

Simposio 2017 Center for Produce Safety (CPS) – Aprendizajes Clave

Escrito por el Dr. Bob Whitaker Director de Ciencia y Tecnología de Produce Marketing Association

RESUMEN

La comunidad de investigación en inocuidad de frutas y verduras se reunió en el octavo simposio anual de investigación del Centro para Inocuidad de Frutas y Verduras (CPS, por sus siglas en inglés), para analizar cómo se pueden utilizar los datos para desarrollar programas de inocuidad de alimentos basados en ciencia y análisis de riesgos para empresas de frutas y verduras a lo largo de la cadena de abastecimiento.

La interpretación de los resultados de investigaciones en inocuidad de los alimentos y la aplicación a empresas individuales es tarea de aquellos que están en esas operaciones específicas. Con esto en mente, destacamos los aprendizajes clave del Simposio de Investigación de CPS para crear conciencia y estimular el pensamiento.

El Simposio más reciente de CPS fue especial pues marcó el décimo aniversario de la fundación de CPS en mayo de 2007. En este simposio los participantes pudieron echar un vistazo atrás a la última década y reflexionar sobre lo lejos que hemos llegado como industria en nuestro empeño por aumentar nuestra base de conocimiento en inocuidad, y convertir ese conocimiento en prácticas efectivas y operacionales de inocuidad para frutas y verduras. Los puntos destacados del programa 2017 fueron:



- El agua para uso agrícola sigue siendo un tema importante y un área de enfoque para hacer investigación. Si bien *E. coli* genérico puede ser un indicador efectivo de contaminación en sistemas de riego cerrados, como los que se utilizan en la producción de verduras de hoja verde en algunas áreas del estado de California en EE.UU., se ha demostrado que no predice la presencia de patógenos humanos en otros sistemas de irrigación incluyendo sistemas para protección contra heladas.
- Una consideración importante en la selección de organismos indicadores o sustitutos y la determinación de su supervivencia en fuentes de agua abiertas son las propiedades físicas y químicas del sistema de agua en sí.

- Aumentar el volumen de muestreo cuando se prueba la calidad microbiana del agua de riego aumenta la oportunidad de detectar contaminación de patógenos de bajo nivel.
- Es importante que identifique sus fuentes de riego o de agua de protección contra heladas. El entorno en el que se encuentra, el potencial de escorrentía, el pH, la temperatura y la forma en la que se aplica el agua al cultivo y cuándo todos estos pueden afectar el potencial de riesgo de contaminación.
- Podría ser momento de admitir que las fuentes de agua de riego pueden contaminarse periódicamente con patógenos y que podríamos poner nuestros esfuerzos en desarrollar métodos para eliminar los patógenos antes de la aplicación.
- Enfoques de aplicación general para determinar la disminución de las tasas de crecimiento de patógenos, aunque deseables, es muy probable que no sean útiles desde el punto de vista operativo. La disminución de patógenos puede verse afectada por muchas variables que están presentes en el entorno y es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor cómo se pueden emplear.
- Los sistemas de lavado reforzados con desinfectantes controlados adecuadamente y con agitación física, pueden reducir significativamente los niveles de patógenos en los mangos frescos. Existen retos para asegurar el diseño del sistema, el saneamiento y la preservación de la calidad de la fruta, pero la combinación de investigación en inocuidad de frutas y verduras y la reducción puede aprovecharse con la práctica a través de la ingeniería de sistemas para mejorar los sistemas actuales.
- La inocuidad de frutas y verduras es una actividad que tiene que desarrollarse a lo largo de toda la cadena de suministro. La selección de materiales para sanitización, desde el campo hasta el autoservicio, es fundamental para reducir el riesgo de contaminación cruzada
- Al diseñar los estudios de validación para dar cumplimiento a Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA, por sus siglas en inglés) es importante que diseñe sus estudios para que se tome en cuenta el estado fisiológico del patógeno, sustituto o cepa indicadora que se está utilizando. Las condiciones de crecimiento y los medios empleados pueden afectar la capacidad del organismo para resistir y/o ser más susceptible al tratamiento que desea emplear para controlar a los organismos.
- En su primera década CPS ha logrado mucho; aparte de construir una base de conocimiento impresionante, su logro más importante fue crear un ambiente para discusiones abiertas y francas sobre ciencia en inocuidad de frutas y verduras que ha fomentado la colaboración entre científicos, facilitado la asociación con operadores de la industria y brindado inspiración a la próxima generación de investigadores en inocuidad de frutas y verduras.

Lo más Destacado del Simposio de Investigación CPS 2017:

1. La medición de la calidad microbiana del agua agrícola continúa siendo un tema de investigación importante para la industria de frutas y verduras. Un tema recurrente en las prioridades de investigación del CPS ha sido la calidad del agua para uso agrícola, así como los posibles riesgos de contaminación cruzada por diversas fuentes de agua para uso agrícola y cómo hacer pruebas de manera más efectiva a esas fuentes de agua para determinar si deberían usarse o cómo podría aplicarse para reducir los riesgos de contaminación de patógenos. Tradicionalmente, la industria realiza pruebas al agua de riego o al agua para protección contra heladas usando un indicador para *E. coli* genérico. Esta práctica adquirió importancia cuando los productores de vegetales de hoja verde del estado de California en EE.UU. adoptaron parámetros específicos para el agua de riego derivados de los estándares de la Environmental Protection Agency (EPA, por sus siglas en inglés) [para aguas que se utilizan para fines recreativos](#) establecidos en el 2007 por la EPA tras el brote de enfermedades relacionadas con *E. coli* O157:H7 que se remontaron a espinacas en 2006. La medición de *E. coli* genérica como indicador de la calidad del agua de riego sigue siendo una piedra angular para los agricultores de vegetales de hoja verde de los estados de [California](#) y [Arizona](#) en EE.UU., medición que realizan como parte de sus acuerdos de comercialización. Sin embargo, muchos otros programas de inocuidad alimentaria de productos básicos y uno de los requisitos de la regla para frutas y vegetales ([Produce Rule](#)) de la Ley FSMA, y una mayor identificación de las fuentes de agua para irrigación de diferentes cultivos en diferentes entornos, sugieren que *E. coli* genérico no es directamente indicativo de la presencia de patógenos (ver la [Lista de Galardonados de CPS](#) para investigación financiada en este tema). Durante el Simposio 2017 la base de conocimiento se enriqueció con datos nuevos.

