anteriormente mencionado, la subunidad A es cortada por una proteasa generando un fragmento A1 N terminal catalíticamente activo y un fragmento A2 C terminal que permanecen unidos por un enlace disulfuro, posteriormente este enlace se reduce liberando el componente A1 activo (23). El fragmento A1 liberado tiene actividad de ARN N- glicosidasa y escinde un enlace N-glicosido específico en el ARNr 28S (25), esta escisión presenta un enlace dependiente del factor de alargamiento del aminoacil-ARNt a la subunidad ribosomal 60S, lo que inhibe la etapa de elongación de la cadena peptídica para la síntesis de proteínas provocando finalmente la muerte celular (26).

La patogenia consiste en que la cepa es ingerida por vía oral, luego llegar a nivel intestinal para establecer la colonización del lugar mediante la adhesión a las células epiteliales intestinales.

Algunos individuos infectados con *E.coli* enterohemorrágica pueden ser completamente asintomáticos a pesar de las grandes cantidades de organismos y toxinas libres en las deposiciones (27). Los pacientes infectados inicialmente sufren una diarrea acuosa pero puede progresar en 1 o 2 días a diarrea con sangre y colitis hemorrágica (28). Además de reportar con frecuencia un dolor abdominal severo. En una proporción esta infección puede progresar a Síndrome hemolítico urémico, potencialmente mortal caracterizada por la triada clásica que consiste en anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda precedidas por diarrea sanguinolenta (14).

Algunas personas que desarrollan Síndrome hemolítico urémico experimentan síntomas neurológicos como letargo, dolor de cabeza intenso, convulsiones y encefalopatía (29). los sobrevivientes pueden sufrir discapacidades permanentes que incluyen insuficiencia renal crónica, hipertensión y déficit neurológico (30). La infección por este microorganismo también puede dar como resultado un púrpura trombocitopénica trombótica asociado a diarrea, siendo más común en adultos que en niños, difiere de un síndrome hemolítico urémico en que los pacientes suelen ser febriles y hay compromiso neurológico marcado (15).

3.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus es una cococia Gram positivo, observada en forma de racimo mediante microscopía, catalasa positiva, no esporulante, aerobio o anaerobio facultativo. Las cuales se pueden encontrar en el entorno, ya sea en el aire, agua, polvo, aguas residuales, superficies ambientales, en los seres humanos y en los animales (31).

Se han descrito más de 50 especies y subespecies las cuales se describen de acuerdo a su potencial para producir coagulasa, por lo que se clasifican entre especies de *Staphylococcus* coagulasa positivos y *Staphylococcus* coagulasa negativa (31).

Las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, juegan un papel en la fermentación de productos a base de carne y leche, por lo que se consideran de grado alimentario (31). En donde el grado alimentario se usa para describir herramientas, suministro y equipos que son de calidad suficiente para ser utilizados con fines de producción, almacenamiento o preparación del alimento (32). Dentro de los *Staphylococcus* coagulasa negativo existen especies que no presentan genes de expresión de enterotoxinas y otras en las cuales si se puede encontrar la presencia de estos genes pero no se han evidenciado cepas de esta clasificación en incidentes de intoxicación alimentaria (33),(34),(35).

Dentro de la clasificación de los *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal descrito, pero además se ha destacado el potencial enterotoxigénico de *Staphylococcus intermedius*.

El prerrequisito para que un alimento esté contaminado con *Staphylococcus aureus*, es que tenga la presencia del microorganismo y que haya tenido las condiciones ambientales para que este se multiplicará y libere las enterotoxinas (31).

Se requieren de cinco condiciones para inducir una toxi-infección por *Staphylococcus aureus*, en donde la primera condición es tener una fuente de *Staphylococcus aureus* productor de enterotoxinas, ya sea de la materia prima o del portador sano o infectado, lo segundo es la transferencia del microorganismo al alimento, lo tercero es que las características fisicoquímicas del alimento sean favorables para el crecimiento y la toxinogénesis, luego es necesario una temperatura favorable y tiempo suficiente para el crecimiento y la formación de la toxina y la última condición es el consumo del alimento con cantidades suficientes de toxinas para provocar síntomas (31).

Staphylococcus aureus produce diversas toxinas las cuales se pueden dividir de acuerdo a los efectos biológicos que producen en las células, en donde encontramos las citotoxinas (α , β , γ , δ y leucocidina de Panton-Valentine) las cuales tienen un mecanismo poro perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. También encontramos las toxinas exfoliativas A y B, las cuales son proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis. Además encontramos la Toxina del síndrome del shock tóxico TSST-1, la cual es un súper antígeno en donde estimulan la proliferación de células T y la liberación de citoquinas, produciendo extravasación o la destrucción de las células endoteliales.

Por último, las enterotoxinas liberadas por *Staphylococcus aureus*, se clasifican de acuerdo a su morfología con la denominación de una letra del alfabeto español que va desde la A hasta la E y de la G a la I, las cuales son súper antígenos que estimulan la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo (36).

Las enterotoxinas liberadas son proteínas globulares de cadena sencilla con un peso molecular de 22 a 29 KDa (37). Las enterotoxinas son resistentes a las condiciones ambientales como congelación, secado, tratamiento térmico, y pH ácido, las cuales son condiciones que si eliminan al microorganismo, además son resistentes a las enzimas proteolíticas conservando su actividad en el tracto digestivo (38).

Las células y los receptores específicos en el sistema digestivo, no se han relacionado claramente con la intoxicación oral por enterotoxinas estafilocócicas, pero se sugiere que estas toxinas estimulan el nervio vago en las vísceras abdominales, que transmite la señal al centro emético(39), siendo los receptores en las neuronas aferentes vagales esenciales para la emesis activada por la enterotoxina estafilocócica A (40).

Además las toxinas, pueden penetrar en el revestimiento intestinal y activar las respuestas inmunes locales y sistémicas (41). La diarrea asociada con la intoxicación por toxinas estafilocócicas podría atribuirse a la inhibición de la reabsorción de agua y electrolitos en el intestino delgado (42),(43).

La activación de un gran número de células T, seguidas de la proliferación y liberación masiva de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias puede conducir a un síndrome de shock tóxico.

El período de incubación y gravedad del cuadro clínico depende de la cantidad de toxinas consumidas, y de la susceptibilidad de la persona. La sintomatología inicial es de náuseas seguida de vómito, la cual puede aparecer dentro de los primeros 30 minutos a 8 horas, con un promedio de 3 horas, después de consumir el alimento contaminado. Otros síntomas son dolor abdominal, diarrea, mareos, temblores y debilidad general a veces asociados con fiebre moderada. En la mayoría de los casos la recuperación ocurre dentro de las 24 a 48 horas sin tratamiento específico (44).

La dosis de toxina para provocar sintomatología sería de 0,2 µg de enterotoxina por Kilogramo de peso, por lo que un adulto necesitaría consumir entre 10 y 20 µg (45). Otros autores consideran que una cantidad menor a 1 µg podría causar sintomatología de intoxicación en personas susceptibles (46). Otro autor estimó que la cantidad de enterotoxina estafilocócica A necesaria para causar diarrea y vómitos era de 0,144µg (47).

3.5 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, no fermenta el manitol, móvil, productor de lecitinasa (48), formador de esporas que son resistentes al calor, la deshidratación y otras tensiones físicas, que habita principalmente en el suelo, en donde puede completar su ciclo de vida saprófita (49), por lo que también existe la posibilidad de

contaminación, de aguas y alimentos incluidos el arroz, los productos lácteos, las especias, carnes, coles, pasta, aves y verduras (50).

La ingestión de alimentos contaminados puede llevar a dos tipos de infecciones gastrointestinales que dañan el epitelio del hospedero, generando cuadros leves y autolimitados. En donde el cuadro de tipo emético, es una intoxicación alimentaria causada por la ingestión de alimentos que contienen la toxina cereulida, la cual es un péptido de anillo pequeño, es una toxina estable al calor producida antes del consumo del alimento la cual produce vómitos (51), mientras que el tipo diarreico depende de la ingestión de células de *Bacillus cereus* seguidas por la producción de factores de virulencia en el intestino delgado (52),(53),(54).

En el síndrome de tipo diarreico las células de *Bacillus cereus* se originan a partir de células vegetativas ingeridas que sobreviven el paso por el estómago (55), y/o de esporas ingeridas que se adhieren a la mucosa intestinal y luego germinan en el intestino delgado. Evidencia reciente sugiere que la diarrea inducida por *Bacillus cereus* no es causada por la proliferación masiva de este microorganismo y la producción del factor de virulencia en la luz intestinal, sino por el crecimiento localizado y la producción del factor de virulencia en la capa de moco del hospedero o de la superficie epitelial (52).

Estos factores de virulencia dañan las células epiteliales cercanas por la formación de poros, lo que resulta en daño en microvellosidades y lisis osmótica de las células epiteliales del hospedero y eventualmente diarrea (56).

El mecanismo celular de la diarrea y la identidad de la enterotoxina implicada siguen siendo desconocidas. Se han propuesto tres enterotoxinas putativas, la hemolisina BL (HBL), enterotoxina no hemolítica (Nhe) y citotoxina K (CytK), todas citotóxicas para el epitelio in vitro. CytK es una toxina hemolítica formadora de poros con homología con las β -toxinas formadoras de poros de barril, incluyendo la α -hemolisina estafilocócica (57). CytK es una proteína de 34KDa con actividades dermonecróticas, citotóxicas y hemolíticas (58).

HBL y Nhe son toxinas tripartitas, en los cuales los tres componentes son necesarios para la actividad citotóxica máxima (59),(60). Hbl posee diversos efectos biológicos, que incluyen actividades de permeabilidad vascular, dermonecrótica, actividad citotóxica hacia células Vero y tejido retiniano (61), actividad hemolítica y posee capacidad enterotoxigénico (62). Nhe tiene actividad citolítica y hemolítica (56).

