UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

POSGRADO EN PROTECCION VEGETAL

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Salmonella* y *Escherichia coli* EN CAMPOS Y EMPAQUES DE FRUTILLAS Y HORTALIZAS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
DIRECCION GENERAL ACADEMIC.
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALE

PRESENTA:

MARISOL MORA ROMÁN

Chapingo, México, Junio de 2015.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Salmonella* Y *Escherichia coli* EN CAMPOS Y EMPAQUES DE FRUTILLAS Y HORTALIZAS

Tesis realizada por Marisol Mora Román bajo la dirección del Dr. Marcelo Acosta Ramos y codirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, aprobada por el Comité Asesor indicado y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR: _____

Dr. Marcelo Acosta Ramos

CO-DIRECTOR: _____

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR: _____

Dr. Samuel Ramírez Alarcón

Chapingo, México. Junio de 2015.

DEDICATORIA

A mi Gran familia quienes me apoyaron cuando los he necesitado, los quiero mucho.

A todos los que me brindaron su confianza para realizar este trabajo, pues cada escalón es un logro más en la vida.

A dios por permitirme vivir y darme fuerzas para seguir adelante.

Al amor de mi vida, quien estuvo conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, por haber permitido realizar mi maestría.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento.

A Dios por permitirme lograr una meta más en mi camino.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos y la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por dirigir la presente investigación, por su confianza, sabiduría y su amistad.

Al Dr Samuel Ramírez Alarcón por su colaboración y asesoría durante en este presente trabajo.

A mis compañeros y amigos que no hace falta mencionarlos ya que saben lo importante que son para mí al apoyarme siempre que los necesité.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en Cojumatlán de Regules Michoacán el 21 de enero de 1989, estudió la primaria en la escuela "Colegio Heliodoro Moreno" de la misma comunidad. Los estudios de secundaria los realizó en la Escuela Secundaria Federal 1er de Mayo de la misma comunidad.

El bachillerato lo realizó en el CETIS 121 en la comunidad de Sahuayo Michoacán. La Licenciatura la curso en la Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, en Sahuayo Michoacán y tiene el título de Licenciado en Genómica Alimentaria. Sus estudios de Maestría en Protección Vegetal fueron en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Salmonella* Y *Escherichia coli* EN CAMPOS Y EMPAQUES DE FRUTILLAS Y HORTALIZAS

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Salmonella* AND *Escherichia coli* IN FIELDS AND PACKAGING OF FRUITS AND VEGETABLES

Marisol Mora Román [1], Marcelo Acosta Ramos[2] y Ernestina Valadez Moctezuma [3]

Resumen

La inocuidad de los alimentos constituye un requisito básico para los consumidores. *Salmonella y Escherichia coli* (*E. coli*) se han visto implicadas en brotes de enfermedades por el consumo de frutas y hortalizas frescas esto ha afectado lazos comerciales y cierres de fronteras. Con el objetivo de identificar especies de *Salmonella* y *E. coli* cultural y molecularmente, presentes en heces fecales de animales domésticos y silvestres; en agua para la aplicación de insumos de protección vegetal, riego, y agua para el lavado de manos en las unidades de producción y empaques de frutillas y hortalizas en los estados de Michoacán, Guanajuato y Colima, se realizaron dos muestreos de acuerdo a los procedimientos de la NOM 014-SSA1-1993. Las muestras fueron tomadas de agua (pozos, membranas y tinas), y heces fecales de animales; estas se llevaron al laboratorio para aislarlas en medio Mac Conkey (MCA); después se realizó la extracción de DNA, y la amplificación los fragmentos de DNA de los genes 16S, invA y toxina Shiga, posteriormente se hicieron agrupaciones de bacterias por RFLPs. Se detectó a *E. coli* en un 64% y a *Salmonella* en un 50% del total de muestras aisladas en medio MCA; Los resultados de los RFLPs demostraron que el 11% de total de las muestras pertenece a *Salmonella* y el 31%. *E.coli*.

Palabras clave: Inocuidad, *Salmonella*, *Escherichia coli*, RFLPs.

Abstract

Food safety is a basic requirement for consumers. *Salmonella* and *Escherichia coli* (*E. coli*) have been implicated in outbreaks of disease by the consumption of fresh fruits and vegetables. This has affected commercial ties and border closures. With the objective of identifying species of *Salmonella* and *E. coli* culture and molecularly, that are present in feces of domestic and wild animals; in water for application of inputs of plant protection, irrigation, and water for hand washing in the units of production and packaging of strawberries and vegetables in the states of Michoacán, Guanajuato and Colima, two samplings were carried out according to the procedures of the NOM 014-SSA1-1993. Samples were taken from water sources (wells, membranes and tubs), and feces of animals; the samples were taken to the laboratory; subsequently isolated via Mac Conkey (MCA); And then performed the extraction of DNA, and amplification fragments of DNA 16S genes, invA and Shiga toxin, subsequently became groups of bacteria by RFLPs. It was detected in *E. coli* in a 64% and *Salmonella* in 50% of the total samples isolated via MCA; the results of the RFLPs showed that 11% of total samples belongs to *Salmonella* and 31 %. *E. coli*.

Key words: food safety, *Salmonella*, *Escherichia coli*, RFLPs.

1 Tesista

2 Director

3 Co-director

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA…….....	**iii**
AGRADECIMIENTOS…….	**iv**
DATOS BIOGRÁFICOS……...	**v**
RESUMEN……...	**vi**
ABSTRACT……	**vi**
ÍNDICE……	**vii**
LISTA DE CUADROS……...	**xi**
LISTA DE FIGURAS……	**xiii**
I. INTRODUCCIÓN……...	**1**
1.1 OBJETIVOS……...	3
1.2 HIPÓTESIS…….	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA……	**5**
2.1 Origen y principios de la inocuidad alimentaria…….	5
2.2 Definiciones de inocuidad alimentaria……	10
2.3 La inocuidad alimentaria en México……...	11
2.4 Las barreras técnicas al comercio y la inocuidad alimentaria…….	13
2.5 Estudios de caso y cierre de fronteras por hortalizas producidas en México..	13
2.6 Principios esenciales para la reducción de riesgos microbianos en frutas y hortalizas frescas……...	14

2.7 Importancia y calidad del agua dentro del proceso agrícola……... 16

2.8 Importantica de la producción y exportación de los cultivos de jitomate, papaya y frutillas……... 17

2.8.1 Cultivo de jitomate……... 17

2.8.2 Cultivo de papaya……. 19

2.8.3 Cultivo de frutillas……... 20

2.9 Principales características de los organismos de importancia en los alimentos……... 21

2.9.1 Técnicas para la clasificación de las bacterias……. 21

2.9.2 Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos…….. 23

2.10 *Salmonella*……. 24

2.10.1 Características de *Salmonella*…… 24

2.10.2 Serovariedades……... 25

2.10.3 Ciclo biológico de *Salmonella*…….. 28

2.10.4 Transmisión, síntomas y cuadros clínicos de *Salmonella*…….... 29

2.11 *Escherichia coli*…… 30

2.11.1 Características de *E. coli*…… 30

2.11.2 Ciclo biológico……... 31

2.11.3 Grupos de *E. coli*…… 32

2.12 Impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por *Salmonella* y *E. coli*…… 37

2.13 Enfermedades trasmitidas por bacterias presentes en animales…… 38

III. MATERIALES Y MÉTODOS…… 41

3.1 Ubicación de las unidades de producción……... 41

3.2 Selección y muestreo de las unidades de producción…… 41

3.3 Áreas seleccionadas para muestrear…… 42

3.3.1Primer muestreo…… 42

3.3.2 Segundo muestreo…… 43

3.4 Procesamiento de las muestras obtenidas en el primer muestreo……... 45

3.4.1 Toma de muestras de aguas en campos y empaques……... 45

3.4.1.1 Muestreo directo…… 45

3.4.1.2 Muestreo en cuerpo de agua superficial…… 46

3.4.1.3 Muestreo en pozo profundo…….. 46

3.4.1.4 Manejo de las muestras…….. 47

3.4.1.5 Colecta de heces fecales en animales…… 47

3.4.1.6 Procesamiento de las muestras…….. 48

3.5 Procesamiento de las muestras obtenidas en el segundo muestreo……. 49

3.5.1 Toma de muestras de aguas en campos y empaques……... 49

3.5.1.1 Muestreo directo……... 49

3.5.1.2 Muestreo en cuerpo de agua superficial…… 49

3.5.1.3 Muestreo en pozo profundo…….. 49

3.5.1.4 Manejo de las muestras……. 50

3.5.1.5 Colecta de heces fecales en animales…… 50

3.5.1.6 Procesamiento de las muestras…….. 51

3.6 Análisis de las bacterias…….. 51

3.7 Conservación de las bacterias……. 52

3.8 Extracción de ADN……..…….. 53

3.9 Cuantificación y calidad del DNA.……. 53

3.10 Amplificación de fragmentos (PCR)…… 54

3.11 FRLP (Corte con enzimas de restricción)……. 56

3.11.1 Gel de acrilamida……... 57

3.12 Análisis estadístico de fragmentos RFLPs y construcción de dendogramas de las bacterias……...……... 58

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….. 60

4.1. Detección de *Salmonella* y *E. coli* en medio de cultivo MCA……. 60

4.2. Detección molecular de *Salmonella* y *E. coli*…… 62

4.2.1 Calidad y cantidad de DNA……. 62

4.2.2 PCR…….. 65

4.2.2.1 Identificación de las bacterias mediante el gen 16S……. 65

4.2.2.2 Identificación de Salmonella mediante el gen Inva…….. 68

4.2.2.3 Identificación del serotipo *E. coli* O157:H7 mediante el gen de la toxina Shiga……... 71

4.3 Corroboración molecular de *Salmonella* y *E. coli* con RFLPs…….. 75

V. CONCLUSIONES…….. 82

VI. LITERATURA CITADA……. 85

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Cierre de frontera para México debido a la presencia de bacterias en vegetales (FDA, 2002; Carranza, 2010; FDA, 2010)…….. 14

Cuadro 2. Producción de jitomate por estado en 2012 (SHCP, 2014)…… 18

Cuadro 3. Serovariedades o serovares o serotipos de salmonelas más frecuentemente implicadas en brotes de salmonelosis transmitida por los alimentos y su clasificación de acuerdo al esquema de Kauffmann-White 2006. 25

Cuadro 4. Tipos o categorías de cepas humanas de *E. coli* enterovirulento, serogrupos incluidos en cada uno antígeno(s) H asociados (Nataro y Kaper, 1998)……. 36

Cuadro 5. Puntos de muestreo localizados dentro de las unidades de producción y empaques del 25 al 27 de agosto del 2013…….. 42

Cuadro 6. Puntos de muestreo localizados dentro de las unidades de producción y empaque del 17 y 18 de diciembre del 2013…….. 43

Cuadro 7. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers 8F y U1942R……. 54

Cuadro 8. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers Salm3 y Salm4……. 55

Cuadro 9. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers SK7 y SK8……. 56

Cuadro 10. Corte con enzimas de restricción EcoRI, SmaI y HhaI del Gen 16S en *Salmonella* y *E. coli*……. 57

Cuadro 11. Las reacciones de RFLS se realizaron con un volumen final de 20 µL…… 57

Cuadro 12. Preparación para una placa de 60 mL……... 58

Cuadro 13. Presencia y/o ausencia de *E. coli* y *Salmonella*, en las muestras de agua y heces fecales tomadas en las diferentes unidades de producción…….. 61

Cuadro 14. Resultados obtenidos del nanodrop…….. 62

Cuadro 15. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 6 y 7……... 67

Cuadro 16. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 8, 9, y 10…… 70

Cuadro 17. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 11, 12, 13 y 14……... 74

Cuadro 18. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 13, 14, 15 y 16……..... 78

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. a) Agua para aplicación de fungicidas foliar, b) agua de cisterna para riego c) Agua para lavado de manos d) Animales presentes en los cultivos de frutillas e) agua de pozo profundo f) Heces fecales presentes en la parcela de jitomate……..…… 47

Figura 2. a) Muestras de agua, b) aislamiento de las muestras, c) Colonias de *E. coli*, y d) colonias de *Salmonella*.……...…….. 48

Figura 3. a) Agua de pozo profundo b) Agua para aplicación de fungicidas foliar c) Agua de membrana d) Agua para lavado de manos..……. 50

Figura 4. a) Aislamiento de las muestras de agua. b) aislamiento de las muestras de heces de animales c) Colonias de *Salmonella* d) colonias de *Salmonella* y *E.coli* e) colonias de *E.coli*…… 51

Figura 5. a) Colonias de *Salmonella*, b) colonias de *Salmonella* y *E.coli*, c) colonias de *E.coli*……. 52

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores 8 F y U1492R para la amplificación del gen 16S.……...……. 66

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores 8 F y U1492R para la amplificación del gen 16S…….. 66

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*…… 69

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado; sin embargo se observan otros fragmentos que más o menos están dentro del rango…….. 69

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado; sin embargo se observan otros fragmentos que más o menos están dentro del rango…….. 70

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SK7 y SK8 para la amplificación del gen de la toxina Shiga en *E. coli* O157:H7. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado…….……..... 73

Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SK7 y SK8 para la amplificación del gen de la toxina Shiga…….. 73

Figura 13. Perfiles RFLP del gen 16S, con la enzima HhaI separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 3, 4, 5, 10, 26, 27 y 38 marcados con un el rectángulo, indican la presencia de E. coli en función de

los perfiles esperados (cuadro 10)……. 76

Figura 14. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *Hha*I e inicio de perfiles con *EcoR*I separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Este gel no nos indica la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en función de los perfiles esperados (cuadro 10)…….. 76

Figura 15. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *EcoR*I he inicio de perfiles con *Sma*I, separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 1, 2 3, 4 y 5 marcados con un el rectángulo, indican la presencia de *E. coli* en función de los perfiles esperados (cuadro 10). 77

Figura 16. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *Sma*I, separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 21, 28 y 29 marcados con un el rectángulo amarillo, indican la presencia de *Salmonella* en función de los perfiles esperados (cuadro 10); los carriles 22, 23, 34, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 y 61 marcados con un el rectángulo rojo, indican la presencia de *Salmonella* en función de los perfiles esperados (cuadro 10)…….. 77

Figura 17. Dendograma realizado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hha*I, *Sma*I y *EcoR*I……... 81

I. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos constituye actualmente un requisito básico requerido por los consumidores y bajo la cual sustentan su criterio de compra, ya que identifican que la ausencia de ésta, puede generar efectos adversos en su salud. Esta característica se convierte en un rasgo diferenciador y de competitividad en los mercados de los productos mexicanos con repercusiones en el sector productivo agropecuario, acuícola y pesquero en el territorio nacional (DGIAAP, 2010).