Investigación Presentada:

- **La búsqueda de indicadores de calidad del agua y organismos de indexación continúa.** Kelly Bright (University of Arizona) describió sus esfuerzos para [identificar nuevos organismos de indexación para determinar los riesgos de contaminación fecal en aguas para riego](#). Se tomaron muestras de canales, embalses y laterales en dos condados de del estado de Arizona con niveles históricamente altos y bajos de contaminación fecal. También se midieron las características físicas de los sistemas de riego para determinar cómo la temperatura, la turbidez, el pH y otros factores podrían afectar las poblaciones microbianas en estas aguas y la supervivencia de patógenos humanos (si están presentes) y de organismos cuya presencia podría correlacionarse con estos patógenos.

Aprendizajes clave:

La trayectoria para reemplazar o encontrar organismos indicadores alternativos para aumentar la prueba genérica de *E. coli* o para encontrar organismos indexadores más confiables, cuya presencia pueda correlacionarse directamente con la presencia de



patógenos humanos en aguas agrícolas continúa.

Actualmente, la FDA está reevaluando la medición de *E. coli* genérico dentro del contexto de la regla para frutas y vegetales "Produce Rule" de la Ley FSMA. En este sentido [CPS ha coordinado un coloquio](#) para determinar la comparabilidad de varios métodos microbianos para medir *E. coli* genérico como alternativas al requisito de prueba de la FDA usando el método M1603 de la EPA y se continúa

investigando para identificar organismos de indexación verdaderos. Si bien la investigación de la Dra. Bright no es completa, su enfoque de utilizar secuenciación genómica de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) y comparar los resultados con los resultados de cultivo puede permitir la identificación de organismos de indexación, específicos a una ubicación o a una fuente de agua, que se puedan correlacionar más directamente con patógenos humanos. En este sentido NGS puede ser una herramienta poderosa para generar datos más detallados sobre el bioma microbiano en distintas muestras ambientales. El componente notable del trabajo del Dr. Bright, además del uso de NGS, es que la búsqueda es específica para una fuente de agua. Un tema recurrente en la historia de la inocuidad para frutas y verduras es que los enfoques de "solución única para todos los casos" no parecen funcionar bien. Si bien la medición de *E. coli* genérico parece muy adecuada para los productores de verduras de hoja verde del estado de California, donde el agua de riego proviene de pozos profundos y la presencia de un patógeno humano es altamente improbable, la detección de un indicador fecal como *E. coli* genérico indicaría una violación en la integridad de los sistemas. En otras áreas de producción con diferentes productos y sistemas alternativos de suministro de agua, se ha demostrado que *E. coli* genérico no es claramente un indicador apropiado. En el futuro inmediato, los agricultores no cuentan con un conjunto de herramientas completo para la toma de decisiones sobre la calidad del agua. En ausencia de verdaderos organismos de indexación, los agricultores deben definir y caracterizar sus fuentes de agua de riego o de protección contra heladas utilizando medidas de *E. coli* genérico para monitorear variaciones que puedan reflejar cambios en la calidad de la fuente de agua (por ejemplo, lluvia, intrusión de animales, etc.), entendiendo las implicaciones del sistema de suministro de agua utilizado; por ejemplo, el método de aplicación (aspersores, surcos, goteo, etc.) y la

exposición de las porciones comestibles del producto al agua de riego, y basándose en la disminución de las tasas de crecimiento de patógenos de acuerdo a la normativa de la FDA que calculan una [tasa de disminución de patógenos](#) de 0.5 log por día para lograr el cumplimiento y administrar los riesgos de contaminación cruzada.

Investigación Presentada:

Los volúmenes de muestra son de importancia crítica para la detección. Si bien el enfoque del muestreo del agua de riego a menudo está en la elección del indicador y el método de detección; de igual importancia son los procedimientos de muestreo empleados. Típicamente, las muestras de agua de riego se recogen en volúmenes de 1 litro o "muestra simple" en una frecuencia determinada para su análisis. Mia Mattioli del Centers for Disease Control and Prevention (CDC, por sus siglas en inglés) informó sobre su [trabajo para mejorar los métodos de muestreo y prueba para el agua de riego](#). Ella utilizó "dead-end ultrafiltration" o ultrafiltración sin salida (DEUF, por sus siglas en inglés) un método de recolección que se usa generalmente para determinar la calidad del agua potable. Este método permite la filtración de mayores volúmenes de agua para detectar bajos niveles de contaminación por patógenos. Después de recolectar y analizar muestras DEUF de 50 litros y bolsas de 1 litro de muestra simple, se demostró que DEUF es más efectivo que las muestras simples para detectar patógenos e indicadores en bajas concentraciones. DEUF también resultó valioso en la determinación de marcadores para el seguimiento de fuentes microbianas. El uso de DEUF para el muestreo también permitió la detección de niveles bajos de *Salmonella*, colifagos, *Cryptosporidium* y Bacteroides. De hecho, la capacidad de analizar muestras más grandes de agua con DEUF permitió hacer correlaciones entre la detección de posibles indicadores como enterococos y colifago con *Salmonella*. Fundamentalmente, el objetivo del Dr. Mattioli es utilizar este método de muestreo DEUF mejorado para medir el impacto de las condiciones ambientales en la calidad del agua de riego. Después de eventos de lluvia, los niveles genéricos de *E. coli*, enterococos y colifagos aumentaron, pero no los niveles de *Salmonella*. Aunque se observaron niveles genéricos de *E. coli* por encima de la medida de 126 MPN/100 ml bajo la normativa de FSMA, esta detección no se asoció con la detección de *Salmonella*.