Típicamente este cuadro presenta dolor abdominal, diarrea acuosa y emesis. El tiempo de incubación sobre las 6 horas después de ingerir el alimento, normalmente entre las 8 a 16 horas, con un promedio de 12 horas, pero en casos raros se ha observado tiempos de incubación más largos. La duración del cuadro normalmente es de 12 a 24 horas (50). La dosis infecciosa se ha indicado $10^5 - 10^8$ células o esporas, sin embargo se han encontrado dosis más bajas en las cuales se ha causado la enfermedad (54).

Este tipo de cuadro clínico se asocia comúnmente con alimentos proteínicos, salsas y verduras, productos cárnicos, sopas, pudines y productos lácteos (50),(63).

En el síndrome emético es una intoxicación causada por la toxina cereulida, producida antes de la ingestión, en donde el curso de la enfermedad es característico con náuseas y emesis que ocurren unas pocas horas después de la comida, en donde el tiempo de incubación originalmente se describió de 1 a 5 horas (50), pero recientemente se acortó a un tiempo de 0,5 horas hasta las 6 horas (64).

El número de bacterias de *Bacillus cereus* requeridas para producir suficiente toxina emética para causar la enfermedad no se ha determinado, pero en los alimentos involucrados se han encontrado niveles de 10^3 a 10^{10} UFC por gramo de alimento (54). El cuadro clínico de tipo emético se ha relacionado con el consumo de arroz frito y cocido, pasta, pastelería y fideos (62). Se encuentran en alimentos ricos en almidón (64).

La cereulida, tiene un peso molecular de 1,2 KDa (64),(65), la cual es producida por una péptido sintasa no ribosomal (66), este es resistente a las condiciones ácidas, proteólisis y al calor (65). Dentro de los efectos encontramos que actúa como un catiónico ionoporo, pudiendo inhibir la actividad mitocondrial mediante la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos (67), además se ha demostrado que causa daño celular (68) e inhibe las células natural killer del sistema inmunológico (69).

3.6 Género *Salmonella* spp

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no esporulados. La mayoría no fermentan la lactosa, fermentan la glucosa, no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan la lisina y ornitina (70).

El género se divide en dos especies diferenciables por características metabólicas como la hidrólisis del ONPG, el crecimiento en presencia de KCN, entre otras. Estas especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, se dividen en más de 2500 serovariedades, definidas en función de asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (70).

Las especies de este género son sensibles al calor, pueden sobrevivir en superficies como cerámicas, vidrio, y acero inoxidable. Son destruidas fácilmente por los desinfectantes utilizados en la industria alimentaria.

El reservorio de *S. typhimurium* y *S. enteritidis* puede ser en animales domésticos y salvajes, entre los que encontramos aves de corral, ganado porcino y bovino, roedores, mascotas como iguanas, tortugas, perros, gatos, hámsteres y también el ser humano puede ser reservorio para estos microorganismos. Por lo que es una enfermedad zoonótica infecciosa, transmitida por una variedad de alimentos, asociada a carnes y subproductos de aves de corral, incluso los huevos.

Este patógeno es eliminado a través de la materia fecal en forma intermitente, ya que esta se ubica y multiplica en el intestino contaminando el ambiente que rodea al animal infectado, provocando de esta manera una transmisión horizontal a otros animales. Lo que implica que se transmite por la ruta fecal-oral. En el caso de *Salmonella enteritidis* la colonización no es solo a nivel intestinal, sino que esta puede invadir órganos internos, permaneciendo por un mayor tiempo.

La dosis infectiva es de 10^5 a 10^8 UFC/g³ pero puede ser de 1 UFC/g dependiendo del estado de salud del huésped, la edad y las características de la cepa (71). Las especies de *Salmonella spp* sobreviven durante mucho tiempo en los alimentos los cuales son muy variados desde carne, huevos, frutas, vegetales hasta productos secos como especias y nueces (70).

La salmonelosis generalmente es autolimitada en personas sanas, los síntomas comienzan entre 6 y 72 horas después de la exposición y duran de 4 a 7 días dependiendo de los factores del hospedero y de la cepa.

La salmonelosis rara vez es mortal, excepto en los grupos de riesgo como lo son los recién nacidos y lactantes, ancianos e inmunocomprometidos. Se presenta como un cuadro de enterocolitis aguda, con aparición repentina de cefalea, dolor abdominal, diarrea, náusea y vómitos en algunas ocasiones. Además de deshidratación que puede ser grave si no es controlada a tiempo, la mayoría de las ocasiones hay fiebre, la anorexia y la fiebre persisten por varios días y puede evolucionar a septicemia o infección focal. Sin embargo el estado de portador crónico en los seres humanos es poco común.

3.7 Género *Shigella* spp

Shigella es un patógeno entérico Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo que tiene la capacidad de ingresar y sobrevivir dentro de las células no fagocíticas (72). El humano es el único hospedero natural (73), pero se ha reportado la transmisión de persona a persona a través de contaminación fecal-oral, además se puede transmitir a través de alimentos, agua contaminada o fómites contaminados. Las infecciones están asociadas con el síndrome disentérico con la emisión de heces sanguinolentas, mucopurulentas, además de complicaciones como insuficiencia renal asociada con el síndrome hematóremico y la expresión de la toxina Shiga, así como la artritis reumatoide.

Shigella presenta genes que codifican enzimas como la lisina descarboxilasa, arginina aciltransferasa, no expresa adhesinas, no forma biopelículas, es inmóvil debido a la falta de expresión de flagelo, pero si expresa proteínas de superficie la cual les permite la motilidad intracelular, la que le permite la propagación a través de las células intestinales (74).

Shigella es un patógeno invasivo altamente eficiente, ya que 10 a 100 bacterias ingeridas son suficientes para causar la enfermedad (75),(72). El tratamiento antibiótico generalmente se recomienda en pacientes con síntomas moderados y graves, ya que puede reducir la duración, la gravedad de los síntomas, la excreción de organismos y prevenir las complicaciones (76).

El proceso de infección inicia con la ingestión oral, luego sobrevive al ambiente ácido del estómago y la microbiota intestinal competitiva para alcanzar la región terminal del íleon, colon y recto donde penetra la capa mucosa (77).

Shigella spp invade el epitelio asociado al folículo que recubre las placas de Peyer, el cual consiste en tejido linfoide organizado en la capa submucosa ubicándose en las células M (78). Aunque las células M son fagocíticas y muestrean el contenido luminal (79), *Shigella* desencadena reordenamientos citoesqueléticos en las células M, que probablemente promueven la translocación bacteriana a través de la barrera epitelial (80). Dentro de unas pocas horas de la infección, ocurre una respuesta inflamatoria aguda, con acumulación de polimorfonucleares en el sitio de infección, este aumento con la pérdida de la capa epitelial y los cambios morfológicos en la arquitectura de las vellosidades intestinales locales, que culminan en la ruptura de la barrera epitelial y una mayor entrada de bacterias en los tejidos subyacentes (81). Resiste la muerte de las especies reactivas del oxígeno provocadas por los polimorfonucleares mediante la expresión de superóxido dismutasa y catalasa (82).

Después de la invasión celular, lisa la vacuola fagocítica para replicarse intracelularmente. Durante la replicación se mueve mediante la polimerización de la actina en un polo bacteriano, formando colas de cometa de actina, lo que permite la formación de protuberancias que contienen bacterias en la membrana plasmática de la célula que invaden las células adyacentes. Después de la lisis de las membranas celulares de las células adyacentes, las bacterias reinician la replicación intracelular, la cual ocurre en un tiempo de duplicación estimado de 10 a 15 minutos, las células infectadas mueren unas pocas horas después de la infección (83).

Sin embargo *S. flexneri* es el principal causante de shigelosis endémica en zonas de bajos recursos causando cerca de dos tercios de las infecciones (84). *S. sonnei* es la segunda especie de *Shigella* más común en países de bajos ingresos y de ingresos medios, y es la especie líder en países de altos ingresos (85).

Ningún individuo es inmune a la shigelosis, pero los niños menores de 5 años tienen la más alta incidencia mundial (75) y después de los 40 años se ha informado que la incidencia aumenta constantemente junto con la carga bacteriana, por lo que se sugiere que los niños pequeños y las personas mayores arrojan la mayor carga bacteriana (86).

La presentación clínica abarca desde deposiciones acuosas y sueltas hasta síntomas graves como fiebre, dolor abdominal, tenesmo y diarrea con sangre. La gravedad de la enfermedad varía según la especie infectante, en donde *S. flexneri* puede causar disentería, mientras que *S. sonnei* generalmente suele ser diarrea acuosa autolimitada (76). Las complicaciones agudas como el megacolon tóxico, la peritonitis y la septicemia se observa principalmente en niños con desnutrición severa (75). La disentería también puede dar lugar a complicaciones como diarrea persistente, anorexia grave, pérdida de peso y malnutrición, dilatación del intestino grueso, convulsiones, daño rectal y síndrome hemolítico urémico (87).

Históricamente, *S. dysenteriae* tipo 1 fue considerada el único serotipo capaz de producir la toxina de shiga, a la cual se le ha atribuido el síndrome hemolítico urémico debido al efecto protrómbotico que provoca la toxina al unirse a las células endoteliales de la microvasculatura resultando una hemolisis microangiopática, anormalidades neurológicas y azotaemia. Pero aislamientos clínicos de especies de *Shigella no dysenteriae* han adquirido

genes *stx*, mediante transferencia horizontal de elementos genéticos móviles, los cuales codifican para la toxina de shiga (88).

La toxina de shiga es neurotóxica, citotóxica y enterotóxica, su efecto enterotóxico se produce al unirse a los receptores del intestino delgado y bloquea la absorción de electrolitos, glucosa y aminoácidos desde el lumen intestinal. El efecto citotóxico se produce al unirse la subunidad de la toxina de shiga se une con los glicolípidos de la célula huésped en el intestino delgado. La subunidad A1 se internalizará mediada por endocitosis causando una inactivación irreversible de la subunidad ribosomal 60S, inhibiendo la síntesis de proteínas causando muerte celular, daño de la microvasculatura del intestino y hemorragia. El efecto neurotóxico se caracteriza por fiebre y calambres abdominal (89).