Esta exigencia implica que las unidades productivas generadoras de los productos deban demostrar que, durante el proceso productivo aplicaron medidas preventivas para reducir las posibilidades de que los productos se contaminen por agentes de tipo biológico, químico y/o físico (DGIAAP, 2010).

Los microorganismos transmitidos por los alimentos como bacterias, virus y parásitos son frecuentemente conocidos como riesgos biológicos (FAO, 1998); estos patógenos forman parte del medio ambiente y pueden contaminar fácilmente las frutas y hortalizas si no se manipulan adecuadamente antes del consumo, esta contaminación puede transmitirse a través de malas prácticas de producción y manipulación, como la aplicación de abono sin tratar, el uso de agua de riego contaminada, prácticas de manipulación no sanitarias y un mal manejo de animales (FDA, 2002).

Un amplio número de patógenos bacterianos se ha visto implicado en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociados al consumo de frutas y hortalizas

frescas (Beuchat, 1998), dentro de los más importantes encontramos a *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella* (FDA, 2002), estos brotes han puesto en riesgo a la salud de los consumidores en los mercados nacionales e internacionales, afectando lazos comerciales y cierres de fronteras, tal es el caso del melón Cantaloupe, donde 95 empaques exportaban en el 2002 y solo 5 en el 2010, ocasionando pérdidas de 67.3 mdd (Carranza, 2010).

La detección de contaminantes en los alimentos de todo tipo genera grandes pérdidas, como: el retiro del producto del mercado, la detención de la distribución del producto; siendo estos objeto de revisiones exhaustivas. El impacto económico es muy importante, ya que se tiene que gastar en costos del retiro del producto, teniéndose una imagen negativa del mismo y del país productor, un pago de litigios o resarcir daños y retrasos en los tiempos de ingreso al mercado (Carranza, 2010). Así como pérdidas millonarias en la captación de divisas y fuentes de empleo para México.

Con base en lo anterior, sería de gran valía analizar e identificar cultural y molecularmente los riesgos biológicos procedentes de heces fecales de animales domésticos y silvestres, así como algunos riesgos biológicos presentes en el agua que se usa en los proceso de producción, debido a que en ella se pueden encontrar diferentes especies o serotipos de *Salmonella* y *E. coli*; La identificación de las características morfológicas solas de estas dos bacterias son de uso limitado una identificación detallada, ya que las bacterias presentan escasa diferenciación salvo a que sean de forma bacilar o cocoides, y que crezcan como células aisladas o en grupos característicos, pero ahora los sistemas de identificación se basaban principalmente en pruebas bioquímicas y más recientemente, se comprobó que algunas técnicas de microbiología molecular son

útiles para estudiar el parentesco entre grupos de bacterias relacionados taxonómicamente (Mossel *et al*., 2006).

Con base en lo anterior se realizó la presente investigación con los siguientes:

1.1 OBJETIVOS

Identificar especies de *Salmonella* y *Escherichia coli* cultural y molecularmente, presentes en heces fecales de animales domésticos y silvestres; en agua para la aplicación de insumos de protección vegetal, riego, y lavado de manos en las unidades de producción y empaques de frutillas y hortalizas.

Objetivos específicos

Diagnosticar cultural y molecularmente a *Salmonella* y *Escherichia coli*, presentes en animales domésticos y silvestres con incidencia en las unidades de producción y empaques de frutillas y hortalizas en los estados de Michoacán, Guanajuato y Colima.

Diagnosticar cultural y molecularmente a *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en aguas para la aplicación de insumos de protección vegetal, riego, y lavado de manos en las unidades de producción y empaques de frutillas y hortalizas los estados de Michoacán, Guanajuato y Colima.

1.2 HIPÓTESIS

Al menos en una unidad de producción y empaque de frutillas y hortalizas en los estados de Michoacán, Guanajuato y Colima, se corroborará la presencia de *Salmonella* y *E. coli*, en las heces fecales de animales domésticos y silvestres.

Al menos en una unidad de producción y empaque de frutillas y hortalizas los estados de Michoacán, Guanajuato y Colima se identificarán serotipos de *Salmonella* y *E. coli*.

Al menos una unidad de producción de frutillas y hortalizas y/o empaque de los estados de estados de Michoacán, Guanajuato y Colima estarán libres de riesgos biológicos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y principios de la inocuidad alimentaria

El consumo de frutas y vegetales frescos puede implicar riesgos de graves consecuencias a la salud humana y a la vida misma. Por ejemplo, la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos podría llevar al desarrollo de cáncer; la existencia de ciertos tipos de patógenos podría ocasionar la muerte del consumidor en poco tiempo, y consumir productos con presencia de vidrios podría ocasionar problemas de salud de forma inmediata, entre otros (Jawetz, 1977). Los consumidores norteamericanos percibieron estos riesgos como un problema fuerte originado por la importación de productos contaminados, por lo tanto, generaron presión para limitar dichas importaciones. Pese a que es imposible poner en la mesa del consumidor alimentos que estén 100% libres de este tipo de riesgos (FDA, 1998), es viable reducirlos considerablemente mediante la implementación eficiente de buenas prácticas agrícolas (BPA´s) (Irueste, 1999). El Gobierno de EE. UU contaba con 12 agencias primarias y 35 estatutos para la regulación de la seguridad alimentaria, todas ellas trabajando de manera desarticulada. Para dar una respuesta satisfactoria a los consumidores, se estableció un esfuerzo coordinado para abordar de manera global e integral el problema y no solo atender el caso de alimentos importados; sin olvidar que la inocuidad alimentaria (i.a.) debe estar soportada en bases científicas y respaldada por una regulación actualizada. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA), desde 1998, ha desarrollado sistemas de detección de microorganismos contaminantes en hortalizas. Además, implementó medidas tendientes a limitar el uso de plaguicidas, y proporciona asesoría a agencias de gobierno, tiendas, instituciones y restaurantes. También está buscando la colaboración

del Congreso de Protección Alimenticia (Conference for Food Protection), consorcios de organismos gubernamentales estatales, locales y federales, académicos, consumidores e industria, para trabajar a nivel minorista (FDA, 1998). También se están organizando programas de información educativa, como la campaña "Fight Back" (Lucha Contra la Bacteria), dirigida a los consumidores para promover los buenos hábitos de manejo de los alimentos, con el objetivo de evitar contaminación (FDA, 1998).

Esta nueva forma de concebir el proceso de la producción de alimentos ha tomado por sorpresa a muchos países que son netamente exportadores de productos agrícolas (Gurría, 1999), y se convierte en una barrera técnica de comercio (Avendaño, 2004). Hay quienes afirman que estamos sujetos a los caprichos de los consumidores de los países altamente desarrollados. Sin embargo, se debe reconocer el derecho que tienen los consumidores para comprar alimentos con las características que ellos prefieran. En consecuencia los países exportadores, se deben ajustar a dichas exigencias y tratar de colocar sus productos en forma rápida y con un valor agregado (Gurría, 1999).

Pese a que es imposible que todas las unidades productivas puedan responder a este reto, no es conveniente quedarse rezagado de los grandes mercados agrícolas; en caso contrario se reduciría de manera significativa la captación de divisas, y países como México sufrirían graves consecuencias en su economía. Sin duda alguna, la implementación de estrictos programas de reducción de riesgos implica gastos económicos importantes que no podrían sufragar los pequeños productores no organizados. Afortunadamente, este costo adicional es recuperable y los problemas iniciales de producción se podrían subsanar mediante la implementación de asistencia gubernamental que estimule una producción agrícola con otra mentalidad. Ante este

nuevo reto, es impostergable la necesidad de que productores, investigadores y entidades gubernamentales unan sus esfuerzos para apoyar a la mayor cantidad de unidades de producción, para que en el menor tiempo posible se integren a esta nueva forma de producir (Guzmán, 2001).

Con la finalidad de enfrentar de manera integral y eficiente, el riesgo inherente al consumo de frutas y vegetales frescos, los EE. UU., se ha apoyado en los avances que se tienen en la industria pesquera y de la carne para: a) identificar los puntos de riesgo crítico, b) caracterizar esos riesgos, c) implementar medidas estrictas que garanticen que los alimentos que se ponen en la mesa del consumidor, estén prácticamente exentos de riesgos a la salud (Guzmán, 2001).

Los puntos críticos y riesgos se detectaron en cultivos en el campo, empaque y distribución de los alimentos. En consecuencia se consideró necesario que todas estas etapas de la cadena productiva participaran en los programas de inocuidad, exentando así de la responsabilidad absoluta de los productos importados, tal como, los consumidores norteamericanos conciben el problema. La aparición de focos de infección por consumir alimentos contaminados y que han afectado a grandes sectores de la población, ha generado la plataforma para la implementación de programas de inocuidad (Almonte, 1999). A consecuencia de esto, y a la presión de los medios masivos de comunicación, la industria alimentaria establece un sistema de controles preventivos y se crea, en 1993, una comisión de evaluación por encomienda del Gobierno de los EE. UU. (Anónimo, 1998b). Desafortunadamente, existe la preocupación de que esta presión legítima de los países avanzados pueda eventualmente traducirse en medidas de

represión política para los países cuyo bienestar económico depende de las exportaciones de productos agrícolas.

Posteriormente, surgieron otras acciones tendientes a reforzar a la inocuidad alimentaria. En 1994 el "Centro para el Control y Prevención de Enfermedades" instrumentó un programa estratégico para detectar, prevenir y controlar brotes de enfermedades infecciosas. En Agosto de ese mismo año se firmó la ley para la protección de calidad alimenticia. En enero de 1997, el presidente estadounidense Bill Clinton anunció el "Sistema de Alerta Temprana", que pretende prevenir y controlar el surgimiento de enfermedades debidas al consumo de alimentos en mal estado (Almonte, 1999).

En un discurso, el Presidente Clinton anunció una "Iniciativa de Seguridad Alimentaria" (Food Safety Iniciative) para mejorar la seguridad del abastecimiento de alimentos del país (Anónimo, 1997b). En mayo de 1997, como parte de dicha iniciativa presidencial, los Departamentos de Salud y Servicios Sociales (DHHS), Agricultura (USDA) y la agencia de protección ambiental (EPA), presentaron ante el presidente un informe en el que expresaban su preocupación por el tema de las frutas y vegetales (Anónimo, 1997a). La iniciativa del presidente Clínton conocida como "Inocuidad Alimentaria del Campo a la Mesa", para elevar el nivel de confiabilidad de los alimentos que se consumen, conllevó meses más tarde a una iniciativa de ley, con el propósito de "Asegurar la Inocuidad de los Productos Hortícolas y Frutícolas del país e importados" (Anónimo, 1999a; Almonte, 1999).

Como parte de esta iniciativa, el Presidente Clinton giró instrucciones a la Secretaría de Salud y Servicio Social, para que junto con el Secretario de Agricultura y la comunidad

agrícola, expidieran guías sobre lo que constituyen las buenas prácticas agrícolas (BPA´s, o Good Agricultural Practices, GAP), y buenas prácticas de manufactura (BPM´s o Good Manufacturing Practices, GPM) en el caso de las frutas y vegetales frescos (Anónimo, 1997d). Como respuesta a la orden presidencial, el 13 de abril de 1998, la FDA publicó las guías voluntarias para que el público las revisara y las analizara; todos los comentarios se recibieron antes del 29 de junio de ese mismo año. El presidente estadounidense instruyó a los titulares de los ministerios de Salud y Agricultura para que, en coordinación con los productores de frutas y hortalizas, desarrollaran las "guías voluntarias", en donde se establecieran las BPA y BPM (Almonte, 1999).

El 10 de junio de 1998, los Secretarios de Agricultura y Salud de México, firmaron con sus homólogos estadounidenses, en el marco de la Reunión Binacional México-EE. UU, la "Declaración Conjunta sobre Inocuidad Alimentaria". En ésta se establecio el interés de ambos gobiernos de trabajar coordinadamente para lograr la inocuidad en todos los alimentos, y minimizar la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de productos agroalimentarios (Anónimo, 1999a).

El 30 de Octubre de 1998 la FDA y el USDA publicaron en el Diario Oficial de los EE.UU (Federal Register), la "Guía para Reducir los Riesgos Microbiológicos, con el objeto de lograr la Inocuidad Alimentaria en Frutas y Hortalizas Frescas" (Anónimo, 1999a). Esta guía es uno de los primeros pasos de la iniciativa para mejorar la seguridad de frutas y vegetales en su paso del campo a la mesa.

2.2 Definiciones de inocuidad alimentaria

Para controlar estos riesgos se ha concebido el término “inocuidad alimentaria (i.a)” la cual se define como “conjunto de prácticas que minimizan los riesgos físicos (vidrios, plásticos, pedazos de metal, etc.), químicos (agroquímicos, metales pesados, aditivos, contaminantes ambientales, residuos de fármacos utilizados en animales, etc.) y biológicos (microorganismos patógenos y toxinas) inherentes al consumo de frutas y hortalizas frescas”. Este término engloba actividades que van desde el campo de cultivo, transporte, almacenamiento y terminan cuando el consumidor tiene el producto agrícola en su mesa. De esta manera se asegura que el consumidor puede confiar en los alimentos que compra (Garza, 1999).

Entre las principales definiciones de lo que es la inocuidad se puede encontrar aquella que la refiere como la reducción del riesgo para la salud humana de gérmenes, toxinas y residuos químicos, patógenos y de la propagación de enfermedades o parásitos que puedan afectar la salud (OECD, 1999), pero también se puede entender como la implementación de medidas que reducen los riesgos, tanto biológicos como químicos (aditivos alimenticios), para proteger a los consumidores de peligros involuntarios.

Como definición técnica, la inocuidad se considera como lo contrario al peligro alimentario, la probabilidad de no sufrir algún riesgo por consumir los alimentos en cuestión; Henson y Traill en 1993, la definen como: una medida restrictiva al comercio, dentro del subconjunto de regulaciones sociales que son adoptadas por un país y que tienden a proteger el interés público por cuestiones tales como salud, inocuidad, ambiente y cohesión social (en esta definición se incorporan también medidas

ambientales, de comercio, estándares de calidad, etc.). Se reconoce que en la trayectoria del campo a la mesa, los alimentos se pueden contaminar con patógenos. Por lo tanto, esta filosofía tiene como principios fundamentales prevenir y reducir al mínimo los riesgos a la salud de los consumidores de frutas y hortalizas frescas. Estos riesgos provienen principalmente del uso de agua contaminada, uso irracional de plaguicidas, utilización inadecuada de estiércol y otros desechos orgánicos, así como de emplear trabajadores enfermos y la falta de observancia en la sanidad. Por lo tanto, se considera de elevada prioridad hacer cumplir todas las disposiciones oficiales que garanticen la seguridad de los alimentos; actuación responsable a todos los niveles del contexto agrícola (en el campo, el empaque, centros de distribución y transporte); contar con personal preparado y un control eficaz; además de un sistema que pueda vigilar adecuadamente toda la cadena productiva (FDA, 1998).