Aprendizajes Clave:

Este trabajo confirma lo que entendemos conceptualmente; es decir, que el uso de un tamaño de muestra más grande es importante cuando se trata de detectar patógenos humanos que están presentes en concentraciones muy bajas. Al aumentar el tamaño de la muestra de "muestra simple" de 1 litro a muestra DEUF de 50 litros, aumentan las posibilidades de encontrar contaminación de bajo nivel. Para los agricultores que buscan caracterizar sus fuentes de agua de riego, DEUF representa una mejora y un reto. Usar DEUF significa cambiar la práctica de tomar muestras más familiar y menos costosa. También significa que las posibilidades de encontrar patógenos humanos (si están presentes) son más altas; lo que significa que los agricultores deben tener un plan para cuando se encuentren "positivos" y estar preparados para tomar acciones correctivas (por ejemplo, usar fuentes de agua alternativas, ajustar el riego para permitir el uso de las disposiciones para disminución la tasa de crecimiento de patógenos -"disminución de patógenos", implementar métodos de riego alternativos que limiten contacto con el producto, etc.). El beneficio es que los riesgos de contaminación de riego se pueden manejar proactivamente con mejor información y, por lo tanto, el riesgo para el negocio de los agricultores y para los clientes se puede manejar de manera más efectiva. La observación de que indicadores, como enterococos y colifago, pueden correlacionarse con *Salmonella* también ofrece oportunidades para utilizar estos organismos como organismos indicadores para el patógeno dependiendo de la fuente y la ubicación del agua. Por último, utilizando el muestreo DEUF no se observaron correlaciones entre la detección de *E. coli* genérico y la detección de *Salmonella*, y se agregó a la base de datos que *E. coli* genérico no es un indicador de *Salmonella* (véase arriba).

Investigación Presentada:

Identifique sus fuentes de agua para administrar mejor los riesgos de contaminación cruzada. En muchas áreas de cultivo en el mundo, el agua es un recurso precioso y, a veces escaso, que requiere conservación y reutilización, siempre que sea posible. Por ejemplo, los agricultores del estado de California en EE.UU. que tienen estrictos requisitos de uso de agua de riego, cuestionaron si sería posible reutilizar agua de escorrentía (comúnmente conocida en inglés como "tail water") que viene del mismo campo de cultivo o de riegos agrícolas de otros predios, y que se ha recolectado en drenes o en estanques, dependiendo de la infraestructura de riego. Michael Cahn (University of California, Cooperative Extension) llevó a cabo un estudio para [determinar los riesgos por contaminación microbiana al reutilizar agua de escorrentía en la producción de verduras de hoja verde](#). En la caracterización de estanques de agua de escorrentía, los parámetros de agua microbiológicos, químicos y físicos fueron medidos de forma rutinaria por el equipo de Michael Cahn. Los niveles de *E. coli* excedieron la métrica del California Leafy Green

Products Handler Marketing Agreement (LGMA, por sus siglas en inglés) de 126 UFC / 100 ml en 8% de las muestras de agua de riego (en pozos y estanques dentro del campo de cultivo) y en 20% de las muestras de agua escorrentía en estanque. Una de 96 muestras fue STEC positivo y no se encontraron muestras positivas para *Salmonella*. Químicamente, frecuentemente las muestras de agua de escorrentía estuvieron por arriba de pH 8.5 mientras que el agua potable en la región típicamente tiene un pH de alrededor de 7.5. El pH elevado niega la eficacia de los desinfectantes a base de cloro en el agua debido a las limitaciones en la formación de cloro libre. Cuando se usaron *Salmonella* o *E. coli* O157: H7 para inocular muestras de agua de escorrentía, la supervivencia disminuyó 3-5 log en 7 días.

Aprendizajes Clave:

Es importante conocer la fuente y el entorno alrededor de las fuentes de agua utilizadas para el riego de frutas y verduras. Cahn y su equipo encontraron que las diferencias entre los sitios, por ejemplo, el clima, la fuente del agua, y las prácticas agrícolas influyen fuertemente en la química y la microbiología de las aguas de escorrentía o “tail water”. Aunado a eso, la información de trabajos previos, financiados por CPS, relacionados con la interacción de animales con agua en estanques, y el agua de escorrentía proveniente de tierras adyacentes, indican que el potencial de cambios en la población microbiana del agua de escorrentía en estanques en el transcurso de una temporada de cultivo puede ser ilimitado. Es más probable la presencia de patógenos humanos en estanques de recolección de agua de escorrentía, en diferentes momentos durante una temporada de cultivo, aunque el presente trabajo identificó solo una muestra de un poco menos de un centenar en la región de la costa central del estado de California. El pensamiento convencional siempre ha sido que la naturaleza abierta del agua de escorrentía probablemente representa un riesgo mayor que las fuentes de agua cerradas como pozos, y los datos presentados aquí lo confirman. Al final, cualquier fuente de agua utilizada debe estar bien caracterizada microbiológica y químicamente y los riesgos de contaminación cruzada se evalúan en función de cuándo se usa el agua, cómo se aplica al cultivo y el intervalo entre la aplicación y la cosecha.



Investigación Presentada:

Podría ser momento de admitir que las fuentes superficiales de riego pueden estar contaminadas, y nuestros esfuerzos se emplean mejor en el desarrollo de soluciones de limpieza de agua. ¿Qué sucede si las pruebas de calidad microbiana indican que el agua es inadecuada para su uso en cultivos? En la actualidad, si se identifican problemas, el agua generalmente se trata con productos químicos antimicrobianos y el uso de estos productos químicos con el tiempo pueden tener un impacto adverso en el medio ambiente y tal vez incluso en la salud humana. Ana Allende (CEBAS-CSIC, España) presentó su trabajo dirigido al desarrollo de [tratamientos de agua prácticos para la agricultura, efectivos y ambientalmente sostenibles para "reparar" fuentes de agua de riego](#) que excedan los criterios microbianos establecidos utilizables para cultivos. La investigación demuestra que el dióxido de cloro se puede usar para tratar el agua para uso agrícola de manera efectiva, a la vez que protege el medio ambiente cuando se aplica en campos abiertos y en invernaderos. Estudios piloto demostraron que los niveles de *E. coli* pueden controlarse consistentemente en función de la concentración de dióxido de cloro y el tiempo de exposición, y se desarrolló un modelo matemático para tratamientos a nivel de campo que revela que 0.25 ppm residual de dióxido de cloro tuvo éxito manteniendo los niveles de *E. coli* por debajo del nivel de 126 UFC / 100 ml establecido en la regla para frutas y vegetales "Produce Rule" de la Ley FSMA y en otros esquemas de inocuidad de alimentos. Sin embargo, se debe lograr un equilibrio delicado. Los datos indican que, si bien el dióxido de cloro es eficaz para reducir las poblaciones microbianas en el agua de riego, el proceso de desinfección también afecta la microbiota natural de la planta y puede dar lugar a la formación de subproductos de clorato en los tejidos de las hojas verdes. El control sobre la concentración de dióxido de cloro utilizado en la desinfección del agua de riego puede reducir los residuos de clorito. Un producto clave del programa de investigación es un modelo matemático para ayudar a los agricultores a determinar los niveles adecuados de uso.