3.8 Género *Listeria spp*

El género *Listeria* incluye 17 especies reconocidas, de las cuales solo dos se consideran patógenas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Son bacilos Gram positivo dispuestos en forma de empalizada (90).

Las especies de este género se pueden clasificar en dos grupos en base a la relación de las especies con *L. monocytogenes*, la cual en términos de salud pública e impacto académico es una de las especies más importantes. En donde el primer grupo es denominado *Listeria sensu strictu*, en donde se encuentran *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. innocua*, y el grupo *Listeria sensu lato* que incluye al resto de las especies del género (91),(90).

Listeria sensu strictu, comparten características fenotípicas como la capacidad para crecer a temperaturas bajas como 4°C, motilidad al menos a 30°C, reacción positiva para la catalasa, incapacidad para reducir el nitrato a nitrito y reacción positiva en la prueba de Voges-Proskauer, además de fermentar D-arabitol, α -metil D-glucósido, celobiosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, maltosa y lactosa, pero no fermentan inositol, L -arabinosa y D-manitol (90).

Solo las especies consideradas patógenas y algunas cepas de *L. innocua* muestran actividad de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*, así como algunas cepas de *L. innocua* muestran capacidades hemolíticas, *L. ivanovii* se diferencia de la otra especie patógena en su capacidad de fermentar la D-ribosa (90).

L. innocua se identifica típicamente por su incapacidad para causar hemólisis y fermentar D-xilosa combinada por su capacidad para fermentar glicerol, pero las cepas hemolíticas de *L. innocua* son difíciles de diferenciar de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* basados en pruebas bioquímicas estándar (90).

L. monocytogenes es la tercera causa principal de muertes transmitidas por alimentos debido a causas microbianas en los EE.UU (92). *L. monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo que causa una enfermedad rara y grave, en donde los síntomas típicos incluyen septicemia, abortos y encefalitis (90), pero también se ha reportado casos de enfermedades gastrointestinales sin infecciones sistémicas (93), en donde casi siempre es causada por el consumo de alimentos contaminados.

L. monocytogenes se encuentra en aguas de desechos, fluviales, suelo, en el ambiente, aves, pescados, crustáceos, moluscos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales y este último puede ser contaminado cuando se utiliza tierra o estiércol usado como fertilizante. Puede sobrevivir por largos periodos en los alimentos, ambientes refrigerados, plantas de procesamiento por lo que puede ser transmitido durante cualquier paso de la cadena de producción (94).

L. monocytogenes produce un cuadro clínico denominado listeriosis, en casos severos se puede observar septicemia, meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central llegando incluso a la muerte en inmunocomprometidos. Pero los síntomas pueden ir desde problemas gastrointestinales tales como náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, fiebre y dolores musculares (95).

L. monocytogenes secreta listeriolisina O la cual es esencial para la salida del fagosoma, además de una proteína inductora del conjunto de actina el cual le permite la propagación de célula a célula (96). Además produce una hemolisina denominada listeriolisina S, la cual funciona como una bacteriocina y juega un papel durante la fase gastrointestinal (97), además codifica un sistema fosfotransferasa de celobiosa la cual se ha relacionado con las cepas asociadas con la invasión del sistema nervioso central (98).

L. monocytogenes es un parásito intracelular facultativo capaz de sobrevivir en macrófagos e invadir células normalmente no fagocíticas, como hepatocitos, células epiteliales y células endoteliales, en donde se adhiere e invade, luego el escape temprano de las vacuolas fagocíticas primarias y secundarias, mediante la formación de poros. Luego de la multiplicación intracelular se genera la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria, formándose una estructura semejante a una cola de cometa que facilita el

movimiento intracelular y la invasión a células vecinas, diseminándose entre los tejidos protegidos del sistema inmune (99).

L.ivanovii se considera un patógeno, pero se ha relacionado con enfermedades en animales, predominantemente en ovinos (100), pero también se ha aislado de bovinos (101) y en humanos con síntomas compatibles con listeriosis. En donde la mayoría de los casos se aisló de la sangre del paciente, sin evidencia clara de la ruta de transmisión, sin embargo al menos un caso la septicemia fue precedida por una enfermedad gastrointestinal lo que sugiere que se pudo haber adquirido por vial oral (102).

L.innocua es una bacteria del suelo, mesófila que es considerada no patógena, es capaz de invadir células trofoblásticas de bovinos pero sin la capacidad de multiplicarse intracelularmente.

Las especies pertenecientes en el grupo *Listeria sensu lato* son catalasa positivo, no forman esporas, no están encapsuladas, son positivas a la reacción de Voges-Proskauer, pueden reducir el nitrato a nitrito, inmóviles a temperaturas de 4 a 37 °C (103),(104).

Plasma frío atmosférico

El plasma es descrito como el cuarto estado de la materia, debido a que en cada transición de fase, es decir, del paso de sólido a líquido o posteriormente de líquido a gas, las interacciones y las estructuras entre las moléculas se vuelven más flexibles y finalmente se descomponen por completo (105). Los gases son colecciones moléculas o de átomos individuales sin estructura a gran escala, por lo que en energías más altas las estructuras de estos gases se descomponen liberando electrones e iones libres. El plasma consiste en moléculas neutras, electrones e iones positivos o negativos (106).

Para lograr ionizar los gases, para pasar al estado de plasma, es necesario energía, la cual puede provenir de fuentes como calor, electricidad, luz, láser, radiación y una compresión rápida. El plasma retiene la energía por un periodo de tiempo y cuando las partículas se recombinan entre sí, se libera como luz visible y radiación ultravioleta (107). Esta tecnología se puede clasificar como plasma térmico en donde se trabaja a una temperatura superior a la temperatura ambiental, por lo que no se puede aplicar en la industria alimentaria ya que la temperatura afecta a las características del alimento y el plasma no térmico asociado a la industria alimentaria es aquel en que la acción antimicrobiana no es por destrucción térmica y el daño al alimento es poco o ninguno.

El plasma frío produce electrones, iones, radicales y fotones con un campo eléctrico, de los cuales se pueden aplicar una variedad de combinaciones de especies y radiación a organismos y alimentos, los efectos en el organismo incluyen la promoción de la germinación, el enraizamiento y el crecimiento en las plantas (108).

El plasma frío se genera en una temperatura ambiente y no produce daño al alimento. Los mecanismos por los cuales el plasma frío logra inhibir el crecimiento bacteriano es gracias a la interacción química de radicales, especies reactivas o partículas cargadas con la membrana de los microorganismos presentes, otra forma es mediante la radiación ultravioleta la cual genera daños en la membrana y los componentes celulares internos, además de ocasionar rupturas en las cadenas de ADN. Siendo la sumatoria de todos estos procesos lo que hace que le plasma sea eficaz contra ciertos microorganismos (109).

Existe una variedad de tecnologías que se utilizan para la aplicabilidad del plasma, ya sea a una presión atmosférica normal o con cierto grado de vacío parcial, utilizando diferentes gases para ionizar siendo estos como el aire, el nitrógeno, o una mezcla que contengan una proporción de gases nobles como el helio, argón o neón. La energía empleada puede ser proveniente de electricidad, microondas o láser (105). La formación de plasma frío solo ha sido posible en bajas presiones y en pequeña escala (107).

El plasma en la industria no alimentaria tiene variadas aplicaciones comerciales ya sea en la esterilización de dispositivos médicos delicados, resultando más rentable que la esterilización química (110).

A pesar de que esta tecnología aún no se ha aplicado industrialmente, si se han hechos estudios en diferentes matrices, como lo son lechugas, tomates, almendras, berries, productos cárnicos como pollo, carne seca, entre otros en donde se observó un efecto antimicrobiano sobre diversas especies patogénicas (111), (112), (113), (114).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el tratamiento in vitro del plasma frío atmosférico en especies patógenas capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto antibacteriano del PFA en diversas especies patógenas.
2. Determinar el efecto del tratamiento con PFA a diferentes alturas de aplicación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de especies de *Listeria spp*

La realización de la confirmación de la cepa utilizada, se hizo mediante la visualización de las características macroscópicas en placas de agar sangre de la colonia, dentro de las cuales se determinaron la morfología y coloración de la colonia, además de la presencia de hemolisis alrededor de la colonia, posterior a esto se realiza la observación microscópica teñido con tinción de Gram, en donde se identifica la morfología del microorganismo junto con su afinidad tintorial y finalmente se realizan pruebas bioquímicas a la cepa mediante batería, utilizando medios como TSI, LIA, MIO, Bilis esculina, Citrato de sodio y la realización de la prueba de Camp en agar sangre de cordero al 5%.

Identificación de *Listeria monocytogenes*



FIGURA N° 1: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Listeria monocytogenes*. A: Medio TSI, A/A, LIA A/A, inmóvil, indol negativo y descarboxilación de la ornitina negativo, Citrato negativo y Bilis positiva, ordenadas de izquierda a derecha respectivamente. B: Prueba de Camp positiva con β - lisina.

Identificación de *Listeria innocua*

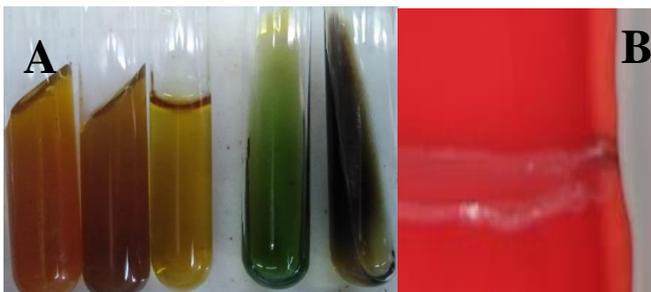


FIGURA N° 2: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Listeria innocua*. A: Medio TSI, A/A, LIA A/A, inmóvil, indol negativo y descarboxilación de la ornitina negativo, Citrato de sodio negativo y Bilis esculina positiva, ordenadas de izquierda a derecha respectivamente. B: Prueba de Camp negativa con β - lisina.

Identificación de *Listeria ivanovii*

Junto con las pruebas mencionadas anteriormente para la identificación de las especies de *Listeria spp*, a esta especie se realizó una prueba adicional para la completa identificación y diferenciación de las otras especies de este género, la cual es un Test de Camp con *Rhodococcus equi*, en el cual se observa una hemólisis en forma de pala.