2.3 La inocuidad alimentaria en México

En respuesta a la globalización de los mercados, México ha firmado tratados con varios países como: EE. UU., Canadá (1994), Colombia, Venezuela (1995), Costa Rica (1995), Bolivia (1995), Chile (1992), y Nicaragua (1998). Estos tratados internacionales nos obligan a asumir una actitud responsable ante los problemas de salud de los mexicanos (Islas, 1999).

Los consumidores mexicanos tradicionalmente compran hortalizas sin considerar la posibilidad de que estén contaminadas de microorganismos o sustancias químicas. Se carece de cultura para exigir calidad total. Esta forma de pensar también se refleja en muchas regiones productoras de hortalizas de México que no ponen interés en la higiene

con que procesan los alimentos. En general, solo dos cosas preocupan al mercado mexicano de frutas y hortalizas, la apariencia del producto y la presencia de plaguicidas. A las enfermedades de origen alimenticio se les ubicaba como una responsabilidad exclusiva de las personas que preparan los alimentos. A diferencia de otros países y organizaciones internacionales, que en respuesta a este tipo de problemas ha reaccionado muy rápido y poniendo atención a todos los puntos de riesgo de la cadena productiva (Arroyo, 1999).

Las cifras emitidas por la Secretaria de Salud en México, documentaron que hubo 2.95 millones de personas hospitalizadas por enfermedades de origen alimenticio durante el periodo de 1995 a 1999, de las cuales se presentaron 10 mil defunciones. Desafortunadamente en la mayoría de los casos no es fácil ubicar la fuente de infección. En el caso de las frutas y vegetales frescos, cuando se detecta que están contaminados con algún microorganismo peligroso a la salud, cuando estos se han distribuido y por ser perecederos no se puede solicitar su decomiso. Pese a que en México, actualmente se tienen 1230 unidades de verificación, no existe a la fecha una sola instancia, ni privada ni de gobierno, que se encargue de regular la aplicación de las normas para evitar los riesgos químicos, físicos y biológicos (Islas, 1999).

En México, se ha publicado una sola norma referente a las Buenas Prácticas Agrícolas. Se trata de la NORMA OFICIAL MEXICANA (CON CARÁCTER DE EMERGENCIA) NOM-EM-037-FITO-2000, REQUISITOS Y ESPECIFICACIONES PARA LA APLICACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE BUENAS PRACTICAS AGRÍCOLAS EN LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS.

2.4 Las barreras técnicas al comercio y la inocuidad alimentaria

Las barreras técnicas al comercio pueden resultar en "proteccionismo regulatorio" para los productores domésticos, al actuar como limitantes a las importaciones, aunque ésta no sea su intención primaria. En muchas ocasiones estas medidas son bien intencionadas, pero aun así pueden disminuir los flujos de comercio al establecer estándares que difieren de los otros países (Avendaño, 2004).

Las barreras técnicas al comercio, también llamadas regulaciones sociales, incluyen todas aquellas medidas adoptadas por un país para alcanzar objetivos de salud, inocuidad, calidad y ambientales. Las barreras técnicas pueden ayudar a alcanzar estos objetivos de política mediante la restricción al ingreso de productos no satisfactorios en la frontera (Avendaño, 2004).

En este sentido, la inocuidad como barrera técnica al comercio, se puede clasificar como una especificación técnica, que se implementa como barrera uniforme, para proteger la salud y el interés económico de los consumidores (Avendaño, 2004).

2.5 Estudios de caso y cierre de fronteras por hortalizas producidas en México

En los últimos 20 años se ha encontrado problemas de salud por detecciones de *Salmonella* y *E. coli* encontrados en productos de exportación provenientes de México lo cual ha ocasionado el cierre de fronteras con los países de EE.UU. y Canadá, estos estudios de caso se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Cierre de frontera para México debido a la presencia de bacterias en vegetales

Año	Cultivo	Bacteria	País
1990 y1993	Jitomates y lechugas frescas.	*Salmonella y E. coli* O157:H7	EE. UU.
1992 y 1995	Lechuga iceberg	*E. coli* O157:H7	EE.UU.
1997	Melón Cantaloupe	*Salmonella chester*	EE. UU.
2001 y 2002	Melón Cantaloupe	*Salmonella saphra* *Salmonella enterica poona*	EE.UU. y Canadá
2007	Cebolla	*Salmonella*	EE.UU.
2008	Jitomates, ajies, Chiles, jalapeños, cilantro fresco, chiles serranos	*Salmonella saintpaul*	EE.UU, Colombia y Canadá
2010	Papaya	*Salmonella enterica poona*	Texas y EE. UU.

FDA, 2002; Carranza, 2010; FDA, 2010.

2.6 Principios esenciales para la reducción de riesgos microbianos en frutas y hortalizas frescas

A continuación se enuncian los 8 principios para la de riesgos microbianos en frutas y hortalizas frescas.

1. Es preferible prevenir la contaminación microbiana de frutas y hortalizas que fiarse de las acciones para combatir dicha contaminación, una vez que tiene lugar.

2. Para reducir al mínimo el riesgo microbiano en frutas y hortalizas frescas, los agricultores y empacadores deben utilizar BPA en las áreas donde puedan ejercer cierto

control, siempre que no aumenten otros riesgos de contaminación en el suministro de alimentos o del medio ambiente.

3. Todo lo que entra en contacto con las frutas y hortalizas frescas puede ocasionar su contaminación. La mayoría de los microorganismos patógenos en estos alimentos provienen de las heces de los seres humanos o de los animales.

4. Cuando el agua entra en contacto con las frutas y hortalizas frescas, la posibilidad de contaminación por esta fuente dependerá de la calidad y procedencia de la misma. Es necesario adoptar BPA y BPM para reducir al mínimo el riesgo de contaminación por el agua utilizada en las actividades de riego y procesamiento.

5. Las prácticas de utilizar estiércol o desechos biológicos municipales sólidos deben ser supervisadas para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación.

6. La higiene y prácticas de los operarios involucrados en el ciclo de producción juegan un papel esencial para reducir al máximo las posibilidades de contaminación microbiana de frutas y hortalizas.

7. Es importante conocer y cumplir todos los reglamentos de los gobiernos locales, estatales y federales sobre el establecimiento de prácticas agrícolas.

8. Se deberá establecer un sistema de rendición de cuentas a todos los niveles de su operación agrícola (en el campo, las instalaciones de embalajes, el centro de distribución y el transporte). Para que un programa de inocuidad alimentaria tenga éxito debe contar con personal preparado y un eficaz monitoreo y mantenimiento que asegure que todos

los elementos del mismo funcionen correctamente y se pueda averiguar el origen del producto, rastreándolo a través de diversos canales de distribución (González, 2010).

2.7 Importancia y calidad del agua dentro del proceso agrícola

El agua que se utiliza en todo el proceso agrícola se debe considerar "inocua" y limpia, es decir, que no implique un riesgo microbiano y que carezca de otros compuestos químicos peligrosos a la salud (Guzmán, 2001).

El agua que se utiliza en la producción de cultivos hortofrutícolas representa una fuente potencial de microorganismos que ocasionan enfermedades de transmisión alimentaria (Chaidez, 2001). Esta contaminación proviene de la exposición directa, como ocurre en el agua superficial, y a la filtración de contaminantes en el caso de aguas subterráneas. Existen estudios que demuestran que el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas aumenta cuando estos entran en contacto con agua de mala calidad, debido a que es una fuente muy importante de microorganismos patógenos (Guzmán, 2001); entre los microorganismos patógenos que el agua puede transmitir se encuentran las especies de *E coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y *Shigella.* (Chaidez, 2001). Constituyendo así un riesgo potencial en prácticamente todas las etapas de la cadena productiva (campo, instalaciones, transporte y lavado al final del producto antes del consumo). El riesgo se considera elevado debido a que el agua se utiliza en una enorme cantidad de actividades tales como: riego, aplicación de agroquímicos y lavado de frutas y hortalizas. Desafortunadamente a nivel de campo, no es fácil que el productor conozca la calidad del agua que está utilizando, mucho menos las estrategias para mantenerla en excelentes condiciones. Sin embargo, se deben tomar medidas sanitarias como: protección de los

pozos de agua, dar tratamientos especiales y usar métodos que procuren el contacto mínimo del producto con agua de pobre calidad (Guzmán, 2001).

2.8 Importantica de la producción y exportación de los cultivos de jitomate, papaya y frutillas

2.8.1 Cultivo de jitomate

La producción mundial de jitomate para su consumo en fresco en 2012 fue de 211’021,843 t, según la FAO, con un incremento de un 2.2% con respecto a 2011, donde China figura como el principal país productor a nivel mundial, con 50’125,055 t; lo cual representa el 23.75% de la producción total, le sigue India con 17’500,000 t (8.29 %). El tercer lugar lo ocupa EE.UU, con 13’206,950 t (6.26%), y en el décimo lugar con una producción de 3’433,567 t (1,63%) se encuentra México (HORTO INFO, 2014).

El jitomate es el octavo cultivo con el mayor valor en México, cuyas variedades saladette y bola son las que principalmente se producen, además del cherry. En 2012 generó 13,146 mdp, siendo este, el 3.2% del valor total del sector agrícola y contó con el 0.3% de la superficie sembrada nacional (SHCP, 2014). De acuerdo a un informe del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA), se espera que la producción para el año 2014/15 (Oct/Sep) alcance las 2.1 millones de toneladas, con una área cultivada de 45 mil hectáreas, suponiendo que las condiciones climáticas sean favorables y los precios sean atractivos. Dado que la producción del año 2013/14 (Oct/Sep) llegó a las 2.17 millones de toneladas debido a los buenos rendimientos (FDA, 2014).

Para el año 2013/14, el consumo de jitomate fresco fue más alto en comparación con los ciclos anteriores, superando las 600 mil toneladas, debido a la mayor oferta durante la temporada de invierno, menores volúmenes de exportación, y buenos precios para los consumidores. La cifra de consumo final en el país en año 2014/15 dependerá de las exportaciones de jitomate a EE.UU., debido a que el consumo doméstico es lo que queda después de la exportación (FDA, 2014).

México es el principal exportador de jitomate fresco a nivel mundial, con cerca del 20% del volumen y 25% del valor comercial, que se destinan principalmente a EE.UU. El país exporta alrededor de 1.5 millones de toneladas anuales, que representan entre el 50 y 70% del volumen de producción. En 2012, el valor de las exportaciones alcanzó más de 22 mil mdp y para 2013 se estima que alcanzó los 23 mil mdp, los principales estados productores se muestran en el Cuadro 2 (SHCP, 2014).

Cuadro 2. Producción de jitomate por estado en 2012 (SHCP, 2014).

	Volumen		Valor	
Estados	**Miles de toneladas**	**Participación**	**mdp**	**Participación**
Sinaloa	1,039.40	36.60%	3,070.40	23.40%
Baja California	189.6	6.70%	1,475.90	11.20%
Michoacán	171	6.00%	522.7	4.00%
Jalisco	156.7	5.50%	1,152.30	8.80%
Zacatecas	139.1	4.90%	670.1	5.10%
Baja California Sur	106.9	3.80%	720.8	5.50%
Resto del País	1,035.70	36.50%	5,534.30	42.10%
Total Nacional	2,838.40	100.00%	13,146.40	100.00%

mdp: Millones de pesos.

2.8.2 Cultivo de papaya

De acuerdo a estimaciones de la FAO, la producción mundial de fruta tropical alcanzaría 82 millones de toneladas en el 2014. Esta cifra representa un incremento anual del 1.7% respecto al período base (2004). El 78% corresponde a frutas principales (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22% a las secundarias (lichi, rambután, guayaba) (FDA, 2012).

El 90% de las frutas tropicales se producen en países que están en vías de desarrollo. Las perspectivas de demanda de fruta tropical fresca son favorables porque se prevé que el volumen de las importaciones de mango, aguacate, papaya y piña aumente un 24%. Los pronósticos indican que en 2013 las compras ascendieron a 3.6 millones de toneladas y de ellas, 2.6 millones de toneladas (81%) se destinaron a mercados de países desarrollados. EE.UU. y la Unión Europea acaparan el 70% de las importaciones de fruta tropical, por delante de Japón. La papaya se produce en India, Brasil y México, principalmente; y las exportaciones están dominadas por México, Malasia y Brasil (FDA, 2012).

El incremento de la cosecha de papaya ha sido espectacular durante la última década. Brasil e India han sido los países con mayor incremento porcentual, 6% y 19%, respectivamente (FDA, 2012).

México ocupa el sexto lugar como productor de papaya a nivel mundial y es el principal exportador, seguido de Belice y Guatemala. La mayor parte de las exportaciones de papaya se destinan a los EE.UU con un 84 % y a Canadá con un 16 % (Madrigal y Boza, 2013). En 2014, México exportó a los EE.UU la cantidad de 6,765 contenedores, equivalentes a 121,770 toneladas de papaya (ProPapaya, 2014).

La papaya en el sureste de México representa el 40 % de la cosecha de los frutos tropicales, produciéndose más de 150,000 toneladas anualmente (Morales, 1999). Respecto a los principales exportadores, México ocupa el primer lugar con 101 mil toneladas, lo que representa el 41% del total mundial. El valor de estas exportaciones son 55.32 millones de dólares (Madrigal y Boza, 2013).

Dentro de los estados productores de papaya se encuentra Veracruz en el primer lugar con 2,500 hectáreas sembradas lo que equivale al 29%, en segundo lugar Colima con 1,994 hectáreas (23%), sin embargo, la calidad de su fruta lo mantiene en el primer lugar en exportación de papaya a los EE.UU, después le sigue Michoacán con 1,700 hectáreas (20%); Chiapas mantiene sus 900 hectáreas sembradas (10%), y el estado de Oaxaca disminuye su superficie drásticamente llegando a tener un 8%; el estado de Yucatán mantiene 500 hectáreas con 300 en producción actual (6%), y en Jalisco se contabilizan 280 hectáreas (3%) y al final está el estado de Puebla con una superficie de 80 hectáreas de producción, con 40 en producción actual (1%) (ProPapaya, 2014).

2.8.3 Cultivo de frutillas

A nivel mundial la producción de frutillas ha crecido 13% en los últimos cinco años, alcanzando 4’516,810 t en el año 2012. El principal productor fue EE.UU, con 1’366,850 t; de las cuales, el 80% se destinó al mercado en fresco. En segundo lugar está México, con 360,426 t, y muy cerca Turquía, con 353,173 t; les sigue España, con 289,900 t, de las cuales 75% se destina a venta en fresco y en quinto lugar está Egipto, con 242,297 t. Los principales países exportadores de frutillas frescas son España, EE.UU, Países Bajos y México (Pefaur, 2014).