Aprendizajes Clave:

El trabajo de Allende es importante en dos maneras: (1) proporciona a los agricultores una herramienta rudimentaria para utilizar un desinfectante para tratar el agua de riego si esta excede los criterios de aceptación estipulados por la regla para frutas y vegetales/"Produce Rule" de FSMA u otras normas de inocuidad alimentaria y (2) acepta tácitamente que bajo ciertas condiciones, o en lugares específicos, las fuentes de agua de riego van a exceder los criterios microbianos, y que los agricultores deben tener herramientas que les ayuden a cumplir con los requisitos. En la última década, la mayoría de las investigaciones sobre agua de riego se centraron en el desarrollo de métodos de detección de indicadores más selectivos y sensibles, la caracterización microbiana de posibles fuentes de agua o cuencas hidrográficas, el impacto ambiental en la calidad microbiana de las fuentes de agua, en la aplicación de métodos para examinar el potencial de contaminación cruzada del agua de

riego, y en encontrar más microorganismos de indexación correlativos para reemplazar el indicador *E. coli* genérico para determinar la calidad microbiana. Nuestro conjunto de conocimientos actuales nos dice que no existen indicadores u organismos de indexación "perfectos", que si nos fijamos bien podemos encontrar excedentes o incluso patógenos en muchas fuentes de agua para riego, especialmente en fuentes de agua abiertas; y que si bien los patógenos mueren rápidamente en la superficie de las frutas o verduras, es probable que no disminuyan a cero. Por lo tanto, es imperativo que desarrollemos protocolos para mejorar la calidad del agua de riego para reducir los riesgos de contaminación cruzada. El trabajo de Allende proporciona a los agricultores una herramienta rudimentaria que permite el control del agua de riego a nivel de campo o invernadero. En trabajo previo de Kniel [utilizando limaduras de chatarra de hierro para filtrar y unir patógenos humanos en el agua](#) es otro método que se ha demostrado, a escala de laboratorio, [que tiene el potencial de eliminar los patógenos humanos de las fuentes de agua de riego](#). En gran parte, la brecha de conocimiento que existe tiene que ver con la manera de manejar las escalas. En otras palabras, ¿cómo pasamos de una prueba de laboratorio o de campo a una escala comercial? ¿Cómo se puede desinfectar el agua de riego a una velocidad que permita irrigar un área de siembra de 20 acres de manera oportuna? Claramente, esta convergencia de investigación e ingeniería es el siguiente reto para reducir los riesgos de contaminación cruzada por agua de riego a nivel de campo.

2. Disminución de la tasa de crecimiento de patógenos: ¿es un umbral seguro o es área que requiere más investigación? La regulación para frutas y vegetales (Produce Rule) de la Ley FSMA brinda a los agricultores una opción que se puede utilizar cuando los niveles de *E. coli* genérico, en aguas de riego, que se usan en contacto directo con la porción comestible del cultivo, no cumplen con la media geométrica de 126 MPN/100 ml y tampoco con el valor umbral estadístico de 410 UFC/100 ml de *E. coli* genérico. La regulación de la FDA establece una tasa de disminución o de extinción de 0.5 log por día, entre la última irrigación y la cosecha, en no más de cuatro días. Esta "zona segura" está basada en varios estudios de investigación que demuestran la rápida disminución o extinción de patógenos humanos cuando los organismos se encuentran expuestos a las condiciones relativamente rigurosas de los campos utilizados para el cultivo de frutas y verduras. Por ejemplo, los primeros experimentos llevados a cabo en el Valle de Salinas de California en EE.UU. usando cepas atenuadas de *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 produjeron una [disminución rápida](#), de modo que la recuperación de bacterias vivas solo fue posible utilizando métodos de enriquecimiento [después de dos días](#).

Investigación Presentada:

Un enfoque único aplicable a todos los umbrales de disminución de patógenos puede requerir de más investigación.

Eduardo Gutiérrez-Rodríguez del North Carolina State University presentó los resultados de su trabajo para determinar si la tasa de disminución bacteriana de [0.5 log por día, establecida en la regulación para frutas y vegetales \(Produce Rule\) de la Ley FSMA, es suficiente](#). En su estudio Gutiérrez-Rodríguez utilizó dos cultivos, fresas y cilantro, en el estado de North Carolina en EE.UU. en donde los tratamientos postcosecha no están disponibles comúnmente. En ambos cultivos, el agua de uso agrícola entra en contacto con las partes

comestibles de la planta; el riego por aspersión se usa comúnmente en cilantro cerca de la temporada de cosecha y cuando las condiciones justifican su aplicación, el agua también se usa en las fresas para la protección contra las heladas. El trabajo también examinó la eficacia del uso de desinfectantes químicos en



las superficies de la planta para reducir el patógeno inoculado y la persistencia de sustitutos antes de la cosecha. Los cultivos, en invernadero, de fresa y cilantro se inocularon con *E. coli* O157, con STEC (no-O157) y con supuestas cepas sustitutas de STEC. Cuatro días después se aplicó hipoclorito de sodio (comúnmente llamado "cloro o lejía" a 100 ppm), ácido peracético (también conocido como ácido peroxiacético o PAA a 40 ppm) y agua estéril, y se midió la presencia de patógenos. Los datos muestran que los tratamientos químicos en las concentraciones utilizadas solo tuvieron una eficacia marginal en la reducción de la supervivencia y la persistencia de *E. coli* O157: H7, STEC (no-O157), bacterias sustituto y *E. coli* genérico en ambos cultivos. Las tasas de mortalidad de los patógenos y sustitutos utilizados en estos experimentos están relacionadas al tipo de cepa y a la concentración. Las tasas de disminución bacteriana variaron entre 0.09 y 1.5 unidades formadoras de colonias (UFC) por día independientemente del patógeno utilizado. Las tasas de decremento de bacterias, ocho días después de la inoculación, no se ajustaron al modelo lineal propuesto en la regla para frutas y vegetales (Produce Rule) de la Ley FSMA. El investigador concluye que la tasa de disminución de bacterias propuesta por la FDA (0.5 log/día durante cuatro días o 2.0 log total) necesita revisión adicional ya que puede no que no esté dando la protección necesaria para proteger la salud pública si la contaminación patógena ocurre a través del riego o de aplicaciones de riego para protección contra heladas dentro de los cuatro días de la cosecha.