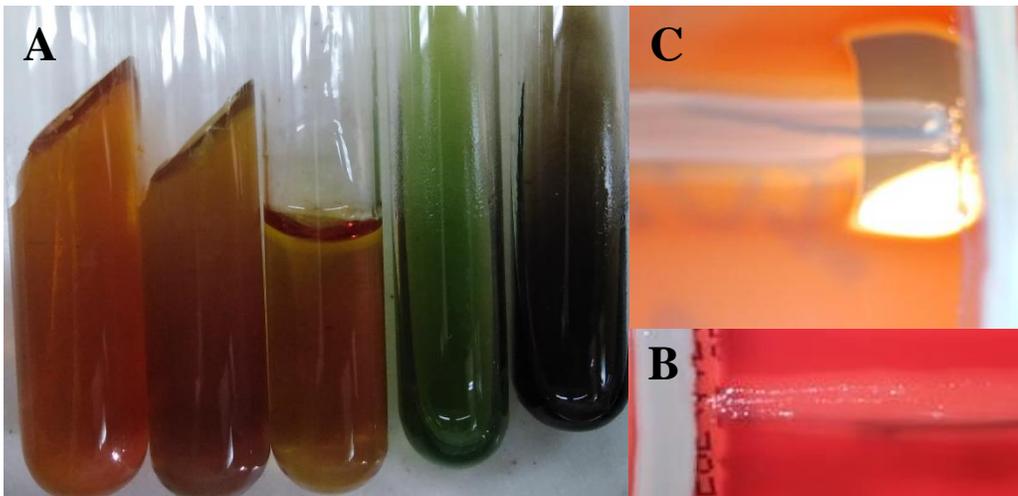


FIGURA N° 3: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Listeria ivanovii*. A: Medio TSI, A/A, LIA A/A, inmóvil, indol negativo y descarboxilación de la ornitina negativo, Citrato de sodio negativo y Bilis esculina positiva, ordenadas de izquierda a derecha respectivamente. B: Prueba de Camp negativa con β - lisina. C: Prueba de Camp positiva en forma de pala con *Rhodococcus equi*.

Identificación de especies de *Salmonella spp*

Para la confirmación de las especies de este género, inicialmente se realiza una observación macroscópica de la colonia en agar sangre, en donde se visualizó la morfología y coloración de la colonia, además de la realización de una tinción de Gram, para la determinación de la morfología y afinidad tintorial del microorganismo. Posterior a esto se realiza la identificación mediante medios de cultivo como el medio TSI, LIA, MIO, Citrato de sodio, Urea de Christensen y Bilis esculina.

Identificación de *Salmonella entérica serovar enteritidis*



FIGURA N° 4: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Salmonella entérica serovar enteritidis*. TSI K/A con presencia de H₂S, LIA K/A con presencia de H₂S, móvil, indol negativo, descarboxilación de la ornitina positivo, Citrato positivo, Bilis negativo, Urea negativo.

Identificación de *Salmonella entérica serovar typhimurium*



FIGURA N° 5: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Salmonella entérica serovar typhimurium*. TSI K/A con presencia de H₂S, LIA K/A con presencia de H₂S, móvil, indol negativo, descarboxilación de la ornitina positivo, Citrato positivo, Bilis negativo, Urea negativo.

Identificación de *Staphylococcus aureus*

En la confirmación de esta especie, se realiza la identificación macroscópica de la colonia en agar sangre, y la observación microscópica con tinción de Gram, además de la realización de pruebas de identificación específicas, con la realización de prueba de la coagulasa en tubo.



FIGURA N° 6: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Staphylococcus aureus*. Prueba de coagulasa en tubo positivo.

Identificación de *Bacillus cereus*

Para la corroboración de este microorganismo se realizó la identificación macroscópica de la colonia y observación microscópica con tinción de Gram. También se realizan pruebas bioquímicas consiste en batería de los medios TSI, LIA, MIO, Citrato de sodio, Bilis esculina y Urea de Christensen.



FIGURA N° 7: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Bacillus cereus*. TSI A/A, LIA K/A, inmóvil, indol negativo, descarboxilación de la ornitina negativo, Citrato negativo, Bilis negativo, Urea positivo.

Identificación de especies de *Shigella spp*

En la confirmación de las especies de este microorganismo se realizó la observación macroscópica de la colonia en agar sangre y la observación microscópica teñido con tinción de Gram, además de la realización de pruebas bioquímicas ocupando medios como TSI, LIA, MIO, Citrato de sodio, Bilis esculina y Urea de Christensen.

Identificación de *Shigella sonnei*



FIGURA N° 8: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Shigella sonnei*. TSI K/A, LIA K/A, inmóvil, indol negativo, descarboxilación de la ornitina positivo, citrato negativo, bilis negativo, urea negativo.

Identificación de *Shigella flexneri*



FIGURA N° 9: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Shigella flexneri*. TSI K/A, LIA K/A, inmóvil, indol positivo, descarboxilación de la ornitina negativo, citrato negativo, bilis negativo, urea negativo.

Identificación de *Escherichia coli*



FIGURA N° 10: PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Escherichia coli*: TSI K/K, LIA K/K, móvil, indol positivo, descarboxilación de la ornitina positivo, citrato negativo, bilis negativo.

Preparación del inóculo

Para la preparación de los inóculos de las diferentes especies de microorganismos utilizados, se inicia a partir de un cultivo puro y fresco de la bacteria en experimentación, posterior a esto se añade un par de colonias a un caldo BHI (Brain heart infusion) de la marca Difco™, con 5 mL, se incuba overnight a 37°C, a partir de este cultivo en caldo BHI, se toma una alícuota de 20 µL y se deposita en un nuevo tubo con 5 ml de caldo BHI y se deja

incubando a 37° Celsius por 12 horas. A partir de este inóculo se toman 500µL y se dispensa en un tubo con 4,5 mL de agua peptona al 0,1%, un tubo para cada repetición.

Aplicación del tratamiento con Plasma Frío Atmosférico

Los inóculos se tratan con plasma frío atmosférico durante treinta segundos a una distancia de trabajo modificable, ya sea a 5, 7 y 9 centímetros, distancia la cual consiste entre la cubierta de teflón del electrodo y la parte superior de la base de la placa en donde se encuentra el caldo BHI anteriormente incubado, la descarga del electrodo se dirige de forma perpendicular a la placa. El tratamiento se realiza en el interior de una Cabina de Seguridad Biológica Clase II, tipo A2 durante un tiempo de aplicación del tratamiento con plasma frío atmosférico de 30 segundos. Para verificar la eficacia del tratamiento con plasma frío atmosférico, se usa una suspensión que no es tratada, la cual es considerada la concentración inicial del inóculo y se mide su densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. Posterior a la aplicación del tratamiento se procede a sembrar. Por lo que se denominó al tratamiento B la distancia de aplicación de 5 cm, el tratamiento C y D son la distancia de aplicación de 7 cm y 9 cm respectivamente.

En las distancias de 5 y 7 centímetros, el extractor de la Cabina de Seguridad Biológica clase II se mantiene encendido mientras son tratados con el plasma frío atmosférico, en cambio a la distancia de 9 cm, el extractor se procede a apagar el extractor mencionado.

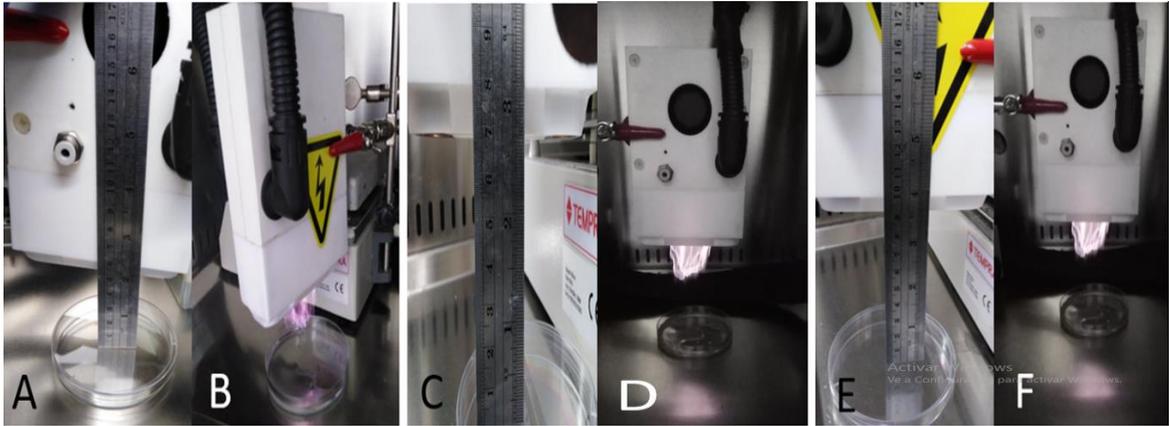


FIGURA N° 11: Fotografías de la aplicación de plasma. **A:** Determinación de la diferencia de 5 cm entre la superficie de la tapa de la placa y la cubierta de teflón del electrodo. **B:** Aplicación del plasma en el inóculo a una distancia de 5 cm. **C:** Determinación de la diferencia de 7 cm entre la superficie de la tapa de la placa y la cubierta de teflón del electrodo **D:** Aplicación del plasma en el inóculo a una distancia de 7 cm. **E:** Determinación de la diferencia de 9 cm entre la superficie de la tapa de la placa y la cubierta de teflón del electrodo. **F:** Aplicación del plasma en el inóculo a una distancia de 9 cm.

Realización de la siembra y Recuento de unidades formadoras de colonia

Para la realización de la siembra se utiliza el equipo de siembra en espiral Eddy Jet 2 (IUL, Barcelona, España), con la programación “E-mode” con dispensación de 50 μ L. Para las especies de *Listeria spp* se ocupa agar Oxford de la marca Difco TM y para las otras especies en experimentación se utiliza agar soya tripticasa de la marca Difco TM. Cada distancia de aplicación con cada microorganismo se realiza en triplicado. Además se realizan diluciones seriadas con agua peptona al 0,1% para conseguir un número óptimo de colonias para realizar el recuento según la metodología indicada por el fabricante del equipo Eddy Jet 2, también realizando en triplicado la siembra de cada dilución.