Los frutos rojos, entre los que se encuentra la zarzamora, se han convertido en un éxito de exportación de los campos michoacanos, y próximamente su sabor podrá ser disfrutado en países tan lejanos como China. La producción de frutillas en México genera 100 mil empleos directos por temporada, un volumen estimado de 464,977 t y un valor de exportaciones del 96 % en el 2013 con 800 millones de dólares. El pronóstico para los próximos cinco años es que se duplicarán los números de producción y empleo, pues la demanda de "berries" en el mundo ha crecido exponencialmente, a consecuencia de que los países desarrollados del hemisferio norte aumentaron su consumo, en función de las excelentes cualidades nutricionales de estas. Entre 85 y 90% de la producción se vende a EE.UU y Canadá, y el resto se canaliza a nuevos mercados, particularmente Europa y recientemente Asia (SAGARPA, 2015).

De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), las entidades que destacan en la producción de estas frutillas son: Michoacán (62.9 %), Baja California (21.7%), Jalisco (7.6%), Guanajuato (3.2%) y otros (4.5%). Se tiene una superficie cultivada mayor a 19,645 hectáreas con una producción de más de 385,928 t (SAGARPA, 2014) y la SAGARPA (2012) informa que en los últimos 10 años la producción nacional de berries se ha multiplicado en 2.7 veces.

2.9 Principales características de los organismos de importancia en los alimentos

2.9.1 Características técnicas para la clasificación de las bacterias

Las bacterias son sin duda el grupo más importante de microorganismos asociados con los alimentos, tanto por lo que se refiere a la trasmisión de enfermedades como a sus alteraciones. Sin embargo, las características morfológicas solas son de uso limitado en

la identificación detallada, ya que las bacterias presentan escasa diferenciación salvo a que sean de forma bacilar o cocoides, y que crezcan como células aisladas o en grupos característicos, pero ahora los sistemas de identificación se basaban principalmente en pruebas bioquímicas para determinar las características fenotípicas e identificar las cepas aisladas (serología). Más recientemente, se comprobó que algunas técnicas de microbiología molecular son útiles para estudiar el parentesco entre grupos de bacterias relacionados taxonómicamente. Estas técnicas son: comparación de los porcentajes de las bases de ADN, es decir, el porcentaje de guanina y citosina con respecto a las bases totales, hibridación de ácidos nucleicos, para determinar el grado de similitud del ácido nucleico de dos microorganismos y comparación directa de la secuencia nucleotídica de los ácidos nucleicos (Mossel *et al*., 2006).

Los ácidos nucleicos mutan espontáneamente con el tiempo, modificando su secuencia. La velocidad del cambio en los pares de bases varía según el tipo de ácido nucleico estudiado (ADN, ARNr, etc.). Las velocidades de cambio más rápidas son útiles para estudiar el parentesco entre microorganismos relacionados más cercanamente y las velocidades más lentas para estudiar microorganismos con parentesco más lejano. Esto permite establecer la relación filogenética entre los diferentes microorganismos (Mossel *et al*., 2006).

Se ha comprobado que la secuenciación del ARNr 16S es el método más útil y está siendo ampliamente utilizado para establecer el parentesco de los Procariotas. La combinación de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), junto con la utilización de colorantes fluorescentes específicos no radiactivos, han permitido la automatización y abaratamiento de estas técnicas, lo que ha contribuido al incremento

del número de secuencias disponibles, que además pueden consultarse en los bancos de datos del Gen bank. Esto permite determinar con certeza el género y la especie de la cepa estudiada.

2.9.2 Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos

Las enfermedades microbianas que se transmiten por medio de los alimentos se dividen en dos clases principales de acuerdo a Mossel *et al*., 2006.

La primera comprende las enfermedades que son consecuencia de la presencia en los alimentos de microorganismos infectivos por ingestión. Estos microorganismos son capaces de causar enfermedad por la invasión al hospedante o por la liberación de sustancias toxicas (toxinas), resultantes del crecimiento en el tracto intestinal o en algún otro órgano. Estas enfermedades generalmente son denominadas infecciones alimentarias.

La segunda clase de enfermedades transmitidas por alimentos es consecuencia de la absorción intestinal de toxinas que ya estaban presentes en los alimentos antes de su ingestión, como consecuencia del crecimiento y metabolismo en dichos sustratos de ciertos microorganismos, causando "intoxinaciones". En las infecciones alimentarias, el número de células viables presentes en los alimentos puede ser muy reducido, aunque generalmente es variable (Mossel *et al*., 2006).

2.10 *Salmonella*

2.10.1 Características de *Salmonella*

Estos enteropatógenos también producen enterotoxinas, en parte relacionadas con las toxinas LT y ST, que están mediadas por plásmidos (Algorta *et al.*, 1996; Mossel *et al*., 2006). El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las entero bacterias, son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasas negativo y suelen ser móviles; a excepción de *Salmonella gallinarum*, que siempre es inmóvil (Algorta *et al*., 1996).

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, diferenciables entre sí por sus características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG (orto-nitrofenil galactopiranosido), el crecimiento en presencia de KCN (cianuro de potasio) y otras. La *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez, en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houenae* (IV), e *indica* (VI) que corresponden a los antiguos subgéneros. Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente (Ingraham *et al*., 1983). El número romano V se reserva para los serotipos de *S. bongori* (Barreto y Rodríguez, 2012). La *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I), se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E (Cuadro 3). Cada uno comprende múltiples serovares, al punto que se han identificado más de 2,500 serovares o serotipos (Ryan y Ray, 2004) y causan el 99 % de las salmonelosis en humanos y animales (Barreto y Rodríguez, 2012).

2.10.2 Serovariedades

Un aspecto sorprendente de la epidemiologia de la salmonelosis es que hay aproximadamente 2,500 serotipos o serovares conocidos, los principales se indican en el Cuadro 3, como las principales causas de la "toxi-infección" alimentaria por salmonelas.

Cuadro 3. Serovariedades o serovares o serotipos de salmonelas más frecuentemente implicadas en brotes de salmonelosis transmitida por los alimentos y su clasificación de acuero al esquema de Kauffmann-White 2006.

Grupo O	***Serovariedad de Salmonella***
A	*paratyphy* A
B	*abortus-equi*
	abortus-ovis
	Agona
	Brandenburg
	Bredeney
	Chester
	Derby
	Heidelberg
	Indiana
	Java
	paratyphi B
	Reading
	Saint-paul
	Schwarzengrund
	Stanlesy
	Typhimurium
C	*Bareilly*
	Blockley
	Bovis
	Morbificans
	Braenderup
	cholerae-suis
	Goldcoast
	Hadar
	Infantis

	Lille
	Livingstone
	Manhatthan
	Montevideo
	Muenchen
	Newport
	Oranienburg
	Paratyphi
	Tennessee
	Thompson
	typhi-suis
	Virchow
D	*dublin*
	Eastbourne
	Enteritidis
	Miami
	Napoli
	Panamá
	Saarbruecken
	Sendai
	Typhi
E	*Anatum*
	Give
	Illionois
	Lexington
	London
	Meleagridis
	Minneapolis
	Newington
	Senftenburg
	Tilburg
	Weltevreden
F	*Aberdeen*
	Heerlen
	Leeuwarden
	Lincoln
	Maastricht
	Maracaibo
	Osnabrbruck
	Missouri
	Pretoria
	Stendal
	Wentworth

Otras	*bristol* (G)
	carrau (H)
	cubana (G)
	dakar (M)
	ealing (O)
	good (L)
	hvittingfos (I)
	leipzig (S)
	lichtenberg (S)
	minnesota (S)
	nottingham (I)
	oldenburg (I)
	onderstepoort (H)
	pomona (M)
	poona (G)
	urbana (N)
	worthington (G)

Las razones del predominio de determinados serotipos en la cadena alimentaria y la aparición esporádica de otros, puede estar relacionada con la enterotoxigenicidad. Además, la persistencia de ciertos serotipos en el ambiente general, se puede deber al hecho de que se establecen en los animales que se utilizan para producir alimentos y en el propio ambiente próximo a los alimentos. Así, a veces, pueden aparecer serotipos bastante raros como: *S. raus, S. good, S. cerro, S. wien, S. goldcoast, S. kedougou* y *S. haardt*. Considerados como "exóticos" no se establecen como los endémicos mencionados antes y desaparecen con bastante rapidez de los ambientes animales y humanos.

De acuerdo con Martínez y colaboradores (1999), los numerosos serotipos de *Salmonella*s manifiestan distinta patogenicidad y virulencia, y se pueden clasificar según su adaptación al hospedador como por ejemplo:

Serotipos adaptados al hombre

Salmonella typhimurium

Salmonella paratyphi A, B (aves) y C

Salmonella sendai

Serotipos adaptados a animales

Aves: *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*

Vacuno: *Salmonella dublin*

Ovino: *Salmonella abortusovis* (declaración obligatoria)

Equino: *Salmonella abortusequi*

Cerdo: *Salmonella cholerasuis*

2.10.3 Ciclo biológico de *Salmonella*

La temperatura y el tiempo influyen en su desarrollo ya que necesitan alimento, humedad, calor y tiempo para crecer y multiplicarse. Mantener un producto entre 5 ºC y 65 ºC con un crecimiento óptimo de 37 ºC durante más de dos horas es sinónimo de proliferación de esta. A estas temperaturas, *Salmonella* puede duplicar su número cada 20 o 30 minutos. Cuanto más tiempo se mantiene un alimento a temperaturas no adecuadas, mayor es el riesgo de contaminación (Algorta *et al*., 1996). El intervalo de pH en el cual se multiplica está entre los 4.5 a 9.5, con un óptimo de 6.5 a 7.5, el pH

afecta la capacidad de multiplicarse, en un alimento o en cualquier otro medio (Hernández, 2006).

2.10.4 Transmisión, síntomas y cuadros clínicos de *Salmonella*

La causa y la transmisión de las fiebres entéricas clásicas, es decir, de las fiebres tifoidea y paratifoidea, producidas por *S. typhi* y por *S. paratyphi* A, B y C, son diferentes a las enfermedades causada por la mayoría de las demás salmonelas. Estas enfermedades son consecuencia de infecciones sistémicas, en las que los organismos, después de una multiplicación breve en el tracto intestinal, invaden la corriente sanguínea, se establecen en distintos órganos y originan fiebre elevada y otros síntomas característicos.

Los síntomas clínicos generalmente aparecen 18-36 horas (variación de 12-48 horas) después de la ingestión del alimento contaminado. La enfermedad se caracteriza por una diarrea grave, acompañada de fiebre, y con frecuencia de dolor de cabeza y malestar general. Su duración varía desde unos pocos días a algunas semanas. La mayoría de las cepas colonizan el íleon, se fijan o adhieren al epitelio y producen enterotoxinas. Algunas son citopatógenas y causan diarrea sanguinolenta. Unas pocas cepas invaden los tejidos subepiteliales y producen una enfermedad grave. El porcentaje de muertes es bajo (< 1%) en los países desarrollados, pero a causa del número relativamente elevado de casos, por ejemplo en el Reino Unido, todos los años se producen aproximadamente 50 muertes. Los bebes y los niños de corta edad, las personas ancianas y las inmunocomprometidas son los individuos que están más expuestos, su vía de trasmisión es por medio del agua y sólo accidentalmente por los alimentos.

La incidencia real de la salmonelosis todavía se desconoce en gran parte. No obstante, debido a los esfuerzos considerables realizados por los responsables de la vigilancia y los expertos en epidemiología, se ha llegado a evaluar con bastante seguridad la importancia de la salmonelosis en el conjunto de las enfermedades transmitidas por los alimentos. En muchos países privilegiados, es una de las causas más frecuentemente declaradas de infecciones transmitidas por los alimentos.

2.11 *Escherichia coli*

2.11.1 Características de *E. coli*

El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. La especie tipo es *E. coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *E. hermanni*, y *E. vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional (Blanco *et al*., 2002).

E.coli es una bacteria Gram negativa típica de la familia *Enterobacteriaceae*. El análisis del gen 16r RNA muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ, misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacterias (α, β, δ) y a las cianobacterias. La subclase de proteobacterias, incluye además a organismos patógenos de humanos, como: *Shigella, Samonella, Vibrio* y *Haemophilus*. Las bacterias de esta familia se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente, es decir, anaérobicamente en el interior del intestino y aerobicamente en el ambiente exterior. Gracias a esta capacidad muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros tantos son

principalmente comensales de animales invertebrados y vertebrados o son patógenos de plantas (Kolter, 1992).

2.11.2 Ciclo biológico

La fuente de infección son las personas infectadas, ya sea por alimentos contaminados, agua contaminada o carne mal cocida. La diseminación es por vía fecal-oral. Usualmente el periodo de incubación para la mayoría de las sepas es de 6 horas a 6 días (Ramírez, 2000).

El tiempo de duplicación celular (también conocido como el tiempo de generación) es de alrededor de 18 minutos, cuando las condiciones para el crecimiento son favorables (Ávila *et al*., 2008). Pero en el tracto intestinal de los vertebrados, en el cual los nutrientes son menos abundantes, el tiempo de duplicación es de unas 12 horas. Algunas bacterias pueden crecer más rápidamente que *E. coli*; pero incluso en las condiciones más favorables, muchos microorganismos crecen mucho más lentamente, requiriendo horas o días para duplicar su número (Gadea *et al*., 1998).

Generalmente se considera que el hábitat "normal" de *E. coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos), y que aunque se pueden localizar estas bacterias en el medio externo, tradicionalmente se consideraba que su presencia representaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podía reproducir en el medio exterior. Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso. Existen *E. coli* que viven en otras partes del tracto digestivo, como en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas particulares en ambientes acuáticos,

especialmente los que son ricos en compuestos orgánicos como en el desagüe (Eslava *et al*., 1994). También se ha demostrado que estas poblaciones ambientales pueden incrementar de densidad poblacional en el tiempo, indicando que crecen y sobreviven en estos ambientes externos. Además, se tienen datos que sugieren que existen cepas de *E. coli* que sobreviven y se replican en el suelo (Marr, 1992).

2.11.3 Grupos de *E. coli*

De acuerdo con Roels y colaboradores (1998), Fernández (2000) y Mossel *et al.* (2006), existen seis tipos o grupos de *E. coli* enterovirulento, los cuales se describen a continuación:

El primer grupo recibe el nombre de enterotoxigénico (ETEC) y lo integran cepas que producen diversas enterotoxinas, están codificadas por plásmidos. Unas son termostables (ST) y otras termolábiles (LT). Estas últimas están relacionadas antigénicamente con la toxina del cólera y las cepas correspondientes producen síntomas semejantes al cólera. *E. coli* enterotoxigénico coloniza la mucosa del intestino delgado y elabora una o más toxinas que determinan la acumulación de agua. Para la adhesión y colonización, posee fibras, que a menudo específicas, y que impiden la transmisión interespecífica de las cepas ETEC.