Aprendizajes Clave:

Cuando se desarrolló la regla para frutas y vegetales (Produce Rule) de la Ley FSMA, la FDA reconoció que la calidad microbiana del agua de riego puede ser regional y estacionalmente variable, y que una lectura superior al estándar de 126 UFC/100 ml de *E. coli* genérico es probable que ocurra periódicamente y no es necesariamente un riesgo para la salud pública. También se dieron cuenta que la aplicación de agua de riego o de protección contra heladas cerca de la temporada de cosecha es algo común. El balance de estas realidades actuales con los reportes rutinarios de tasas de disminución rápidas de patógenos humanos, cuando estos patógenos están expuestos a ambientes de producción de frutas y vegetales, originó el umbral de 0.5 log/día en un período de no más de cuatro días desde la aplicación hasta la cosecha. Los datos presentados aquí sugieren que la tasa de disminución no es constante y que es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor la disminución de patógenos en los entornos de producción. Durante la sesión de preguntas en el Simposio de CPS el investigador comentó que los experimentos se realizaron en invernaderos debido al uso de patógenos humanos y a la necesidad de mantenerlos aislados del entorno. La disminución de patógenos humanos en condiciones de campo se debe indudablemente a una combinación de factores que incluyen la temperatura, la desecación y a la falta de fuentes de carbono o nitrógeno disponibles para los microorganismos. Ciertamente, un ambiente de invernadero puede ser muy diferente a un entorno de producción en campo abierto, entre otras razones el recubrimiento de vidrio o plástico filtra algunos de los rayos UV del sol que son un enemigo natural de la supervivencia bacteriana. Estos experimentos señalan dos lecciones críticas para los productores de frutas y verduras: (1) una regla de aplicación general para la disminución en la tasa de crecimiento; aunque esté bien intencionada, no siempre va a ser suficiente para garantizar la eliminación de *E. coli* genérico o de patógenos humanos dadas las múltiples y diversas condiciones de producción en las que se cultiva y cosecha, y (2) es importante entender y tomar en cuenta los protocolos experimentales al evaluar datos de investigación.

Para que quede claro, el equipo de investigación ejecutó bien su proyecto y siguió procedimientos establecidos institucionalmente diseñados para prevenir una liberación potencial al entorno de cultivo de patógenos humanos peligrosos. Al hacer esto, probablemente se redujeron fuentes importantes que contribuyen a la disminución de patógenos; por ejemplo, el viento que contribuye a la desecación, y la luz solar. El uso de investigación en inocuidad alimentaria para desarrollar programas efectivos tiene que ver con más que solo leer trabajos de investigación o escuchar presentaciones; requiere de comprometerse con la ciencia y cuestionar los resultados para comprender mejor cómo se aplican y si son o no aplicables en su operación. Las preguntas que surgen de este trabajo indudablemente impulsarán esfuerzos adicionales para estudiar la regla de la tasa de disminución bacteriana, y su aplicación en diversos sistemas de producción.

3. Los puntos de contaminación cruzada y persistencia de patógenos ya no se limitan al campo de cultivo. Parece que la mayoría de las investigaciones sobre inocuidad alimentaria se han centrado en estudios de campo sobre persistencia y movimiento de patógenos en el entorno de producción, evaluaciones de riesgos de insumos agrícolas, como modificación del suelo y agua de riego, transferencia de patógenos de animales silvestres y domesticados y posibles puntos de contaminación durante la cosecha del cultivo. En el Simposio de CPS 2017, vimos un enfoque algo diferente en el sentido de que la investigación se enfocó más en toda la cadena de abastecimiento, desde las empacadoras hasta la exhibición en los autoservicios. Estos estudios sirven para respaldar el argumento de que la inocuidad de los alimentos es una responsabilidad de la cadena de abastecimiento desde la selección del campo hasta la mesa del consumidor.

Investigación Presentada:

Están surgiendo tendencias en el manejo postcosecha que afectan a varios productos básicos o procesados. Michelle Danyluk (University of Florida) [describió algunos aspectos de su trabajo sobre la introducción, destino y mitigación de patógenos transmitidos por contaminación de alimentos en mangos](#), en varios puntos de la cadena de abastecimiento.



El equipo de Danyluk investigó si la *Salmonella* puede "lavarse" de las superficies del mango. En estos experimentos, los mangos enteros se inocularon con *Salmonella* y se lavaron con agua o con hipoclorito de sodio (100 ppm), ácido peroxiacético (80 ppm) y dióxido de cloro (5 ppm) en líneas con rodillos o cepillos

de PVC. Igual [que en reportes para otros productos](#), en el estudio de Danyluk el tiempo de contacto prolongado (60 segundos) y el restregado mecánico de la superficie de la fruta con cepillos resultaron más efectivos en la reducción de la presencia de *Salmonella* (> 4 logs). El equipo de Danyluk también examinó la supervivencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y STEC y el potencial de crecimiento en mangos recién cortados. El tejido de mango se inoculó con agentes patógenos y se mantuvo a 40 ° F, 54 ° F y 68 ° F y se monitoreó a lo largo del tiempo. Tanto a 40 ° F como a 54 ° F, las poblaciones de *L. monocytogenes* se mantuvieron estables y declinaron lentamente después de 14 días. Al tercer día 68 ° F, *L. monocytogenes* aumentó a 0.6 log UFC/g antes de comenzar una disminución lenta. Las poblaciones de *Salmonella* (a 54°F y 68°F) y STEC (a 68°F) aumentaron más significativamente que *L. monocytogenes* con el aumento de temperatura, lo que indica que estos patógenos representan un mayor riesgo para los mangos recién cortados si la cadena de abastecimiento no está bien controlada.