Las placas sembradas se incuban a 37° C por 18 a 24 horas, y el valor obtenido en el conteo de las colonias se reemplaza en la fórmula presente en el manual del equipo, cuya fórmula consiste en que la concentración de unidades formadoras de colonias es equivalente a $(N' + N'') / (V/4)$, en donde N' son las CFU contadas en el primer 1/8 de la placa, N'' son las CFU contadas en el sector 1/8 opuesto de la placa y V es el volumen total de los anillos contados, el cual es un factor obtenido del manual mencionado anteriormente. Luego este resultado fue multiplicado por el factor de dilución correspondiente, obteniéndose un valor aproximado de las UFC/mL de los inóculos.

El recuento según el manual de Eddy Jet 2 se realiza con apoyo de una cuadrícula de conteo seccionada en 8 porciones iguales para seleccionar la porción especificada en la fórmula. Esta se encuentra dividida en 4 secciones concéntricas enumeradas de exterior a interior del 1 al 4, de las cuales se encuentran subdivididas en tres anillos etiquetadas como 1c a la parte más exterior de la cuadrícula y 1a al anillo más interno de la sección 1 y de la misma forma con las demás secciones.

En la utilización de placas de Petri de 100 mm se utilizan las secciones 3 y 4 de la cuadrícula de conteo y la aparición de cualquier colonia fuera de ese rango no se considera. Al realizar el conteo se selecciona un 1/8 de la placa de Petri en la cual se superpone la cuadrícula de conteo, comenzando el conteo por el anillo más externo hacia el interior hasta cuando se cumpla un recuento de 20 colonias, pero se debe de continuar con el conteo hasta contabilizar el total de colonias presentes en el anillo y se da por finalizada el conteo en esa cuadrante. Posteriormente se deben contar las colonias que se presenten en el mismo anillo del sector opuesto de la cuadrícula, reemplazando posteriormente los valores obtenidos en la fórmula descrita anteriormente.

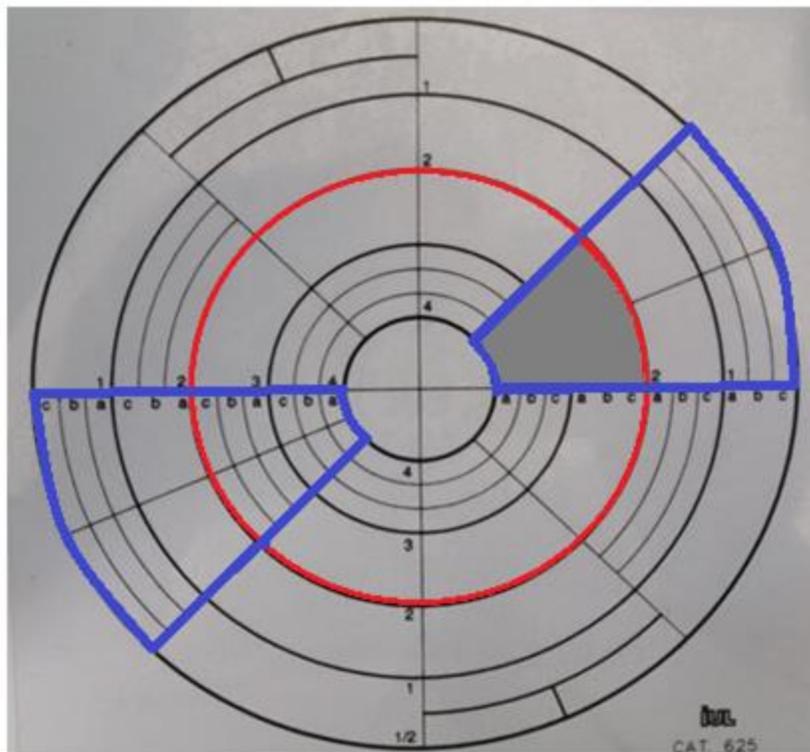


Figura N° 12: Cuadrícula de conteo del equipo Eddy Jet 2 por IUL S.A.

El sector delimitado con el color azul corresponde a $1/8$ de la cuadrícula y su sector opuesto, la porción circular enmarcada con un color rojo establece las secciones 3 y 4 para el recuento en una placa de 100 mm y la zona en gris representa el área utilizada para el conteo.

El análisis estadístico realizado es inicialmente el cálculo de la media y la desviación estándar de las tres repeticiones realizadas por cada distancia y microorganismo estudiado. Además se realiza el análisis de varianza (ANOVA + Tukey HSD) con el software JMP14 (SAS, INSTITUTE Cary, NC, Estados Unidos).

6. RESULTADOS

Tabla N° 1: Efecto *in vitro* de los diferentes tratamientos con plasma frío atmosférico sobre las especies Gram positivos, expresada en Log UFC/mL, Media y desviación estándar.

Patógeno	Tratamiento A				Tratamiento B				Tratamiento C			
	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD
<i>Bacillus cereus</i>	7,24	7,02 ± 0,03		A	7,01	6,76 ± 0,04		A	7,47	7,13 ± 0,03		B
<i>Listeria innocua</i>	8,29	8,15 ± 0,02		A	8,76	8,41 ± 0,43		B	9,38	9,02 ± 0,10		B
<i>Listeria ivanovii</i>	9,02	8,78 ± 0,05		B	9,16	8,81 ± 0,05		B	9,16	8,73 ± 0,13		B
<i>Listeria monocytogenes</i>	10,06	9,27 ± 0,01		B	9,26	9,10 ± 0,06		A	10,43	9,19 ± 0,03		B
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,77	8,34 ± 0,06		B	8,67	8,36 ± 0,04		B	8,97	8,52 ± 0,04		B

Los promedios dentro de cada fila seguidos por una letra mayúscula A, señala que no son significativamente diferente a la concentración inicial, en cambio con la letra B, los datos si son significativamente distintos entre sí. (Prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Tabla N° 2: Efecto *in vitro* de los diferentes tratamientos con plasma frío atmosférico sobre las especies Gram negativos, expresada en Log UFC/mL, Media y desviación estándar.

Patógeno	Tratamiento A				Tratamiento B				Tratamiento C			
	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD	Concentración inicial	Media ± Desviación estándar		Tukey HSD
<i>Escherichia coli</i>	9,56	8,88	± 0,01	B	9,25	9	± 0,07	A	9,25	8,98	± 0,03	A
<i>Salmonella enteritidis</i>	9,38	8,6	± 0,01	B	8,92	8,52	± 0,14	B	8,54	8,21	± 0,08	B
<i>Salmonella typhimurium</i>	8,70	8,33	± 0,06	B	8,96	8,8	± 0,1	A	8,96	8,78	± 0,02	A
<i>Shigella flexneri</i>	9,22	8,75	± 0,01	B	8,75	8,54	± 0,05	A	8,95	8,57	± 0,21	B
<i>Shigella sonnei</i>	9,53	8,55	± 0,01	B	8,86	8,69	± 0,09	A	8,85	8,57	± 0,14	B

Los promedios dentro de cada fila seguidos por una letra mayúscula A, señala que no son significativamente diferente a la concentración inicial, en cambio con la letra B, los datos si son significativamente distintos entre sí. (Prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$).

Gráfico N° 1: Porcentaje de inhibición de los microorganismos Gram positivos en los diferentes tratamientos.

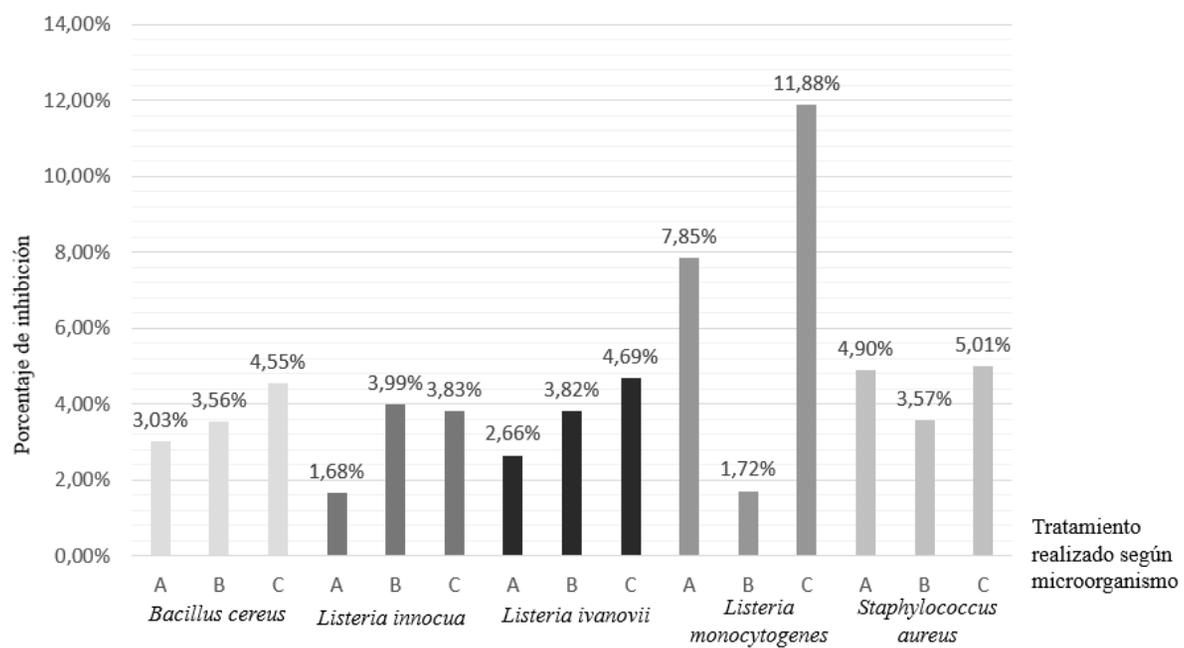
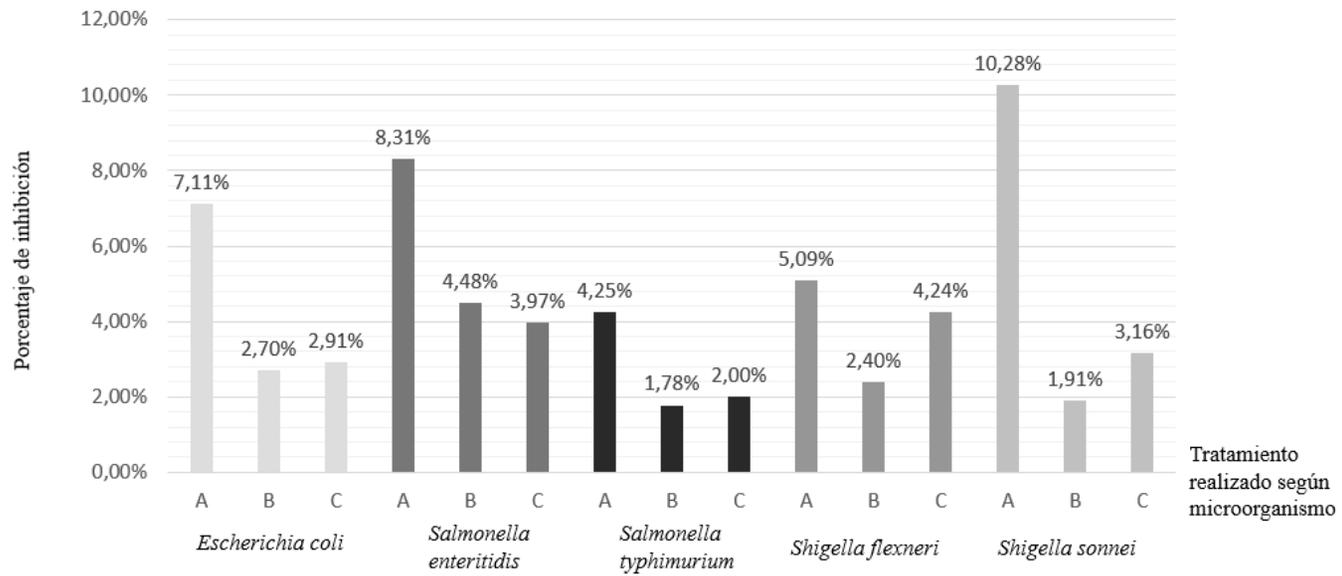