Estas cepas producen diarreas, tanto en niños como en adultos (diarrea del turista). Los pacientes se convierten en portadores y eliminan el microorganismo con las heces, después de que desaparecen los síntomas. Producen también diarrea infantil en los países en desarrollo (muy grave y que contribuye a la desnutrición) y tienen menos importancia como causantes de diarreas pediátricas (menos severas) en los países avanzados. Están

implícitas asimismo en la diarrea del viajero y en diarreas en contingentes militares en áreas con higiene deficiente, se transmite primeramente por alimentos y agua contaminados. También, en algún caso, por contacto persona a persona. El origen de las cepas ETEC son las heces humanas que contaminan el agua y los alimentos. Las cepas ETEC de origen humano poseen factores de colonización diferentes a los hallados en las cepas de origen animal, por lo que no parece probable que causen enfermedad en una especie que no sea hospededador. También se ha observado que las LT de cepas de origen porcino y humano son ligeramente diferentes y que tienen distinta afinidad por receptores celulares intestinales.

El segundo grupo se denomina enteropatógeno (EPEC), designación dada a las primeras cepas de *E. coli* estudiadas. Son responsables de diarreas graves en niños por vía directa fecal-oral, siendo importantes en países en desarrollo. En brotes de diarrea en adultos, se han visto un incremento tanto en los alimentos como el agua. Se trata de cepas en general no productoras de toxinas y no invasivas. Actúan adhiriéndose fuertemente a la membrana de las células intestinales e interfieren con el transporte de electrolitos. Los patrones de adherencia son dos: i) "adherencia localizada", es el más frecuente y se caracteriza porque la bacteria se adhiere a un solo punto o a unos pocos puntos localizados; ii)"adherencia difusa", la bacteria se une al azar a la membrana celular. Además, estas cepas EPEC producen lesiones características de esfacelación o desprendimiento de la mucosa de las microvellosidades intestinales.

El tercer grupo es el de las cepas enterohemorrágicas (EHEC), cuyo representante principal es *E. coli* O157:H7. Estas cepas se caracterizan por no fermentar el sorbitol y por ser negativas en la prueba del MUG (4-metilumberiferil-β-D-glucurónido), en

contraposición del 95% de las cepas de *E. coli* que producen fluorescencia en presencia de este compuesto. Son responsables de tres síndromes: i) colitis hemorrágica (diarrea aguda sanguinolenta); ii) síndrome urémico hemolítico (insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopénica), sobre todo en niños; y iii) púrpura trombocitopénica (relacionada con el síndrome anterior, pero con fiebre y síntomas nerviosos). La presentación clínica más común es la colitis hemorrágica y el 10% de estos pacientes acaba desarrollando síndrome urémico hemolítico o púrpura trombocitopénica. En niños y ancianos, la infección puede ser mortal (5-10%). Los mecanismos de patogenicidad no están totalmente esclarecidos. Debido a que producen verotoxinas, se designa a estas sepas VTEC y recientemente se ha propuesto que se denominen como el resto de las toxinas de la familia Shiga (Stxs).

La gravedad de los síndromes ocasionados por EHEC y su, aparentemente, baja dosis infectiva (< 100 células), sitúan a estas cepas de *E. coli* entre los agente de infecciones alimentarias más preocupantes. Estas cepas son de origen bovino y el alimento más frecuentemente implicado en los brotes que se han estudiado, en EE.UU. y Europa, ha sido la carne picada y las hamburguesas de carne de vacuno. Se cree que el reservorio de *E. coli* O157:H7 y cepas próximas son los animales, especialmente el ganado vacuno, y se presentan serias dificultades para detectar estas carnes en los mataderos. Su origen es la contaminación de origen fecal durante los procesos de carnización. Otro aspecto importante es la resistencia de estas cepas en medios ácidos, lo que les permite sobrevivir en estas condiciones. Así, aunque la carne picada que no este lo suficientemente cocinada es el principal vehículo de transmisión al hombre.

El cuarto grupo, también de creación reciente, incluye las cepas llamadas enteroagresivas (EAEC), que son responsables de diarreas prolongadas en niños y, en menor medida, en adultos. Aunque su incidencia parece más elevada en Sudamérica, se han descrito brotes en otras áreas geográficas. Las cepas se caracterizan por mostrar un patrón característico de adherencia "agregativo" en cultivo celulares de la línea HEp-2. Sus mecanismos de patogenicidad no están completamente dilucidados.

El quinto grupo está constituido por las cepas enteroinvasivas (EIEC), produce una enfermedad más grave, a menudo con diarrea sanguinolenta. Estas cepas son citopatógenas, lo mismo que las shigelas, invaden la mucosa intestinal del colon y producen la muerte de las células epiteliales. Constituyen un grupo serológico característico (11 serotipos, siendo el más frecuente el O124). Presentan muchas reacciones bioquímicas atípicas, como ser anaerogénicas y no fermentar la lactosa o hacerlo lentamente. La capacidad invasiva depende de un plásmido de elevado peso molecular que codifica la producción de varias capas polipeptídicas externas que favorecen la invasión.

Son causa de disentería endémica en países en desarrollo. Casi todos los brotes por estas cepas tienen origen en los alimentos, y algunos en el agua. Pero, su principal transmisión es directa, de persona a persona, como ocurre con las shigelas. La información disponible sugiere que no existe relación entre las cepas procedentes de los animales y las aisladas de muestras clínicas humanas, por lo tanto, el hombre es el principal reservorio.

En el Cuadro 4 se pueden observar los tipos de cepas de *E. coli* enterovirulento, cabe mencionar que no se incluye el grupo de más reciente creación, que reúne las cepas difusoadherentes (DAEC), estos se han asociado con diarreas infantiles (1-5 años), sobre todo en países en vías de desarrollo. El proceso es leve y las heces no contienen sangre. Las cepas estudiadas presentan un patrón característico de adherencia y originan protuberancias parecidas a dedos, en las que, aparentemente se "encajan" o "insertan" las células del microorganismo. No existe mucha información acerca de su patogénesis, pero se ha observado que estas cepas poseen fimbrias que son las responsables de la adherencia y cuya presencia esta codificada por genes cromosómicos y por un plásmido

Cuadro 4. Tipos o categorías de cepas humanas de *E. coli* enterovirulento, serogrupos incluidos en cada antígeno(s) H asociados (Nataro y Kaper, 1998).

Tipos o categorías	**Serogrupos**	**Antígeno(s)H asociado(s)**
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
EPEC	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125ac	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM

	O128	H2, H12
	O142	H6
EHEC (STEC)	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O91	10, 21
	O111ab	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7
EAEC	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O?*	H10
EIEC	O28ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
	O167	H4, H5, NM

*Antígeno O no tipable por métodos convencionales.

ETEC: grupo enterotoxigénico. EPEC: grupo enteropatógeno. EHEC (STEC): grupo enterohemorrágicas. EAEC: grupo enteroagresivas. EIEC: grupo enteroinvasivas

2.12 Impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por *Salmonella* y *E. coli*

Las complicaciones que se han observado después de las infecciones bacterianas transmitidas por los alimentos se mencionan a continuación:

Enteritis por *E. coli* (tipos EVEC): artropatía seronegativa, eritema nodoso, síndrome hemolítico-urémico, púrpura trombocitopénica, manifestaciones neurológicas, síndrome de muerte repentina infantil (muerte en cuna).

Salmonelosis: colecistitis, colitis, síndrome del intestino irritable, endocarditis, meningitis, encefalopatía, tiroiditis, miocarditis, síndromes reumatoides, enfermedad de Reiter, abscesos hepáticos y esplénicos, septicemia, pancreatitis, apendicitis, osteomielitis, aortitis, aneurisma arterial, abscesos intracerebrales, abscesos periféricos, epidídimo-orquitis, eritema nodoso, artritis séptica, mionecrosis (Mossel, 2006).

Las complicaciones de las infecciones alimentarias son raras, pero pueden adquirir a veces caracteres muy graves. Por esta razón, los alimentos destinados a los consumidores deben ser sometidos a procesos especialmente controlados y supervisados para reducir y eliminar los riesgos. La incidencia de estas enfermedades es elevada, ya que se estima en 104 pacientes por 106 habitantes, tomando en cuenta que son las enfermedades que se han atendido clínicamente (Mossel, 2006).

2.13 Enfermedades trasmitidas por bacterias presentes en animales

Las enfermedades trasmitidas por animales como las tortugas tienen una gran importancia debido a su repercusión, gravedad, capacidad de diseminación y riesgo de mortalidades masivas. Se han descrito hasta el momento casi 20 cepas potencialmente patógenas para los reptiles, de ellas muchas son transmitidas a las personas como: *Salmonella montevideo, S. agiobo, S. anatum, S. carrau, S. chamaeleon, S. durham* o *S. typhymurium* (Martínez y Soler, 2008).

En palomas se han realizado estudios en donde se demuestra la alta prevalencia extrema de dos patógenos zoonóticos. La infección con estos patógenos no parece estar asociada con ningún signo clínico perjudicial para las propias aves. Esto nos conduce a la hipótesis de que las palomas actúan como reservas asintomáticas de *E. coli*, *Chlamydophila psittaci* y de *Campylobacter jejuni*, considerándose los principales patógenos responsables de la diarrea aguda en el mundo. De hecho, en muchos países como Inglaterra y Gales, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, la infección por *Campylobacter jejuni* provoca más casos de diarreas agudas que la infección por las especies de *Salmonella* (INIA, 2000).

De igual forma, los reptiles son portadores de un gran número de microorganismos (Bacterias, hongos, protozoarios o parásitos) que afectan a pacientes inmuno suprimidos, en quimioterapia o en tratamiento con antinflamatorios esteroidales y principalmente niños menores de 10 años de edad. Es familiar hablar acerca de las zoonosis transmitidas por caninos y felinos, pero el desconocimiento es muy grande cuando se trata de animales silvestres, principalmente reptiles y anfibios. Dentro de las principales, se encuentra la Salmonelosis, que es la más conocida zoonosis de los reptiles. Una de las más comunes es la *S. entiritidis* y *S. typhimurium*, que produce enteritis; *S. cholerasuis* y *S. typhi*, que produce la fiebre tifoidea. La *S. java* y *S. urbana* se encuentra en las tortugas. Las patologías gastroentéricas son producidas por un gran número de bacterias (GEAS, 2002).

Un amplio número de patógenos bacterianos se ha visto implicado en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociados al consumo de frutas y hortalizas frescas (Beuchat, 1998), dentro de los más importantes encontramos a *Escherichia coli*

(*E. coli*) y *Salmonella* (FDA, 2002), estos brotes han puesto en riesgo a la salud de los consumidores en los mercados nacionales e internacionales, afectando lazos comerciales y cierres de fronteras, tal es el caso del melón Cantaloupe, donde 95 empaques exportaban en el 2002 y solo 5 en el 2010, ocasionando pérdidas de 67.3 mdd (Carranza, 2010).

Con base en lo anterior, sería de gran valía analizar e identificar cultural y molecularmente los riesgos biológicos procedentes de heces fecales de animales domésticos y silvestres, así como algunos riesgos biológicos presentes en el agua que se usa en los proceso de producción, debido a que en ella se pueden encontrar diferentes especies o serotipos de *Salmonella* y *E. coli*; La identificación de las características morfológicas solas de estas dos bacterias son de uso limitado una identificación detallada, ya que las bacterias presentan escasa diferenciación salvo a que sean de forma bacilar o cocoides, y que crezcan como células aisladas o en grupos característicos, pero ahora los sistemas de identificación se basaban principalmente en pruebas bioquímicas y más recientemente, se comprobó que algunas técnicas de microbiología molecular son útiles para estudiar el parentesco entre grupos de bacterias relacionados taxonómicamente (Mossel *et al*., 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de las unidades de producción

Se muestrearon 7 unidades de producción, de los cuales 3 fueron de Los Reyes, Michoacán, 3 de Tecomán, Colima y 1 de Silao, Guanajuato; localizados en las siguientes coordenadas. Los Reyes Michoacán se localiza en la parte Noroccidental del Estado, se encuentra en las coordenadas 19° 35’ de latitud norte y 102° 28´ de longitud oeste, a una altura de 1240 metros sobre el nivel del mar (msnm). Tecomán se encuentra con coordenadas entre los paralelos 18°40’ y 19°08’ de latitud norte; los meridianos 103°37’ y 103°59’ de longitud oeste; altitud entre 0 y 1, 200 msnm y Silao, Guanajuato está situado a los 100° 25´ 59´´ de longitud al oeste del Meridiano de Greenwich y a los 20° 56´ 24´´ de latitud norte y a una Altitud de 1,780 msnm.

3.2 Selección y Muestreo de las unidades de producción

Se realizaron dos muestreos en cada una de las unidades de producción de acuerdo a los procedimientos de la NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM 014-SSA1-1993 "PROCEDIMIENTOS SANITARIOS PARA EL MUESTREO DE AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO EN SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO DE AGUA PUBLICOS Y PRIVADOS", el primer muestreo se llevó acabo del 25 al 27 de agosto del 2013 y el segundo muestreo del 17 y 18 de diciembre del 2013; cada uno de los puntos muestreados se hicieron por triplicado.

Se hizo un recorrido por las unidades de producción y en los empaques, ubicando las fuentes de agua, puntos críticos de contaminación de la misma, presencia de animales y heces fecales.

3.3 Áreas seleccionadas para muestrear

3.3.1 Primer muestreo. Los puntos que fueron muestreados se indican en el Cuadro 5

Cuadro 5. Puntos de muestreo localizados dentro de las unidades de producción y empaques del 25 al 27 de agosto del 2013.

Estado	**Rancho**	Nombre de la muestra	**Estado**	**Rancho**	Nombre de la muestra
TECOMAN COLIMA	Ing. Tamez CPI	Agua para lavado de manos	LOS REYES MICHOACAN	Baltazar CPI	Agua potable
		Agua para lavado de manos ubicado en la parcela			Agua del canal
		Riego de goteo			Agua del filtro
		Agua de la Tina 1 para el lavado de la papaya			Agua de almacén
		Agua de la Tina 2 con cloro a 200ppm			Agua de lavado de manos
		Agua de la Tina 3 con fungicida		La isla CPI	Agua de lavado de manos
		Agua potable del pozo profundo			Agua de membrana para la aplicación de plaguicidas
					Agua de rio
	El retoño CPI	Agua del área de mezclas			Agua de cisterna para riego
		Agua de pozo para riego			Agua para aplicación de fungicidas foliar
		Agua potable del pozo profundo		La joya	Agua de membrana
		Agua del pozo			Agua de almacén

	Salvador en proceso de certificación EPCI	Agua del canal		CPI	Agua para el lavado de manos
		Agua para lavado de manos			Agua de almacén antes del filtro
		Muestras de heces de ranas			Agua después del filtro
		Muestras de heces de ratón			
		Muestras de heces de Lagartija	SILAO GUANAJUATO	La aldea SPI	Agua de riego por goteo
					Heces de pájaro en tomate

CPI: Con programa de inocuidad **EPCI:** En proceso de certificación de inocuidad **SPI:** Sin programa de inocuidad.