Aprendizajes Clave:

La agitación física combinada con suficiente tiempo de contacto con los desinfectantes puede reducir significativamente la *Salmonella* de las superficies de mango entero. El uso de algún tipo de agitación, para ayudar a desalojar los patógenos de las superficies de las frutas, ha sido reportado previamente para tomate. Liberar las bacterias de las superficies de frutas las hace más accesibles al desinfectante y mejora la eficiencia del sistema de lavado. Mary Anne Amalaradjou (University of Connecticut) también reportó los resultados de [sus evaluaciones de desinfectantes de agua de lavado para eliminar la contaminación cruzada en los sistemas de lavado](#). Al analizar tanto el hipoclorito de sodio como el ácido peroxiacético, descubrió que 200 ppm de cloro y 80 ppm de PAA eran eficaces para prevenir la contaminación cruzada en los tratamientos con agua caliente, tanques de descarga e hidrogenfriado, siempre que se manejen las cargas orgánicas en el agua y los tiempos de contacto adecuados. No hubo diferencias basadas en el genotipo del mango. Así que se presentaron resultados de apoyo por ambos grupos de investigación centrados en el mango resurgiendo temas comúnmente reportados para otros productos; concentraciones adecuadas de desinfectante y tiempos de contacto, agitación para optimizar, control de la carga orgánica para evitar la inactivación de desinfectantes y la necesidad de prácticas efectivas de manejo del sistema para reducir las poblaciones de patógenos superficiales y evitar riesgos de contaminación cruzada de fruta a agua y de agua a fruta. La investigación en sistemas de lavado en cualquier producto solo se puede poner en la práctica comercial cuando los resultados piloto o de laboratorio a escala se puedan reproducir en sistemas de escala comercial en condiciones de proceso comunes; y en eso radica el reto a medida que avanzamos. Implementar un sistema de lavado que, por ejemplo, dependa de la agitación de un cepillo, representa un desafío de ingeniería y operación pues se tiene que crear un sistema de lavado integrado que opere a velocidades comerciales, que permita que los cepillos sean efectivos para desalojar a los microorganismos de la superficie sin dañar la fruta, que garantice los niveles adecuados de sanitizante para matar a los microorganismos que se quitaron de la superficie para que no representen una amenaza de contaminación cruzada, y que también permita monitorear y manejar la calidad del agua y que se permita hacer correcciones para preservar la eficacia del desinfectante. Viendo hacia el futuro, claramente existe la necesidad universal de hacer esta conexión entre la investigación en agua de lavado y la ingeniería de sistemas hacia el futuro.

Los experimentos de Danyluk de inoculación de patógenos en mangos recién cortados resaltan otro aprendizaje clave. Los resultados confirman que el control de la es crítico para la inocuidad de las frutas recién cortadas. Todos los patógenos estudiados crecieron a temperaturas elevadas, pero *L. monocytogenes* fue mucho menos resistente que Salmonella o STEC. La tasa de crecimiento de *Salmonella* spp. en este trabajo es consistente con la conclusión de que *Salmonella* es un peligro de contaminación cruzada de mayor importancia en el mango recién cortado que *L. monocytogenes*.



Investigación Presentada:

Es importante considerar a todas las superficies que están en contacto con los alimentos como posibles puntos de contaminación cruzada, desde el campo hasta el autoservicio. Laura Strawn (Virginia Tech University) habló de su trabajo sobre [sitios potenciales para transferencia de Salmonella o Listeria monocytogenes a melón cantalupo](#) en varios puntos de contacto al empacar la fruta en el campo o cuando se exhibe en los autoservicios. En general, los tiempos de contacto más cortos y las superficies lisas dieron como resultado una menor transferencia bacteriana. Los guantes de hule tuvieron tasas más altas de transferencia de *Salmonella*, independientemente del tiempo de contacto o la presión. En estudios anteriores realizados por [Danyluk](#) y [MacLandsborough](#) se demostró que los guantes de hule en el trabajo facilitan la transferencia de patógenos. En el entorno minorista, se probaron siete superficies en contacto con alimentos para *Listeria* spp., *E. coli* genérico, coliformes y se utilizó el método de recuento total de placas aeróbicas (APC, por sus siglas en inglés) para la estimación del número de bacterias. En cinco de las siete superficies de contacto probadas *Listeria* spp. estuvo presente (nota: ningún punto de contacto resultó positivo para *L. monocytogenes*), aunque la espuma de acolchonamiento en los exhibidores para melón cantalupo en los autoservicios se encontraron frecuentemente contaminados con *Listeria* spp. Los recuentos APC aumentaron en las exhibiciones de melón desde la mañana hasta el cierre de la tienda, lo que tal vez refleja el manejo por parte del consumidor a lo largo del día.

Aprendizajes Clave:

Históricamente, la investigación en inocuidad de frutas y verduras se ha centrado en el campo, el empaque y nivel de procesamiento, y realmente no se ha extendido más allá del momento en que el camión abandona la planta de producción. Siempre hemos sabido que la inocuidad alimentaria es responsabilidad de toda la cadena de abastecimiento.

Intuitivamente sabemos que además de la contaminación que puede darse en la producción, también hay otras oportunidades para la contaminación cruzada de frutas y verduras frescas. El trabajo descrito por Strawn respalda con datos nuestro conocimiento intuitivo. Más específicamente, los resultados de este trabajo hablan de la importancia de conocer los tipos de materiales que utilizamos cuando transportamos, clasificamos, empacamos o cuando exhibimos frutas y verduras frescas sin empaque. Hemos notado un cambio en la industria hacia equipos de acero inoxidable y mejores superficies que están en contacto con el producto, pero hay quienes todavía usan materiales que son difíciles de limpiar y desinfectar (por ejemplo, madera, plásticos, acero y hule espuma) y que ponen riesgo la inocuidad del producto. Con frecuencia se trata de equipos heredados y su uso es simplemente una cuestión de desconocimiento por parte del usuario sobre los riesgos para la inocuidad de los alimentos o sobre los costos reales para actualizar los equipos viejos. En ocasiones, los materiales para acolchonar como el hule espuma, como se observó en este trabajo, se emplea para proteger a las frutas delicadas de magulladuras; una solución práctica que probablemente ya es obsoleta dado nuestro entendimiento sobre el saneamiento de los equipos y la transferencia de agentes patógenos.