Gráfico N° 2: Porcentaje de inhibición de los microorganismos Gram negativos en los diferentes tratamientos.



7. DISCUSIÓN

El tratamiento con plasma frío atmosférico durante 30 segundos, logró disminuir la concentración bacteriana en las diferentes especies patógenas, ya sean Gram positivos o Gram negativos en las diferentes distancias aplicadas.

En los datos mostrados en la Tabla 2, referentes a la especie *Shigella flexneri* y *Shigella Sonnei*, se obtuvo que la mayor inhibición fue obtenida a una distancia de aplicación de 5 cm, siendo estadísticamente significativa respecto a la concentración inicial, en donde el plasma formado llega bastante cerca del inóculo preparado, según la radiación de color violeta observable por el ojo humano, pero también las especies reactivas, ozono y los otros componentes formados se dispersaran menos en el interior de la cabina de seguridad, en cambio a la distancia de 7 cm de aplicación del tratamiento, no se obtuvo diferencia significativa respecto a la concentración inicial alcanzando cerca de un 2 % de inhibición en ambas especies, esto pudo ser debido a que los componentes formados eran sacados del entorno al estar el extractor encendido, ya que la distancia en donde se formaban y en donde se encontraba el inóculo era mayor por lo que era más factible que estos fueran eliminados antes de lograr un efecto en las bacterias. Sin embargo, a la distancia de 9 centímetros se logró una mayor un porcentaje de inhibición que la distancia de los 7 cm, pero no fue mayor a la distancia de 5 cm, pero de igual forma se consiguió una diferencia estadísticamente significativa, al estar más alejado el electrodo con el inóculo se esperaba que el efecto de inhibición hubiera sido menor al obtenido por la distancia de 7 cm, aunque se puede pensar que el efecto mayor de la distancia de 9 cm es debido a que el extractor de la cabina de seguridad no se encontraba funcionando, los elementos como las especies reactivas, el ozono, partículas cargadas se mantienen por un tiempo mayor en el entorno y logran hacer un mayor efecto en su objetivo.

En el caso de *Escherichia coli*, con los resultados mostrados en la tabla 2 y gráfico 2, se repite la situación descrita anteriormente para el género *Shigella spp*, siendo estadísticamente significativa para la distancia de 5 cm o tratamiento A, sin embargo, la diferencia que existe con este género es que *E.coli* en las distancias de 7 y 9 cms no hay una diferencia significativa al comparar el efecto entre ambos, a pesar de que si existe un efecto de inhibición al compararlo con la concentración inicial llegando a un porcentaje de inhibición de 2,7% y 2,91% respectivamente.

En el caso del género *Salmonella spp*, con los resultados mostrados en la tabla 2 se identifica la misma temática obtenida para el género *Shigella spp*, en donde se obtiene un mayor efecto antimicrobiano a una distancia de 5 cm con diferencia estadísticamente significativa para ambas especies, en cambio para *Salmonella enteritidis* existe diferencia significativa para los tres tratamientos, en cambio *Salmonella typhimurium* no tiene diferencia significativa para los tratamientos B y C alcanzando un porcentaje de inhibición de 1,78% y 2% respectivamente.

En la situación de las especies Gram positivas, tenemos al género *Listeria*, con los resultados presentados en la tabla 1, en donde se puede observar que en las especies de *L. monocytogenes*, *L.innocua* y *L. ivanovii* existió el mayor efecto a la distancia de 9 cms, en cambio, para la distancia de 5 cm de aplicación solo se obtuvo diferencia significativa para *L.monocytogenes* y para la distancia de 7 cm no superó el 2 % de inhibición, en cambio para *L.innocua* y *L. ivanovii* si existió diferencia significativa en este tratamiento.

En el caso de *Staphylococcus aureus*, con los resultados mostrados en la tabla 1 y gráfico 1, se muestra que la distancia en donde se obtuvo la menor porcentaje de inhibición fue la distancia de 7 cm, pero obteniendo resultados estadísticamente significativa para los tres tratamientos.

En el caso de *Bacillus cereus*, con los resultados mostrados en la tabla 1, se obtiene el mayor porcentaje de inhibición a los 9 cm siendo estadísticamente significativo, en cambio para los otros dos tratamientos no existe diferencia significativa, pero si se alcanzaron porcentajes de inhibición de 3,03% y 3,56% en los tratamientos A y B.

Diversos estudios han descrito una correlación entre las tasa de inactivación y humedad del gas. En donde se obtuvo una mayor reducción en las esporas de *Bacillus atrophaeus* al aumentar los niveles de humedad al 50% (115), sin embargo se ha informado una mayor inactivación de *Aspergillus niger* con un aumento de la humedad relativa del gas a un 80% (116).

Según Liao et al. (2017), al aumentar el tiempo de tratamiento se obtiene una mayor exposición a especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y una mayor acumulación de especies reactivas de plasma obteniéndose de esta forma mayores tasas de inactivación después de varios minutos de tratamiento con plasma frío atmosférico (117), las moléculas de ROS y ozono son los principales factores para la inhibición bacteriana, ya que el ozono es conocido por su efecto oxidativo, capaz de formar radicales hidroxilo, los cuales son altamente reactivos y un alto efecto bactericida, pero el tiempo de vida de estas moléculas es más largo a medida que aumenta el porcentaje de humedad del gas portador (118), lo que apoyaría la idea del mayor efecto antimicrobiano de la distancia de 9 cm.

También se ha reportado que la concentración de ozono disminuye al aumentar el porcentaje de humedad, por lo que se puede ver afectado por la humedad ambiental o la de la superficie del producto, por lo que se podría afectar la susceptibilidad de las bacterias al efecto del ozono (119).

En un estudio realizado por Niemira et al (2014), en donde se testea el efecto del plasma frío atmosférico sobre biopelículas de *Salmonella*, en donde se aplicaron tiempos de exposición de 5, 10 y 15 segundos a una distancia de 5 o 7,5 cm desde la cabeza del emisor del chorro de plasma, además de modificar el voltaje entre 23 y 48 KHz. Por lo que se obtuvo en la distancia de 5 cm una reducción mayor a los 15 segundos, en cambio la distancia de 7,5 cm redujo la eficacia del tratamiento de 15 segundos, pero con efectos variables en los tratamientos de 5 y 10 segundos. Y la variación de voltaje tuvo un efecto mayor en los tratamientos de 10 y 15 segundos en especial en la distancia de 7,5 cm (120).

En otro estudio realizado por Niemira (2012), se evaluó la eficacia de los tratamientos rápidos de plasma frío atmosférico en la eliminación de especies de *Salmonella* y *E.coli* O157:H7 en almendras secas. En donde se trataron a diferentes tiempos de exposición, distancia y gas de alimentación. En donde la distancia desde el emisor fue de 2, 4 y 6 cm. En el caso de *E. coli* existió una mayor reducción entre mayor fuera la distancia, siendo los 2 centímetros con la menor reducción. Para el caso de *Salmonella* se obtuvieron mayores reducciones a los 6 cm siendo el aire el gas portador y 4 cm siendo el nitrógeno el gas portador (111).

Las diferencias en las paredes celulares entre bacterias Gram positivos y Gram negativos podrían tener un papel en la resistencia al estrés externo, al calor, desecación, presión, y probablemente al plasma frío atmosférico. Algunos autores plantean la hipótesis de que la efectividad del tratamiento podría depender del grosor de la membrana celular, ya que dificultaría el ingreso de los radicales libres, disminuyendo el daño al ADN y componentes intracelulares (112)(112).