3.3.2 Segundo muestreo

Los puntos que fueron muestreados se señalan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Puntos de muestreo localizados dentro de las unidades de producción y empaque del 17 y 18 de diciembre del 2013.

Lugar	**Rancho**	**Nombre de la muestra**	**Lugar**	**Rancho**	**Nombre de la muestra**
TECOMAN COLIMA	Ing. Tamez CPI	Agua para lavado de manos	LOS REYES MICHOACAN	Baltazar CPI	Agua potable
		Agua para lavado de manos ubicado en la parcela			Agua del canal
		Agua de Riego por goteo			Agua potable del pozo profundo
		Agua de la Tina 1 para el lavado de la papaya			Agua de almacén
					Agua de lavado de manos
		Agua de la Tina 2 con cloro a			Agua de riego por

		200ppm			goteo
		Agua de la Tina 3 con fungicida			Heces de paloma
		Agua potable del pozo profundo			Heces de caballo
					Heces de perro
	El retoño CPI	Agua del área de mezclas			Heces de ratón
		Agua de pozo para riego		La joya CPI	Agua de membrana
		Agua potable del pozo profundo			Agua de almacén
	Salvador en proceso de certificación EPCI	Agua del pozo de riego			Heces de gato
		Agua del canal			Heces de paloma
					Agua de lavado de manos
		Agua para lavado de manos			Agua de almacén antes del filtro
		Muestras de ranas			Agua después del filtro
		Muestras de heces de ratón		La isla CPI	Agua de lavado de manos
		Muestras de heces de Lagartija			Agua de aplicación de fungicida
					Agua de lavado de manos del comedor
SILAO GUANAJUATO	La aldea SPI	Agua de riego por goteo			Agua de lavado de manos del baño
		Heces de pájaro en tomate			Agua de almacén

CPI: Con programa de inocuidad **EPCI:** En proceso de certificación de inocuidad **SPI:** Sin programa de inocuidad.

3.4 Procesamiento de las muestras obtenidas en el primer muestreo

3.4.1 Toma de muestras de aguas en campos y empaques

Previo a los muestreos se lavaron las manos con agua y jabón y se utilizaron guantes de látex esterilizados; los materiales utilizados fueron frascos de polipropileno; esterilizados con cierre hermético y capacidad de 250 mL, hieleras y hielo para su transporte.

3.4.1.1 Muestreo directo

La toma de muestras de: agua para lavado de manos, agua del área de mezclas, agua del filtro, agua de almacén antes del filtro, agua para riego por goteo y agua potable de la llave, agua potable del pozo profundo, se llevó a cabo mediante la metodología siguiente:

Primero se cercioró que el agua proviniera directamente del sistema de distribución, y se prosiguió a tomar la muestra de las llaves de paso checando que estas no tuvieran fuga alguna entre la manguera y el cuello, esto para evitar que la muestra estuviera contaminada, se dejó correr el agua aproximadamente 3 min para asegurar que el agua que contenía la tubería se hubiese vaciado totalmente y cerca del orificio de salida, se quitó al mismo tiempo el tapón del frasco, evitando que se contaminaran los frascos con sus tapas. Se dejó el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (aproximadamente 10% de volumen del frasco). Todas las muestras se etiquetaron de acuerdo al lugar, rancho, fecha, y número de repetición.

3.4.1.2 Muestreo en cuerpo de agua superficial

Para la toma de muestras de: agua de la tina 1 para el lavado de la papaya, agua de la tina 2 con cloro a 200 ppm, agua de la tina 3 con fungicida, agua del canal, agua después del filtro, agua de almacén, agua para aplicación de fungicidas foliar, agua de cisterna para riego, agua de rio, agua de membrana para la aplicación de plaguicidas y agua del canal, se realizó usando la metodología siguiente:

Se tomó el frasco y se sumergió en el agua con el cuello hacia abajo hasta una profundidad aproximada de 15 a 30 cm, se abrió y enderezo con el cuello hacia arriba, una vez que se obtuvo la muestra se colocó la tapa y se sacó del agua, todas las muestras se etiquetaron (lugar, rancho, fecha, y número de repetición).

3.4.1.3 Muestreo en pozo profundo

Las muestras tomadas de: agua de pozo para riego y agua del pozo, se llevaron a cabo utilizando la metodología siguiente: debido a que en el pozo no se contaba con una llave o válvula de desfogue, la muestra se tomó atando al frasco un sobrepeso usando el extremo de un cordel limpio, se quitó la tapa evitando que se contaminara el cuello del frasco o la tapa, se mantuvo el cuello del frasco hacia abajo y se procedió a tomar la muestra, bajando el frasco lentamente evitando que tocara las paredes del pozo, una vez tomada la muestra, se sacó y se le colocó la tapa, todas las muestras se etiquetaron (lugar, rancho, fecha, y repetición).

3.4.1.4 Manejo de las muestras

Las muestras se colocaron en una hielera con bolsas de hielo para su transporte al laboratorio, a una temperatura aproximada de entre 4 y 10 ºC.

3.4.1.5 Colecta de heces fecales en animales

Los animales que se encontraron en las áreas de campo y empaque fueron, rana, ratón, aves (pájaros), y lagartija (familias *Lacertidae y Gekkonidae*), para obtener la muestra se realizó la captura de los mismos, utilizando técnicas para no poner en riesgo su vida ni su salud, para esto se capturaron con ayuda de personas aledañas al lugar se sujetó al animal y en el área anal se introdujo el hisopo, se rotó para hacer la toma de muestra, se mantuvo allí durante 30 segundos para que se absorbieran los microorganismos y después se retiró y se guardó en una hielera para conservar la muestra fresca, posteriormente se rotuló y se procesó en el laboratorio.

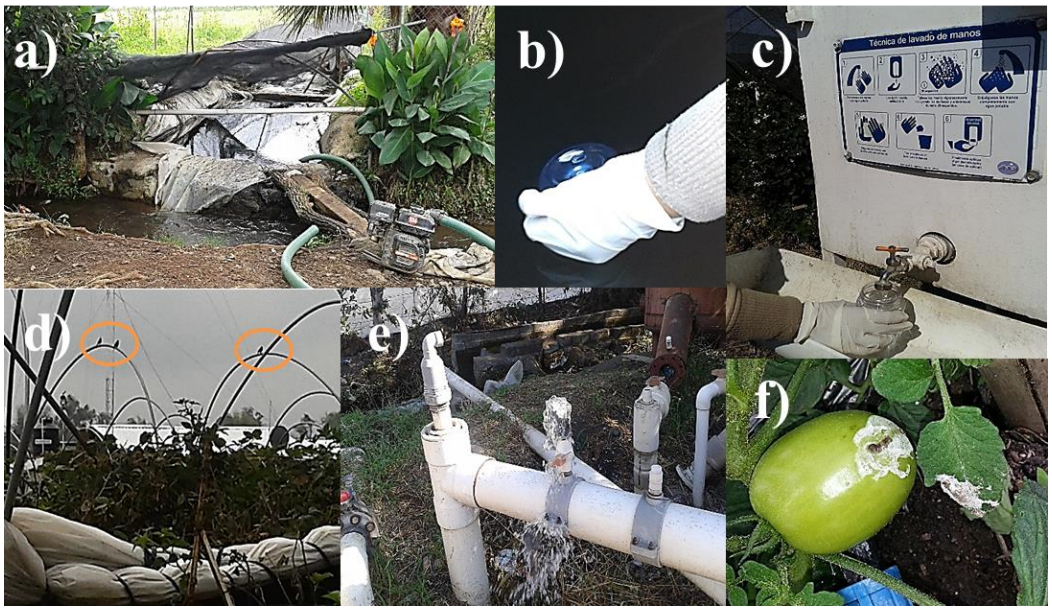

Figura 1. a) Agua para aplicación de fungicidas foliar, b) agua de cisterna para riego c) Agua para lavado de manos d) Animales presentes en los cultivos de frutillas e) agua de pozo profundo f) Heces fecales presentes en la parcela de jitomate.

3.4.1.6 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Posgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Téxcoco Estado de México, localizada a una altitud de 2,250 metros, en las coordenadas geográficas de 19º 29’ de Latitud Norte y 98º 53’ Longitud Oeste. Donde cada muestra se procesó por separado para evitar contaminación cruzada; se ajito cada uno de los frascos y con una aguja de insulina se tomó 1 mL de agua y se colocó en cajas con medio Mac Conkey (MCA), el agua se dispersó en la caja con un triángulo de vidrio estéril, y se dejó incubando a 32 °C durante 72 h para proceder a su análisis (presencia o ausencia de *E.coli* y *Salmonella*).

Las muestras de heces fecales, se rayaron en cajas Petri con medio Mac Conkey (MCA), se dejaron incubando a 32 °C durante 72 h para proceder a su análisis (presencia o ausencia de *E.coli* y *Salmonella*) (Figura 2).

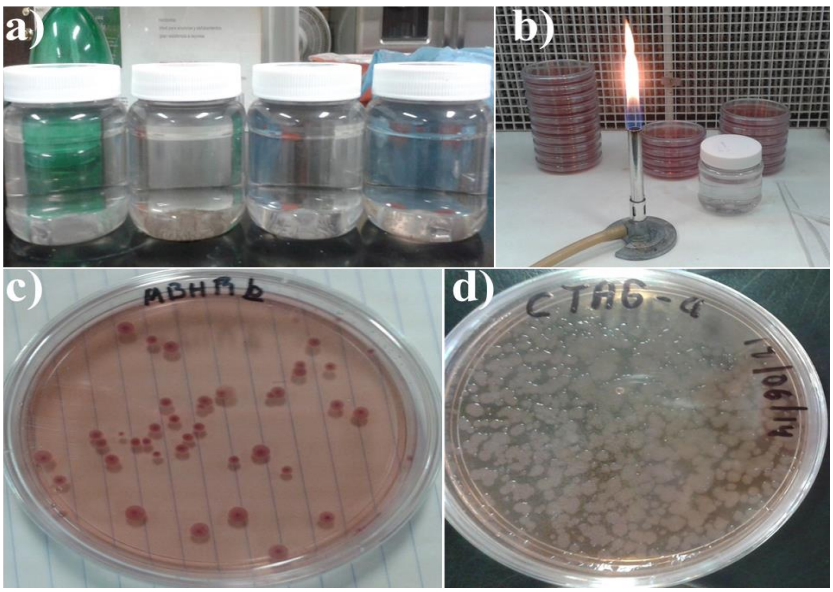

Figura 2. a) Muestras de agua, b) aislamiento de las muestras, c) Colonias de *E. coli*, y d) colonias de *Salmonella*.

3.5 Procesamiento de las muestras obtenidas en el segundo muestreo

3.5.1 Toma de muestras de aguas en campos y empaques

Al igual que el primer muestreo se lavaron las manos con agua y jabón y se utilizaron guantes de látex esterilizados; los materiales utilizados fueron frascos de polipropileno; esterilizados con cierre hermético y capacidad de 250 mL, hieleras y hielo para su transporte.

3.5.1.1 Muestreo directo

Para las muestras que se tomaron de: agua para lavado de manos, agua de lavado de manos del baño, agua de lavado de manos del comedor, agua del lavabo ubicado en la parcela, agua del área de mezclas, agua del filtro, agua de almacén antes del filtro, agua de riego de goteo, agua potable y agua potable del pozo profundo, se utilizó la metodología antes descrita (primer muestreo).

3.5.1.2 Muestreo en cuerpo de agua superficial

La toma de muestras de: agua de la tina 1 para el lavado de la papaya, agua de la tina 2 con cloro a 200 ppm, agua de la tina 3 con fungicida, agua después del filtro, agua de almacén, agua para aplicación de fungicidas, agua de membrana y agua del canal, se llevó a cabo mediante el uso de la metodología referida en el primer muestreo.

3.5.1.3 Muestreo en pozo profundo

Las muestras de agua de pozo para riego y agua del pozo se muestrearon siguiendo la metodología descrita en el primer muestreo.

3.5.1.4 Manejo de las muestras

Las muestras se colocaron en una hielera con bolsas de hielo para su transporte al laboratorio, a una temperatura aproximada de 4-10 ºC.

Figura 3. a) Agua de pozo profundo b) Agua para aplicación de fungicidas foliar c) Agua de membrana d) Agua para lavado de manos.

3.5.1.5 Colecta de heces fecales en animales

Los animales que se encontraron en las áreas de campo y empaque fueron, rana, ratón, aves (pájaros, palomas), gato, perro, caballo y lagartija (familias *Lacertidae y Gekkonidae*), para obtener las muestras se realizó la metodología descrita en el primer muestreo.

3.5.1.6 Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron llevadas y procesadas con la misma metodología que descrita anteriormente (Figura 4).

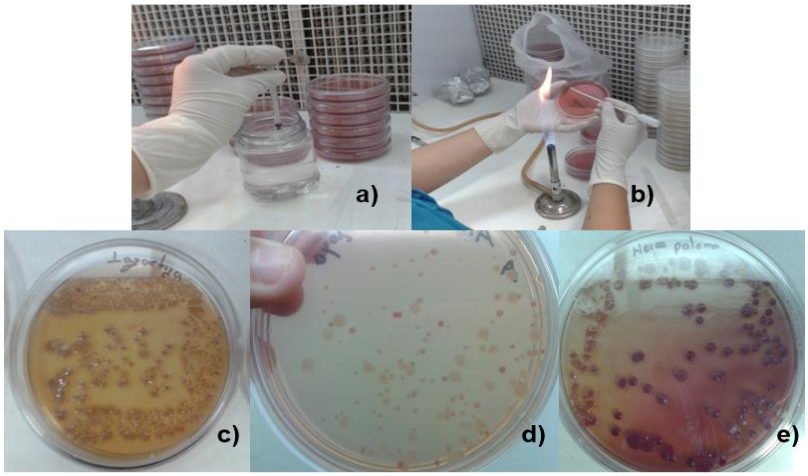

Figura 4. a) Aislamiento de las muestras de agua. b) aislamiento de las muestras de heces de animales c) Colonias de *Salmonella* d) colonias de *Salmonella* y *E.coli* e) colonias de *E.coli*.