4. **¿Cómo sabe si sus controles preventivos realmente funcionan?** Una de las preguntas clave a la que se enfrentan las empresas que implementan controles preventivos de inocuidad alimenticia es; ¿funcionarán estas medidas, es decir, controlarán el riesgo de contaminación microbiana? Ya sea la eficacia del desinfectante, asegurar el compostaje apropiado para el acondicionamiento del suelo o si su desinfectante de agua de lavado es efectivo; es importante (y requisito reglamentario) validar que el tratamiento sea efectivo y verificar el uso diario del control preventivo.

Investigación Presentada:

En el Simposio Xiuping Jiang (Clemson University) presentó su trabajo centrado en [validar un proceso de tratamiento térmico para reducir *Salmonella* Senftenberg en los lechos o camas para aves de corral](#), Bradley Marks (Michigan State University) describió su trabajo para validar un método [para reducir *Salmonella* en pistaches utilizando un proceso de pasteurización](#) y Qin Wang (University of Maryland) presentó su trabajo sobre la [validación de los niveles de cloro en los sistemas de agua de lavado para reducir los eventos de contaminación cruzada](#). Los proyectos de Jiang y Marks utilizaron una cepa bacteriana sustituta (*Enterococcus faecium*), es decir, una cepa de bacterias no patógenas que pueden

utilizar los expertos en inocuidad alimentaria de la industria y científicos de investigación para demostrar que el proceso que están usando para eliminar la *Salmonella* es efectivo. El proyecto de Julie Meyer (University of Florida) describió [el desarrollo de un sustituto avirulento de *Salmonella*](#) en el que la desactivación de aminoácidos específicos y genes de lipopolisacáridos limita el crecimiento del organismo.

En los últimos años en los simposios de CPS un tema frecuente de discusión ha sido el desarrollo y uso de sustitutos de patógenos, ya que nuestro enfoque se ha centrado en la validación de controles preventivos. El trabajo presentado en el 2017 fue un claro ejemplo de cómo los sustitutos pueden utilizarse efectivamente para validar procesos o tratamientos. El proyecto de Wang realmente toma un ángulo diferente en la validación porque el trabajo se realizó en un laboratorio para que un patógeno humano; en este caso, *E. coli* O157: H7 pudiera ser utilizado con seguridad y se definieron medidas químicas (concentraciones de cloro, pH, carga orgánica, tiempo de contacto, etc.) que describen concentraciones suficientes de cloro libre (10 ppm para una mortalidad de 5 log en agua pura) para asegurar la destrucción de células de patógenos vivos. Wang concluyó que la carga orgánica reduce los niveles de cloro libre; un resultado logrado por muchos otros investigadores, los cuales juntos son necesarios para prevenir la contaminación cruzada.

Martin Wiedmann (Cornell University) discutió [la importancia del estado fisiológico de un patógeno o un sustituto al realizar estudios de validación](#). Hasta el momento los resultados de esta extensión de investigación sustitutiva indican que el estado fisiológico puede ser al menos tan importante como la diversidad de cepas en la realización de estudios de validación. Las condiciones de crecimiento de los patógenos, sustitutos, indicadores u organismos de indexación influyen en su capacidad para sobrevivir a los tratamientos diseñados para eliminarlos. Por ejemplo, el Dr. Wiedmann descubrió que había una diferencia de 4 log en la reducción de patógenos usando PAA cuando el medio de cultivo inducía estrés salino. Extrapolado de nuevo a la cuestión de estudios de validación, las condiciones de crecimiento previas al tratamiento deben ser bien comprendidas para garantizar una medición adecuada de la efectividad del tratamiento.

Aprendizajes Clave:

La identificación y caracterización de sustitutos para uso en estudios de validación realizados en entornos de producción sigue siendo un objetivo de investigación importante para nuestra industria. Se han identificado sustitutos adecuados para aplicaciones específicas y la búsqueda sigue. Los enfoques alternativos que utilizan medidas más indirectas como el recuento de placas aeróbicas (APC), el uso de patógenos auténticos en entornos de laboratorio controlados y la información en la literatura científica también se pueden emplear en cierta medida. Claramente, la investigación presentada en el Simposio de CPS 2017 hizo notar que antes del tratamiento de control es vital considerar las condiciones de crecimiento del organismo utilizado para estudios de validación. Uno puede

imaginar el desarrollo de una "guía" donde se enumeren sustitutos específicos, indicadores u organismos de indexación junto con las condiciones de crecimiento para ayudar en la ejecución de futuros estudios de validación. Mientras tanto, es importante conocer la relación entre la eficacia de los controles preventivos y la preparación del inóculo bacteriano utilizado para los experimentos.

5. Hemos avanzado mucho en los últimos 10 años, pero todavía nos falta mucho camino por recorrer. Es bueno mirar a los primeros 10 años de existencia de CPS y pensar en los avances logrados en el camino. CPS fue fundada en el 2007 porque la industria reconoció que simplemente no tenía los conocimientos científicos necesarios para entender: cómo los patógenos humanos llegaban a los entornos de producción de frutas y verduras, qué les permitía persistir en esos entornos y qué se podría hacer para reducir o eliminarlos. En 10 años CPS se ha convertido en un punto focal para el desarrollo de una base de conocimientos con los que se han impulsado regulaciones de inocuidad de alimentos más informadas. Este conocimiento también ha permitido a todos los interesados de la industria y desarrollar programas más sofisticados de inocuidad alimentaria basados en riesgos y ciencia. Algunas observaciones del Simposio de CPS 2017:

- **Tenemos una industria más informada y conocedora.** Profesionales de todos los sectores de la industria; agricultores, empaques, procesadores, minoristas y proveedores de servicios de alimentación participaron en paneles de discusión para hablar sobre lo que ha logrado CPS y los retos que persisten. De manera franca y abierta hablaron de la ciencia en inocuidad de frutas y verduras, cómo es y cómo puede aplicarse en las operaciones diarias. Diez años atrás, la discusión habría sido casi imposible porque todavía había cierto aire de negación en muchos sectores de la industria y las mejores prácticas se basaban principalmente en la intuición en lugar de la evidencia experimental.