Se ha determinado que los ROS y RNS en las bacterias Gram positivas, se difunden a través de las membranas celulares bacterianas o pueden ser transportados por canales iónicos, reaccionando con las estructuras intracelulares, dando como resultado la contracción celular (121), en cambio para las bacterias Gram negativas la efectividad de los radicales libres se debe a que interactúan con los componentes de la membrana celular, lipopolisacaridos y peptidoglicanos provocando la rotura celular producto de la peroxidación lipídica de lipopolisacaridos (122).

Se ha demostrado que el plasma degrada lípidos, proteínas y el ADN de las células (123). En donde los átomos de oxígeno son un potencial agente de esterilización debido a los procesos de óxido-reducción. Por lo que los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana celular, impidiéndose el transporte de biomoléculas (112), (124). Las proteínas de las células y de las esporas son igualmente vulnerables causando desnaturalización y fuga celular, oxidación de los aminoácidos y ácidos nucleicos que pueden causar cambios resultando en la muerte del microorganismo (112).

El daño de las estructuras de la pared celular como resultado de un tratamiento con plasma frío atmosférico ha sido reportado en *Bacillus cereus*, tanto en células vegetativas como en esporas y en *E. coli*. (125). Pero a la vez otros estudios han mostrado que se logra reducir la

población bacteriana a niveles significativos superando los tres minutos de aplicación del tratamiento en especies de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E.coli* O157:H7 (126).

8. CONCLUSIONES

En este estudio se concluyó que el tratamiento con plasma frío atmosférico en las diferentes especies patógenas de interés alimentario, como lo son *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* tiene un efecto antimicrobiano.

Es los microorganismos que son Gram negativos se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición a una distancia de 5 cm de aplicación del tratamiento, en cambio en los microorganismos Gram positivos el mayor porcentaje de inhibición se vio a la distancia de 9 cm, excepto por la *L. innocua* en donde se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición a la distancia de 7 cm, pero este es quien presenta una mayor desviación estándar.

En relación a las distancias de aplicación del tratamiento estudiadas, se logró identificar que en las distancias de 5, 7 y 9 cm, se logra una disminución parcial del inóculo del microorganismo, en donde de los 10 microorganismos a la distancia de 5 cm se logró diferencia significativa en 8 de ellos al igual que a la distancia de 9 cm, en cambio a la distancia de 7 cm solo en 4 microorganismos se consiguió una diferencia significativa.

Debido a lo obtenido, se requieren más estudios para determinar las variables en donde se obtenga una diferencia significativa del tratamiento con plasma frío atmosférico y

estandarizar dichas condiciones de trabajo, ya sea usando la menor distancia de aplicación que sea posible en la industria alimentaria y en los estudios *in vitro*, si es posible con el extractor apagado de la cabina de seguridad, ya que puede mejorar la inhibición bacteriana y en otros estudios se ha utilizado un mayor tiempo de aplicación del tratamiento. Y al unir estas condiciones determinar si es que se logra el mejor efecto, pero a la vez es necesario hacer la evaluación en diferentes matrices para garantizar a la industria alimentaria su calidad y que permite la inocuidad de los alimentos, otorgando seguridad a los consumidores de que no sufrirán enfermedades transmitidas por los alimentos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. (FAO) Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Principios generales de higiene de los alimentos. 2003.
2. Organización panamericana de la salud, Organización mundial de la Salud. Inocuidad de alimentos [Internet]. [cited 2019 May 4]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=266&Itemid=40906&lang=es
3. Organización mundial de la salud. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. 2015.
4. Gobierno de Chile. Política Nacional de Inocuidad de los Alimentos. Santiago, Chile N° 35960. 2009;6.
5. Gobierno de Chile. Política Nacional de inocuidad y calidad de los alimentos. Santiago de Chile 2018.
6. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Recopilación de normativas y circulares Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria. Santiago, Chile 2011.
7. Organización mundial de la salud. Inocuidad de los alimentos [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
8. Gobierno de Chile. Circular de investigación epidemiológica y control ambiental de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. circular B51 N° 12 :1–37. 2016.
9. Sharma VK, Akavaram S, Schaut RG, Bayles DO. Comparative genomics reveals structural and functional features specific to the genome of a foodborne *Escherichia coli* O157:H7. *Biological Sciences* 0604 Genetics. *BMC Genomics*. 2019;20(1):1–18.
10. Hancock D, Besser T, Lejeune J, Davis M, Rice D. The control of VTEC in the animal reservoir. 2001.
11. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and Some Properties of Verotoxin.pdf. 1993;31(9):2483–8.
12. Rubeglio EA, Tesone S. *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Arch Argent Pediatr*. 2007;105(3):193–4.
13. Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM, Seymour-Murray J, Davos D, Lanser JA, et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(7):1622–7.

14. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. 1998;11(3):450–79.
15. Karmali M. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. 1989;2(1):15–38.
16. Karch H, Russmann H, Schmidt H, Schwarzkopf A, Heesemann J. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol*. 1995;33(6):1602–5.
17. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W-L, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;185(1):74–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756984>.
18. WebMD. Uremic Syndrome. 2011;(December 1975):486–8. Available from: <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/uremic-syndrome>.
19. Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. 2019;(May):1005–14.
20. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, et al. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(2):93–100.
21. Fitzhenry RJ, Reece S, Trabulsi LR, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, et al. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. *Infect Immun*. 2002;70(8):4362–8.
22. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* [Internet]. 1987;51(2):206–20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299029> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC373104>.
23. Sandvig K, van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev*. 2017;76(4):949–66.
24. Sandvig K, Garred Ø, Prydz K, Kozlov J V, Hansen SH, van Deurs B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* [Internet]. 1992;358(6386):510–2. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/358510a0>
25. Skinner LM, Jackson MP. Investigation of ribosome binding by the shiga toxin A1 subunit, using competition and site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*. 1997;179(4):1368–74.
26. Ogasawara T, Ito K, Igarashi K, Yutsudo T, Nakabayashi N, Takeda Y. Inhibition of protein synthesis by a Vero toxin (VT2 or Shiga-like toxin II) produced by *Escherichia coli* O157:H7 at the level of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes. *Microb Pathog*. 1988;4(2):127–35.
27. Brian MJ, Frosolono M, Murray BE, Miranda A, Lopez EL, Gomez HF, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*. 1992;30(7):1801–6.

28. Riley LW. The Epidemiologic, Clinical, and Microbiologic Features of Hemorrhagic Colitis. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1987 Oct 1;41(1):383–405. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002123>.
29. Tesh VL, O'Brien AD. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol*. 1991;5(8):1817–22.
30. Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiological Aspects of Human Infection. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1995;20(1):1–8. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/4458261>.
31. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(4):815–36.
32. Inc MY. Food Grade [Internet]. [cited 2019 Jun 30]. Disponible en: <https://www.maximumyield.com/definition/2081/food-grade>.
33. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol*. 1997;35(3):213–21.
34. Becker K, Keller B, Von Eiff C, Brück M, Lubritz G, Etienne J, et al. Enterotoxigenic Potential of Staphylococcus intermedius. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(12):5551–7.
35. Even S, Leroy S, Charlier C, Ben N, Chacornac J, Lebert I, et al. International Journal of Food Microbiology Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;139(1–2):87–95. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.019>
36. Zendejas-manzo GS, Avalos-flores H, Soto-padilla MY. Microbiología general de Staphylococcus aureus : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación. 2014;25(3):129–43.
37. Mitchell DT, Levitt DG, Schlievert PM, Ohlendorf DH. Structural Evidence for the Evolution of Pyrogenic Toxin Superantigens. 2000;1:520–31.
38. Bergdoll M. Staphylococcus aureus. *Foodborne Bacterial Pathogens*. 1989.
39. Sugiyama H, Hayama T. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J Infect Dis*. 1965;115(4):330–6.
40. Hu DL, Zhu G, Mori F, Omoe K, Okada M, Wakabayashi K, et al. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell Microbiol*. 2007;9(9):2267–77.
41. Shupp JW, Jett M, Pontzer CH. Identification of a transcytosis epitope on staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun*. 2002;70(4):2178–86.
42. Sheahan DG, Jervis HR. The Effect of Staphylococcal Enterotoxin on the Epithelial Mucosubstances of the Small Intestine of Rhesus Monkeys. 1970;60(1).
43. Sullivan R. Effects of Enterotoxin B on Intestinal Transport in Vitro". 1969.

44. Mead P.S, Slutsker L, Dietz V, McCaig L.F, Bresee J.S, Shapiro C, Griffin P.M, Tauxe R V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1999;5(6):840–2. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2640792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
45. Mossel D, Corry J, Struijk C, Baird R. *Essentials of the microbiology of foods. A Textbook for Advanced Studies*. Sons W&, editor. 1995.
46. Martín S, Myers E, Iandolo J. *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Disease Handbook*. Segunda ed. Dekker M, editor. Vol. 1. 2001.
47. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. 1988;7:311–6.
48. Johnson KM. *Bacillus cereus* foodborne illness. An update. *J Food Prot*. 1984;47(2):145-153.
49. Luo Y, Hildreth MB, Bro VS. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Se*. 2006;72(7):4970–7.
50. Kramer J, Gilbert R. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne Bacterial Pathogens*. 1989.
51. Ehling-schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. 2004;232:189–95.
52. Ceuppens S, Rajkovic A, Hamelink S, Wiele T Van De. Enterotoxin Production by *Bacillus cereus* Under Gastrointestinal Conditions and Their Immunological Detection by Commercially Available Kits. 2012;9(12):1130–6.
53. Senesi S, Ghelardi E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. 2010;1690–703.
54. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(4):579–606.
55. Wijnands LM, Pielaat A, Dufrenne JB, Zwietering MH, Van Leusden FM. Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *J Appl Microbiol*. 2009;106(1):258–67.
56. Fagerlund A, Lindba T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP, Hardy SP. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE , SheA) family of haemolysins , able to induce osmotic lysis in epithelia. 2008;(2008):693–704.
57. Hardy SP. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelial. 2001;197:47–51.
58. Lund T, Buyser M De, Einar P, Aliments ÅS. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. 2000;38:254–61.
59. Beechert DJ, Macmillan JD. Characterization of the Components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. 1991;59(5):1778–84.