3.6 Análisis de las bacterias

Se observó cada una de las cajas para verificar la presencia de *E.coli* (colonias color rosa) y *Salmonella* (colonias color salmón). Se tomaron las bacterias y se rayaron en cajas nuevas con medio MCA para purificar he incrementar la colonia haciendo dos repeticiones por cada una de ellas, y se incubaron durante 72 h a 34 °C; la primera repetición se utilizó para la extracción de DNA y la segunda repetición para conservar la bacteria (Figura 5).

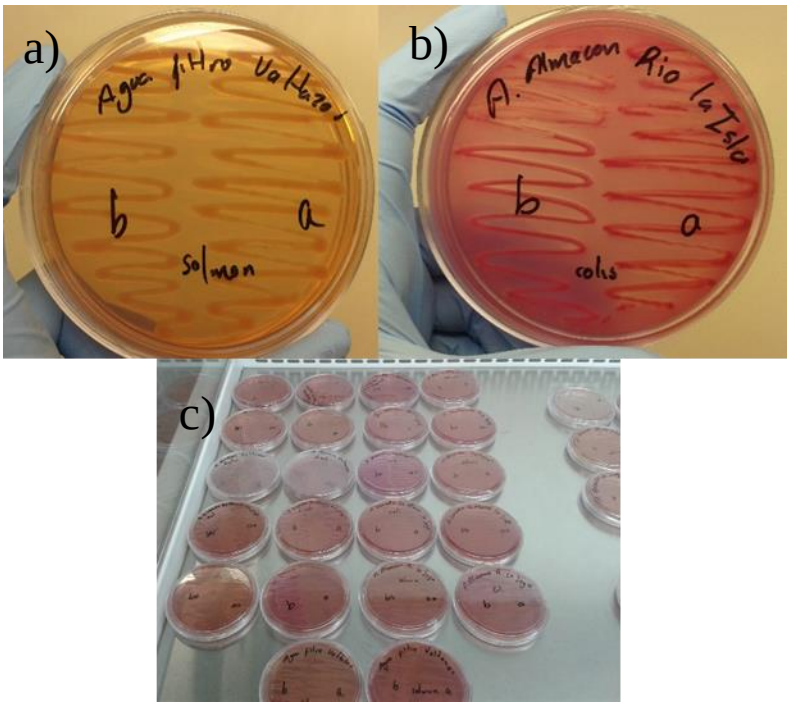

Figura 5. a) Colonias de *Salmonella*, b) colonias de *Salmonella* y *E.coli*, c) colonias de *E.coli*.

3.7 Conservación de las bacterias

Se extrajo toda la bacteria de la caja Petri con una asa bacteriológica y se colocó en un tubo vial con capacidad de 15 mL con 5 mL de medio Luria Bertani (LB) y se dejó en agitación constante, una vez transcurrido ese tiempo con la ayuda de una micropipeta fue transferida la solución a tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugada a 7 000 rpm durante 7 min hasta obtener la cepa y eliminar el medio de cultivo. A fin de descartar los restos del medio se dieron 3 lavados utilizando 1000 µL de agua destilada estérilizada se dio un vórtex entre cada uno de ellos y se centrifugó a 7000 rpm durante 7 min, una vez obtenida la cepa limpia se agregaron 1000 µL de glicerol al 30% y se dio un vórtex, después se reposo durante 2 horas a temperatura ambiente y finalmente los cepas se almacenaron a 4 °C.

3.8 Extracción de ADN

La extracción se realizó utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit marca Promega con las indicaciones siguientes:

Con ayuda de un asa bacteriológica se recolecto la bacteria de la caja petri y se agregó a un tubo Eppendorf de 2 mL, se le adicionaron 600 µL de la solución de lisis y se mezcló suavemente. Los tubos se incubaron durante 5 minutos a 80 °C, y después se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 3 µL de RNAsa y se mezcló, inmediatamente se incubo a 37 °C durante 1 hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A fin de precipitar las proteínas se agregó 200 µL de la solución precipitación de proteínas y se homogenizó con un vórtex, se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio que contiene 600 µL de isopropanol y se mezcló. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min y el sobrenadante es decantado. Después se agregaron 600 µL de etanol al 70 % y se centrifugó durante 10 minutos a 13 000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó volatilizar el etanol invirtiendo el tubo durante 15 minutos, después se rehidrató el DNA en 100 µL de TE (solución rehidratante) y se almacenaron a 4 °C.

3.9 Cuantificación y calidad del DNA

Los productos de ADN se cuantificaron con el programa Quantity One® utilizando un Nanodrop espectrofotómetro ND 1000® (Accesolab S.A. de C. V.) y para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % donde se cargó 3 µL de la muestra de DNA (Stock) mezclado con buffer de carga (2 µL) en cada pozo

del gel de la cámara horizontal. El tiempo de corrida fue aproximadamente de 1 h a 115 volts. Posteriormente, el gel de agarosa se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 5 min, y después se enjuagó en agua destilada por 3 min (en recipientes). En seguida se colocó en el foto documentador.

3.10 Amplificación de fragmentos (PCR)

Para corroborar que las muestras obtenidas eran bacterias se hizo la amplificación del gen 16S utilizando los siguientes primers 8F (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC A 3') y U1942R (5'ACC TTG TTA CGA CTT 3'), donde se esperó un fragmento de 1500 pb, la mezcla de reacción se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers 8F y U1942R

Reactivos	**Concentración**	**Volumen/tubo**
Buffer	10X	2.5 µL
$MgCl_2$	50 mM	0.75 µL
dNTP´s	500 mM	5.0 µL
Primer1	10 pM/ µL	2.0 µL
Primer2	10 pM/ µL	2.0 µL
HPLC	Ajustar a 25 µL	Ajustar a 25 µL
Taq	5U/ µL	0.3 µL
DNA	50 µg/µL	2.0 µL

Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Ampplied Biosystems) con las siguientes condiciones para ambos pares de primer: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, 35 ciclos (95 °C por 1 min; 52 °C por 1 min; 72 °C por 2 min), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min- 4 °C.

Con la finalidad de identificar el género de *Salmonella* se utilizaron 2 iniciadores Salm3 $^{5`}$GCT-GCG-GCG-CAA-CGG-CGA-AG$^{3`}$ y Salm4 $^{5´}$TCC-CGG-CAG-AGT-TCC-CAT-T$^{3'}$, donde se esperó un fragmento de 387 pb, esto se llevó acabo con el kit Go Taq® Flexi NA Polymerase de la marca Promega las mezclas se observan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers Salm3 y Salm4.

Reactivos	**Concentración**	**Volumen/tubo**
Buffer	10X	2.5 µL
$MgCl_2$	2.5 mM	2.5 µL
dNTP´s	500 mM	10 µL
Primer SK7	10 pM/ µL	2.0 µL
Primer SK8	10 pM/ µL	2.0 µL
HPLC	Ajustar a 25 µL	Ajustar a 25 µL
Taq	1.5U/ µL	0.5 µL
DNA	20 µg/µL	2.0 µL

Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Ampplied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C por 1 min, 30 ciclos (94 °C por 30 seg; 62 °C por 30 seg; 72 °C por 2 min), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min.

Con la finalidad de identificar el serotipo de *E. coli* O157:H7 se utilizaron los primers SK7 ($^{5´}$CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC$^{3´}$) y SK8 ($^{5´}$CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG$^{3´}$) donde se espera un fragmento de 285 pb, la mezcla de reacciones se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Mezcla de reacciones para la amplificación de los primers SK7 y SK8.

Reactivos	Concentración	Volumen/tubo
Buffer	10X	2.5 µL
$MgCl_2$	2.5 mM	2.5 µL
dNTP´s	500 mM	10 µL
Primer SK7	10 pM/ µL	2.0 µL
Primer SK8	10 pM/ µL	2.0 µL
HPLC	Ajustar a 25 µL	Ajustar a 25 µL
Taq	1.5U/ µL	0.5 µL
DNA	20 µg/µL	2.0 µL

Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Ampplied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C por 30 s, 30 ciclos (54 °C por 30 seg; 62 °C por 30 seg; 72 °C por 40 s), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min.

Todos los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% con amortiguador de corrida TAE, a 90V durante 45 min; las imágenes fueron documentadas empleando el programa Quanty One (Bio-Rad®).

3.11 RFLP (Corte con enzimas de restricción)

Se seleccionaron enzimas que reconocen secuencias de 4 y 6 pb para incrementar la probabilidad de corte en el fragmento amplificado 16S, las enzimas que se utilizaron se muestran en el cuadro 10. Para estimar los fragmentos esperados y generados por las enzimas, se recurrió a la búsqueda de las bacterias de interés y corte virtual en accesiones reportadas en el GenBank.

Cuadro 10. Corte con enzimas de restricción *Eco*RI, *Sma*I y *Hha*I del Gen 16S en *Salmonella* y *E. coli.*

Salmonella				
Enzima	**Secuencia**	**Cortes**	**Posición del corte**	**Fragmentos esperados**
*Eco*RI	G'AATT_C	1	648	648, 818
*Sma*I	CCC'GGG	2	588,1358	588,770,108
E. coli				
Enzima	**Secuencia**	**Cortes**	**Posición del corte**	**Fragmentos esperados**
*Eco*RI	G'AATT_C	1	669	669, 834
*Hha*I	G_CG'C	5	375, 572, 1103, 1239, 1456	375,197,531,136,217, 47
*Sma*I	CCC'GGG	2	609, 1379	609, 770, 127

Cuadro 11. Las reacciones de RFLP se realizaron con un volumen final de 20 µL

Reactivos	**Concentración inicial**	**Volumen final**
Enzima	12 U	6.7 µL
Buffer	10 X	134 µL
HPLC	15.85	1065.3 µL
Total	1206 µL/ 67 (reacciones)= 18 µL +2 µL de DNA= 20 µL por reacción	

Las temperaturas de incubación de las enzimas son: Para *Eco R*I 37 °C para *Sma*I 25 °C y para *Hha*I 37 °C, durante 24 horas.

3.11.1 Gel de acrilamida

Para la separación de los fragmentos amplificados, se utilizó una cámara vertical C.B.S. Scientific CO® modelo MVG-216-33 con una fuente de poder E-C Apparatus Vorporations®, Modelo EC-105. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol al 70% y papel Kim Wipes®. La preparación del gel de acrilamida fue bajo la campana de extracción de gases y guantes, a una concentración de 6% del gel (Cuadro 12). Se utilizó

un aplicador de 100 mL para vaciar la acrilamida en los cristales y se colocó un peine con 40 pozos, dejándolo polimerizar por completo. Después los cristales se colocaron en la cámara en forma de sándwich (dos por cámara) con TBE 1X y se cargaron con 10 µL de la muestras (mezcladas previamente con 3 µL buffer de carga 5x Gr azul de bromofenol) y se corrió a 245 voltios por 1.30 h.

Los geles se revelaron con las siguientes soluciones en agitación constante: 1) Solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 1%) durante 10 min y se retiró. 2) Solución de tinción de plata (nitrato de plata al 0.2%) durante 10 min y se retiró. 3) Enjuague con agua destilada por 15 s con la ayuda de una piseta y 4) se aplicó la solución reveladora (Hidróxido de sodio al 3%) con formaldehido (100 µL por cada 100 mL) hasta la visualización de las bandas. Las imágenes fueron documentadas con una cámara digital.

Cuadro 12. Preparación para una placa de 60 mL.

Volumen 100 mL	Al 6.0%
Acrilamida 30%	13 mL
Agua destilada	35 mL
TBE 5X	12 mL
APS (Amonium persulfate) 10%	420 µL
TEMED (NNNN Tetramethylethylenediamine 99%)	35 µL

3.12 Análisis estadístico de fragmentos RFLPs y construcción de dendogramas de las bacterias

Con las matrices codificadas se elaboró el árbol consenso de datos en el programa Free Tree versión 0.9.1.50 y se emplearon los mismos métodos de análisis estadístico recomendados para datos moleculares: Índice de similitud de Dice, el método de agrupación de UPGMA y el método de re muestreo (bootstrapping) con 1000 repeticiones. Para visualizar dicho árbol se utilizó el programa TreeView 1.6.6.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección de *Salmonella* y *E. coli* en medio de cultivo MCA

En el Cuadro 13 se indica la presencia y/o ausencia de *Salmonella* y *E. coli* de las muestras que sé tomaron y se asilaron en el medio selectivo Mac Conkey (MCA), de los Ranchos ubicados en Los Reyes, Michoacán, Tecomán, Colima y Silao, Guanajuato.

En general se apreció que en la mayoría de los lugares de muestreo, se encontró a *Salmonella* con una incidencia de 50% y a *E. coli* en un 64%. Los Ranchos con mayor presencia de *E.coli* fueron la Isla (Zarzamora) y Baltazar (Zarzamora) en los Reyes, Michoacán con una incidencia de 100 y 80% respectivamente, para el caso de *Salmonella* la mayor presencia se observó en el Rancho la Joya (Zarzamora) en los Reyes, Michoacán, con una incidencia de 80% y en el Rancho Salvador (Papaya) en proceso de certificación de Tecomán, Colima con una incidencia de 75%. Los resultados observados demuestran que las fuentes de agua no garantizan una calidad sanitaria o de inocuidad adecuada en la producción y manejo de las frutillas, papayas y jitomates, por lo que se deben establecer programas preventivos y correctivos muy rigurosos como las buenas prácticas agrícolas (BPA y BPM) en las unidades de campo y unidad de empaque en Los Reyes, Michoacán, Tecomán, Colima y Silao, Guanajuato.

Es importantes hacer notar que el agua para el lavado de manos no presento riesgos biológicos (*Salmonella* y *E. coli* y), ni el agua de la tina 2 que contenía cloro a 200 ppm y ni el agua de pozo profundo pasada por el filtro del Rancho de papaya del Ing. Tamez en Tecomán, Colima. Sin embargo el agua de la tina 1 y 2 que se utilizó para el lavado de la fruta y para la aplicación de fungicidas si estaba contaminada. Razón por lo cual de

nada sirvió la aplicación de Cloro, ya que las frutas se contaminaron previamente en la tina 1 y se reinfectaron en la tina 3. Por tanto, se recomienda usar cloro o usar otro método de desinfección en todos los procesos en donde la fruta este en contacto con el agua, de lo contrario ocurre la contaminación cruzada.

En seguida se enlistan los lugares de muestreo en donde no hubo detección de riesgos biológicos, dichos lugares fueron: Agua de pozo para riego en el rancho el Retoño y en el agua para el lavado de manos en el rancho el Salvador en Tecomán, Colima. Así como en el agua de riego por goteo en La Aldea en Silao, Guanajuato.