- **La colaboración mejora la calidad de nuestro conocimiento.** Muchos de los proyectos de investigación presentados fueron el resultado de colaboración entre investigadores universitarios y toda la cadena de abastecimiento de la industria de frutas y verduras. Por ejemplo, conocimos estudios

para detectar *L. monocytogenes* en empaques en las zonas 1 y 2 en donde se contó con el apoyo total de los operadores de las empaques, y estudios sobre el movimiento de patógenos a lo largo de toda la cadena de abastecimiento, incluyendo estudios realizados a nivel de minorista.

Ciertamente todavía existen



muchos problemas cuando se realiza experimentación en operaciones reales. Sin embargo, la industria necesita ese conocimiento, las relaciones establecidas entre investigadores y operadores de la industria, y la credibilidad de CPS como una organización que puede conectar a los participantes y definir objetivos de aprendizaje. Lo que ha logrado CPS es algo que hace una década solo se podía imaginar.

• **La próxima generación de científicos está preparada para cambiar nuestra industria.** La participación de estudiantes de pregrado y posgrado en el Simposio de CPS siempre ha sido un motivo de orgullo. En 10 años hemos visto el crecimiento profesional de los estudiantes. Por ejemplo, hemos visto estudiantes que manejaban los micrófonos para los participantes pasar por programas de investigación financiados por CPS para obtener su titulación, encontrar trabajo en universidades, y luego solicitar y recibir fondos de investigación de CPS para aumentar aún más la base de conocimientos en inocuidad alimentaria de la industria. Sin duda, la experiencia de estar en contacto con profesionales de la industria de frutas y verduras ha influido en su formación y han obtenido información para sus proyectos de investigación. Para nuestra industria los beneficios a largo plazo van a ser profundos. CPS ha ayudado a crear una comunidad de científicos, dedicados a la investigación de inocuidad alimentaria, que comprenden cuáles son los desafíos y oportunidades de la inocuidad alimentaria de nuestra industria que pueden ayudarnos a abordar nuestras necesidades futuras.

• **Lo que sabemos hoy nos permite hacer mejores preguntas.** La lista de proyectos de investigación financiados, completados y comunicados en la última década es impresionante. Estos se pueden encontrar en el [sitio web de CPS](#). El Simposio de CPS es una gran oportunidad para aprender lo último en investigación en inocuidad de frutas y verduras y un lugar donde los líderes de la industria pueden analizar cómo esa ciencia puede aplicarse a las operaciones diarias. Pero va mucho más allá que eso. Con cada inversión que CPS realiza en investigación y con cada proyecto completado que se agrega a la base de conocimiento de inocuidad de frutas y verduras crece nuestro entendimiento y nuestra capacidad de hacer mejores preguntas a la comunidad investigadora y a nosotros mismos. Algunos se sienten frustrados porque "la investigación solo lleva a más investigación". Tienen razón, pero su frustración puede estar fuera de lugar. Por ejemplo, cuando se fundó CPS en 2007 y la investigación comenzó en 2008, la creencia común en toda la cadena de abastecimiento era que lavando las frutas y verduras eliminaba los patógenos contaminantes de la superficie de los productos. De hecho, en 2013, CPS realizó una conferencia especial sobre [agua de lavado](#), el sentimiento predominante era que los sistemas de lavado que empleaban desinfectantes destruían los patógenos contaminantes. ¿Pero realmente lo hacían? Investigación financiada por CPS para abordar esa cuestión demostró claramente que ese no era el caso y que el lavado podría reducir las poblaciones microbianas superficiales en 1-2 logs (un resultado que muchos operadores también han obtenido). Con ese conocimiento a la mano, se podrían plantear mejores preguntas a la comunidad investigadora por ejemplo, ¿cómo pueden los operadores reducir aún más las

poblaciones microbianas superficiales?, ¿por qué son tan difíciles de eliminar las bacterias?, ¿cómo funcionan realmente los desinfectantes de lavado?, ¿hay químicos que podrían ser mejores?, ¿cómo afectan los desinfectantes la fisiología de los patógenos?, ¿cuáles son las medidas físicas y químicas que pueden usarse para monitorear la eficacia del sistema de lavado? entre otras preguntas. En los últimos años cada pregunta se ha convertido en una línea de investigación y los resultados de estos programas han ampliado nuestra comprensión de aplicaciones de agua de lavado, y han proporcionado a los interesados el conocimiento que necesitan para mejorar sus propias operaciones. Si bien la investigación a menudo genera más investigación, a medida que aprendemos más podemos centrar la investigación para abordar mejor los retos de inocuidad en frutas y verduras que están en constante evolución y que enfrentamos para sostener e impulsar nuestros negocios.

Agradecimientos: El autor desea agradecer a Bonnie Fernandez-Fenaroli, Directora Ejecutiva de CPS, al Consejo de Administración de CPS y al comité técnico de CPS por su compromiso con la inocuidad de las frutas y verduras, a los científicos que participaron en el séptimo Simposio Anual de Investigación de CSP y a los representantes de la industria que ofrecieron voluntariamente su tiempo para participar en el Simposio. La presentación de su investigación y la discusión de lo que la investigación podría significar para la industria de frutas y verduras ciertamente enriquece el contenido de este documento. Se pueden encontrar más detalles sobre estos proyectos de investigación en www.centerforproducesafety.org. El autor también quiere agradecer a Susan Lehman y Diane Wetherington de IDS por tomar notas durante las presentaciones y la preparación del borrador original para este documento. Finalmente, deseo agradecer a Cyndi Neal, Gerente de Contenido del equipo de Ciencia y Tecnología de PMA por su esfuerzo en dar formato a este documento y hacer todo lo necesario para publicar este trabajo.

Nota: Este trabajo tiene la intención de informar y provocar pensamiento con el objetivo de inspirar a los lectores a examinar sus propios programas de inocuidad alimentaria y utilizar la investigación para hacer mejoras. Este documento pretende ser una directiva sobre lo que se debe hacer para producir alimentos seguros. Como se discutió en varias partes de este documento, las necesidades de inocuidad de frutas y verduras se determinan en función de la operación; no hay soluciones únicas para todas las necesidades. Si tiene preguntas adicionales, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Bob Whitaker Director de Ciencia y Tecnología de Produce Marketing Association (bwhitaker@pma.com).