60. Fagerlund A, Rødland MS. Characterization of the Bacillus cereus Nhe enterotoxin. 2019;(2004):3959–67.
61. Lund T, Granum PE. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of Bacillus cereus. Microbiology. 1997;143(10):3329–36.
62. Schoeni JL, Lee Wong AC. Bacillus cereus Food Poisoning and Its Toxins. J Food Prot. 2005;68(3):636–48.
63. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. 2000.
64. Ehling-schulz M, Fricker M, Scherer S. Review Bacillus cereus , the causative agent of an emetic type of food-borne illness. 2004;479–87.
65. Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from Bacillus cereus causes vacuole formation in HEp-2 cells . FEMS Microbiol Lett. 2006;121(1):31–4.
66. Ehling-schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Ma E, et al. Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic Bacillus cereus. 2005;71(1):105–13.
67. Mikkola R, Saris NL, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-salonen MS. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide The emetic toxin of B . cereus. 1999;117:112–7.
68. Shinagawa K, Ueno Y, Hu D, Ueda S, Sugii S. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by Bacillus cereus isolated from vomiting-type food poisoning. 1996;
69. Paananen A, Timonen T. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide , an emetic toxin from Bacillus cereus. 2002;420–8.
70. ANMAT. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos :Salmonelosis. 2015;1–14. Available from: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/salmonelosis.pdf>
71. Hartman G. Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Introduction. Book. 2012;1:259.
72. Carayol N, Nhieu GT Van. The Inside Story of Shigella Invasion. 2013;1–13.
73. Dupont H, Levine M, Hornick R, Formal S. Inoculum Size in Shigellosis and Implications For Expected Mode of Transmission. J Infect Dis. 1989;159(6):1126–8.
74. Bliven KA, Maurelli AT. Antivirulence Genes : Insights into Pathogen Evolution through Gene. 2012;80(12):4061–70.
75. Niyogi SK. Shigellosis-SK Niyogi. 2005;43(2):133–43.
76. Kuo C-Y, Su L-H, Perera J, Carlos C, Hock Tan B, Kumarasinghe G, et al. Antimicrobial susceptibility of Shigella isolates in eight Asian countries. J Microbiol Immunol Infect. 2008;41:107–11.

77. Anderson M, Sansonetti PJ, Marteyn BS. Shigella Diversity and Changing Landscape : Insights for the Twenty-First Century. 2016;6(April):1–9.
78. Wassef JS, Keren DF, Mailloux JL. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun*. 1989;57(3):858–63.
79. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*. 2013;6(4):666–77.
80. Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Huerre M, Pre M, Carolina S, et al. Infection of Rabbit Peyer ' s Patches by Shigella flexneri : Effect of Adhesive or Invasive Bacterial Phenotypes on Follicle- Associated Epithelium. 1996;64(7):2752–64.
81. Schnupf P, Sansonetti PJ. Quantitative RT-PCR profiling of the Rabbit Immune Response : Assessment of Acute Shigella flexneri Infection. 2012;7(6):1–9.
82. Franzon VL, Arondel J, Sansonetti PJ. Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to Shigella flexneri pathogenesis. *Infect Immun* [Internet]. 1990;58(2):529–35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404874> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC258489>.
83. Carneiro LAM, Travassos LH, Soares F, Tattoli I, Magalhaes JG, Bozza MT, et al. Shigella Induces Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Nonmyleoid Cells. *Cell Host Microbe*. 2009;5(2):123–36.
84. Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, et al. Shigella isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin Infect Dis*. 2014;59(7):933–41.
85. Ram PK, Crump JA, Gupta SK, Miller MA, Mintz ED. Part II. Analysis of data gaps pertaining to Shigella infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol Infect*. 2008;136(5):577–603.
86. Von Seidlein L, Deok RK, Ali M, Lee H, Wang XY, Vu DT, et al. A multicentre study of Shigella diarrhoea in six Asian countries: Disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med*. 2006;3(9):1556–69.
87. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya S. Shigellosis: Challenges & management issues. Vol. 120, *The Indian journal of medical research*. 2004. 454–462 p.
88. Gray M, Leonard S, Lacher D, Lampel K, Alam M, Morris JG, et al. Stx-Producing Shigella Species From Patients in Haiti: An Emerging Pathogen With the Potential for Global Spread. 2015.
89. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti PJ. Role of Shiga Toxin in the Pathogenesis of Bacillary Dysentery , Studied by Using a Tox- Mutant of Shigella dysenteriae 1. 1988;56(12):3099–109.
90. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet].

- 2016;100(12):5273–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
91. Chiara M, Caruso M, D’Erchia AM, Manzari C, Fraccalvieri R, Goffredo E, et al. Comparative genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. *Genome Biol Evol*. 2015;7(8):2154–72.
 92. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R V, Widdowson M, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens. 2011;17(1):7–15.
 93. Aureli P, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S, et al. An Outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. 2000.
 94. Hamidiyan N, Salehi-abargouei A, Rezaei Z, Dehghani-tafti R. The prevalence of *Listeria spp* . food contamination in Iran : A systematic review and meta-analysis. *Food Res Int* [Internet]. 2018;107(February):437–50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.038>
 95. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5):863.
 96. Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes* Is Also Present in *Listeria ivanovii* , an Animal Pathogen , and *Listeria seeligeri* , a Nonpathogenic Species. 1994;62(8):3550–3.
 97. Quereda JJ, Dussurget O, Nahori M-A, Ghazlane A, Volant S, Dillies M-A, et al. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection . *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(20):5706–11.
 98. Maury MM, Tsai Y, Charlier C, Touchon M. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. 2016;48(3):308–13.
 99. Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D, et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol* [Internet]. 2009;26(1):103–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.003>
 100. Chand P, Sadana JR. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India Anaesthesia of cranes with alphaxolone- alphadolone. 1998;(1991).
 101. Gill P, Boulton J, Fraser G, Stevenson A. Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii*. 1997;3(3):1993349.
 102. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):136–8.
 103. Bakker HC Den, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. nov ., *Listeria cornellensis* sp . nov ., *Listeria riparia* sp . nov . and *Listeria grandensis* sp . nov ., from agricultural and natural environments. 2019;(2014):1882–

- 9.
104. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, Bakker HC Den. *Listeria booriae* sp . nov . and *Listeria newyorkensis* sp . nov ., from food processing environments in the USA. 2019;(2015):286–92.
 105. Niemira BA, Gutsol A. Nonthermal Plasma as a Novel Food Processing Technology. In: Zhang HQ, Farkas GVBVMBC, F. PDD, Yuan JTC, editors. *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Blackwell Publishing; 2010.
 106. Niemira BA. *Cold Plasma Decontamination of Foods* *. 2012;
 107. Lieberman MA, Lichtenberg AJ. Principles of plasma discharger and materials processing. In: SEGUNDA ED. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
 108. Adamovich I, Baalrud S, Bogaerts A, Bruggerman P, Capelli M, Colombo V, et al. The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology. *J Phys D Appl Phys*. 2017;50(32).
 109. Moisan M, Barbeau J, Crevier M-C, Pelletier J, Philip N, Saoudi B. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl Chem*. 2007;74(3):349–58.
 110. Adler S, Scherrer M, Daschner FD. Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *J Hosp Infect*. 1998;40(2):125–34.
 111. Niemira BA. Cold Plasma Reduction of Salmonella and Escherichia coli O157: H7 on Almonds Using Ambient Pressure Gases. *J Food Sci*. 2012;77(3):171–5.
 112. Critzer FJ, Kelly-Wintenberg K, South SL, Golden DA. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. *J Food Prot*. 2007;70(10):2290–6.
 113. Noriega E, Shama G, Laca A, Díaz M, Kong MG. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. *Food Microbiol*. 2011;28(7):1293–300.
 114. Misra NN, Moiseev T, Patil S, Pankaj SK, Bourke P, Mosnier JP, et al. Cold plasma in modified atmospheres for post-harvest treatment of strawberries. *Food bioprocess Technol*. 2014;7(10):3045–54.
 115. Patil S, Moiseev T, Misra NN, Cullen PJ, Mosnier JP, Keener KM, et al. Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package. *J Hosp Infect* [Internet]. 2014;88(3):162–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.08.009>
 116. Muranyi P, Wunderlich J, Heise M. Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. *J Appl Microbiol*. 2008;104(6):1659–66.
 117. Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S, Ye X. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes : A review. *Food Control* [Internet]. 2017;75:83–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>

118. Hähnel M, Von Woedtke T, Weltmann KD. Influence of the air humidity on the reduction of *Bacillus* spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3–4):244–9.
119. Winter J, Wende K, Masur K, Iseni S, Dünnbier M, Hammer M, et al. Feed gas humidity : a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells. 2013;295401.
120. Niemira BA, Boyd G, Sites J. Cold Plasma Rapid Decontamination of Food Contact Surfaces Contaminated with *Salmonella* Biofilms. 2014;
121. Yusupov M, Bogaerts A, Huygh S, Snoeckx R, van Duin A, Neyts E. Plasma-Induced Destruction of Bacterial Cell Wall Components : A Reactive Molecular Dynamics Simulation Plasma-Induced Destruction of Bacterial Cell Wall Components : A Reactive Molecular Dynamics Simulation. 2013;(August).
122. Lu H, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma : influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. 2013.
123. Mogul R, Chan SL, Trent JD, Bol'shakov AA, Stevens RM, et al. Impact of low-temperature plasmas on *Deinococcus radiodurans* and biomolecules. *Biotechnol Prog.* 2003;19(3):776–83.
124. Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Sci Technol.* 2004;37(4):453–60.
125. Lee K, Paek K, Ju W-T, Lee Y. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol* [Internet]. 2006;44(3):269–75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820756>
126. In H, Lee H, Park S, Park J, Choe W, Jung S, et al. Flexible thin-layer plasma inactivation of bacteria and mold survival in beef jerky packaging and its effects on the meat ' s physicochemical properties. *MESC* [Internet]. 2017;123:151–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.016>