Cuadro 13. Presencia y/o ausencia de *E. coli* y *Salmonella* en medio Mac Conkey (MCA), en las muestras de agua y heces fecales tomadas en las diferentes unidades de producción,

Estado	**Rancho**	**Nombre de la muestra**	***E. coli***	***Salmonella***
TECOMAN COLIMA	Ing. Tamez CPI	Agua para lavado de manos	-	-
		Agua del lavabo ubicado en la parcela	-	-
		Riego de goteo	+	+
		Tina1 para el lavado de la papaya	+	+
		Tina 2 cloro a 200 ppm	-	-
		Tina 3 con fungicida	+	-
		Agua saliente del filtro	-	-
	El retoño CPI	Área de mezclas	+	-
		Agua de pozo para riego	-	-
		Agua del filtro	+	+
	Salvador en proceso de certificación EPCI	Agua del pozo	-	+
		Agua del canal	+	+
		Agua para lavado de manos	-	-
		Muestras de heces de rana	+	-
		Muestras de heces de ratón	+	+
		Muestras de heces de lagartija	+	+
LOS REYES MICHOACAN	Baltazar CPI	Agua potable	+	-
		Agua de Rio	+	+
		Agua del filtro	+	+
		Agua de almacén	+	-
		Agua de lavado de manos	-	+
	La Isla CPI	Agua de lavado de manos	+	-
		Agua de aplicación de plaguicidas,	+	+

		membrana		
		Agua de rio	+	-
		Agua de cisterna para riego	+	-
		Agua para aplicación de fungicidas foliar	+	+
	La joya CPI	Agua de membrana	-	+
		Agua de almacén	-	+
		Agua para el lavado de manos	+	+
		Agua de almacén antes del filtro	+	-
		Agua después del filtro	+	+
SILAO, GUANAJUATO	La aldea SPI	Agua de riego por goteo	-	-
		Heces de pájaro en tomate	+	+

CPI: Con programa de inocuidad **EPCI:** En proceso de certificación de inocuidad **SPI:** Sin programa de inocuidad.

4.2. Detección molecular de *Salmonella* y *E. coli*

4.2.1 Calidad y cantidad de DNA

Se obtuvieron 61 muestras de DNA, de las cuales, 42 correspondieron a los ranchos de Michoacán, 18 de Tecomán, Colima y una de Silao, Guanajuato. Las 61 muestras de DNA obtenidas fueron de buena calidad, sus concentraciones fluctuaron de 12.12 a 688.00 ng/µL. Lo anterior índico que la calidad era buena y se podía continuar con las pruebas de PCR (Cuadro 14).

Cuadro 14. Resultados obtenidos del nanodrop.

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Ratón	634.28	1.26	0.31
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Ratón	530.64	1.57	0.77
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de gallina	79.12	1.9	1.13
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de gallina	51.54	1.57	0.54

RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Lagartija	542.4	1.59	0.77
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Lagartija	226.98	1.48	0.49
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Heces de paloma	547.72	1.23	1.05
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Heces de paloma	688.07	1	0.22
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Heces de Gato	425.11	1.56	0.73
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Heces de Gato	793.01	1.89	1.14
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Ratón	577.52	1.22	1.2
RANCHO SEÑOR SALVADOR TECOMAN COLIMA Heces de Ratón	242.92	0.98	0.35
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN heces de perro	12.12	1.44	0.3
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN heces de perro	151.37	1.26	0.33
RANCHO LA ALDEA, SILAO, GUANAJUATO Heces de pájaro en tomate	483.82	1.29	0.79
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Heces de paloma	147.31	1.56	0.56
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Heces de paloma	308.06	1.76	0.96
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua de riego por goteo	138.08	1.34	0.35
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua de riego por goteo	222.93	1.33	0.4
RANCHO ING. TAMEZ Agua de riego por goteo	61.2	1.76	0.66
RANCHO ING. TAMEZ Agua de riego por goteo	270.47	1.89	1.06
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	77	1.84	0.86
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	88.92	1.76	0.77
RANCHO ING. TAMEZ Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado	144.2	2.03	1.47
RANCHO ING. TAMEZ Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado	204.62	1.89	0.95
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Heces de Gallina	181.08	1.49	0.64
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Heces de Gallina	495.62	1.77	1.06
RANCHO SALVADOR TECOMAN COLIMA Agua del pozo de riego	222.33	1.72	0.85

RANCHO SALVADOR TECOMAN COLIMA Agua del pozo de riego	18.42	1.89	0.95
RANCO EL RETOÑO Agua de la área de mezclas	26.57	1.67	0.67
RANCO EL RETOÑO Agua de la área de mezclas	55.77	1.83	0.83
RANCO EL RETOÑO Agua potable de pozo profundo	19.9	1.87	1.05
RANCO EL RETOÑO Agua potable de pozo profundo	20.01	1.78	0.87
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de Almacén antes del filtro	82.59	1.99	2.04
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de Almacén antes del filtro	30.99	2.05	3.23
RANCHO BALTAZAR LOS REYES Agua potable	102.29	1.99	2.02
RANCHO BALTAZAR LOS REYES Agua potable	125.82	2.02	2.14
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua potable del pozo profundo	73.58	2.02	1.83
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua potable del pozo profundo	3.93	1.66	30500.67
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	154.72	2.08	2.63
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	87.54	2.07	2.84
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua del Almacén	552.99	1.9	1.75
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua del Almacén	129.12	1.93	1.78
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua para la aplicación de fungicidas	401.54	1.67	0.89
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua para la aplicación de fungicidas	111.47	1.92	1.42
RANCHO BALTAZAR LOS REYES Agua de canal	20.94	2.06	3
RANCHO BALTAZAR LOS REYES Agua de canal	282.87	1.84	1.04
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de Almacén antes del filtro	212.04	1.93	2.09
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de Almacén antes del filtro	145.63	1.96	1.95
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	75.74	2.11	2.46
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua de lavado de manos	24.85	2.07	3.18
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua potable del pozo profundo	34.67	1.99	2.21
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua potable del pozo profundo	184.4	2.08	1.94

RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua del Almacén	58.12	2.02	2.75
RANCHO DE BALTAZAR LOS REYES MICHOACAN Agua del Almacén	229.73	1.83	1.27
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de la membrana	64.49	1.76	1.04
RANCHO LA JOYA LOS REYES MICHOACAN Agua de la membrana	113.19	1.98	1.65
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua del almacén	96.02	1.94	1.38
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua del almacén	535.5	1.88	1.82
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua para la aplicación de fungicidas	148.79	1.96	1.85
RANCHO LA ISLA LOS REYES MICHOACAN Agua para la aplicación de fungicidas	210.94	1.92	1.76

4.2.2 PCR

4.2.2.1 Identificación de las bacterias mediante el gen 16S

Los productos amplificados de PCR obtenidos con los primers 8 F y U1492R (Kolmodin y Willians, citado por Luna 2013 y Ramírez, 2013), se visualizaron en un gel de agarosa. En la Figura 6 y 7 se observó que la mayoría de los productos amplificados, mostraron un fragmento de aproximadamente a 1500 pb. Sin embargo se observó que las muestras 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 20 y 21 no amplificaron el fragmento del gen 16S, por lo tanto se podría deducir que no son bacterias o en su defecto que podrían estar contaminadas, esto no se puede asegurar sin antes realizar estudios más minuciosos. Los productos que si amplificaron demuestran que si tenemos bacterias, pero estas pueden ser de diferentes especies, ya que se observan diferentes fragmentos, tal es el caso de las muestras 2 y 3 estas están un poco más abajo que las muestras 4 y 5, y estas están un poco más abajo

que las muestras 9 y 10. Por esta razón se decidió corroborar realizando cortes con enzimas de restricción.

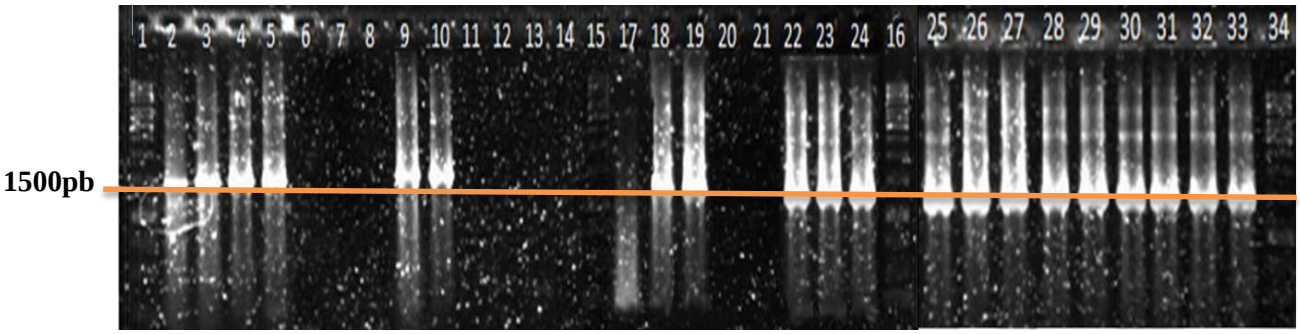

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores 8 F y U1492R para la amplificación del gen 16S.

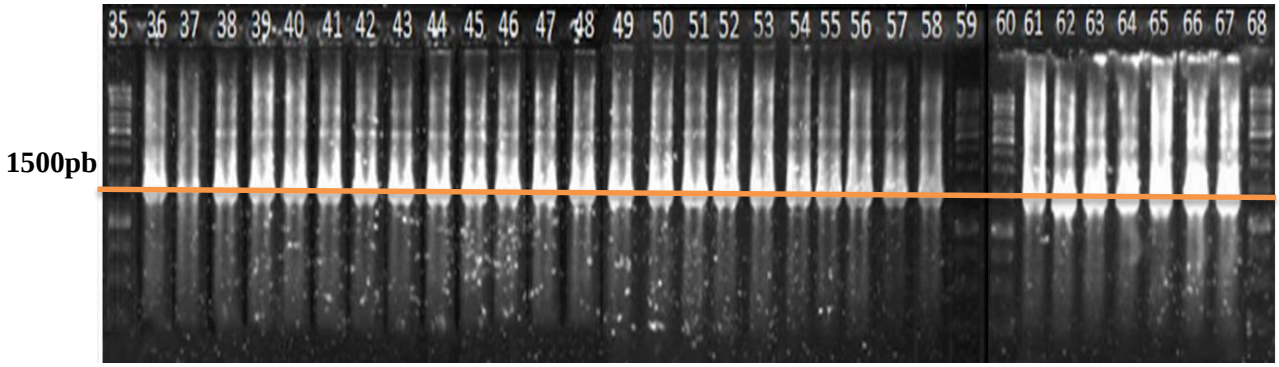

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores 8 F y U1492R para la amplificación del gen 16S.

En el cuadro 15 se muestra la referencia y la procedencia de las muestras obtenidas en los diferentes lugares de muestreo (unidades de producción y empaques) y su relación con el DNA obtenido e indicado en las Figuras 6 y 7.

Cuadro 15. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 6 y 7.

1.-Marcador	23.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	46.-Agua del Almacén REY Isla
2.-Heces de Ratón TEC Sal	24.-Agua de lavado de manos REY Bal	47.-Agua del Almacén REY Isla
3.-Heces de Ratón TEC Sal	25.-Agua de lavado de manos REY Bal	48.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
4.-Heces de gallina TEC Sal	26.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	49.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
5.-Heces de gallina TEC Sal	27.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	50.-Agua de canal REY Bal
6.-Heces de Lagartija TEC Sal	28.-Heces de Gallina REY Bal	51.-Agua de canal REY Bal
7.-Heces de paloma REY Bal	29.-Heces de Gallina REY Bal	52.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
8.-Heces de paloma REY Bal	30.-Agua del pozo de riego TEC Sal	53.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
9.-Heces de Gato REY Joya	31.-Agua del pozo de riego TEC Sal	54.-Agua de lavado de manos REY Isla
10.-Heces de Gato REY Joya	32.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	55.-Agua de lavado de manos REY Isla
11.-Heces de Ratón TEC Sal	33.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	56.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
12.-Heces de Ratón TEC Sal	34.-Marcador	57.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
13.-Heces de perro REY Bal	35.-Marcador	58.-Agua del Almacén REY Bal
14.-Heces de perro REY Bal	36.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	59.-Marcador
15.-Marcador	37.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	60.-Marcador
16.-Marcador	38.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	61.-Agua del Almacén REY Bal
17.-Heces de pájaro en tomate Gto. Silao	39.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	62.-Agua de la membrana REY Joya
18.-Heces de paloma REY Joya	40.-Agua potable REY Bal	63.-Agua de la membrana REY Joya
19.-Heces de paloma REY Joya	41.-Agua potable REY Bal	64.-Agua del Almacén REY Isla
20.-Agua de riego por goteo REY Bal	42.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	65.-Agua del almacén REY Isla
21.-Agua de riego por goteo REY Bal	43.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	66.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
22.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	44.-Agua de lavado de manos REY Isla	67.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
	45.-Agua de lavado de manos REY Isla	68.-Marcador

REY Bal: Los Reyes Michoacán, Rancho Baltazar. **REY Isla:** Los Reyes Michoacán, Rancho la Isla. **REY Joya**: Los Reyes Michoacán, Rancho la Joya. **TEC Tamez**: Tecomán, Colima, Rancho del Ing. Tamez. **TEC Retoño:** Tecomán, Colima, Rancho el Retoño. **TEC Sal:** Tecomán, Colima, Rancho del Señor salvador **Gto. Silao**: Silao, Guanajuato, Rancho la Aldea.

4.2.2.2 Identificación de *Salmonella* mediante el gen Inva

La amplificación del gen Inva presente en *Salmonella* con los primers Salm3_Salm4 (Chacón, 2010) se visualizó en los geles de agarosa (figura 8, 9, 10); en donde se observó que las únicas muestras que amplificaron fueron 30, 31, 38, 39, 44 y 53), esto indico que en el resto de las muestras no estuvo presente *Salmonella*; Sin embargo, este resultado no sugiere la ausencia de la misma, ya que Hernández *et., al*. 2009 ha reportado que se ha detectado a *Salmonella* principalmente en muestras de agua no clorada mediante PCR y otros primers diferentes. Otra posible razón por la que no se detectaron, es porque aparentemente se tiene más de una raza o serovar de *Salmonella* en la región (Hernández, *et., al* 2009) y que por lo tanto se podrirá requerir de un primer diferente (Figura 8, 9 y 10).

De las 61 muestras analizadas, el 9.8 % (muestras 30, 31, 38, 39, 44 y 53) correspondieron a *Salmonella.*

Las muestras en donde se corroboró molecularmente la presencia de *Salmonela* correspondieron a Muestra 30 (Agua del pozo de riego TEC Sal) 31 (Agua del pozo de riego TEC Sal), 38 (Agua potable REY Bal), 44 (Agua del Almacén REY Isla) y 53 (Agua de Almacén antes del filtro REY Joya).

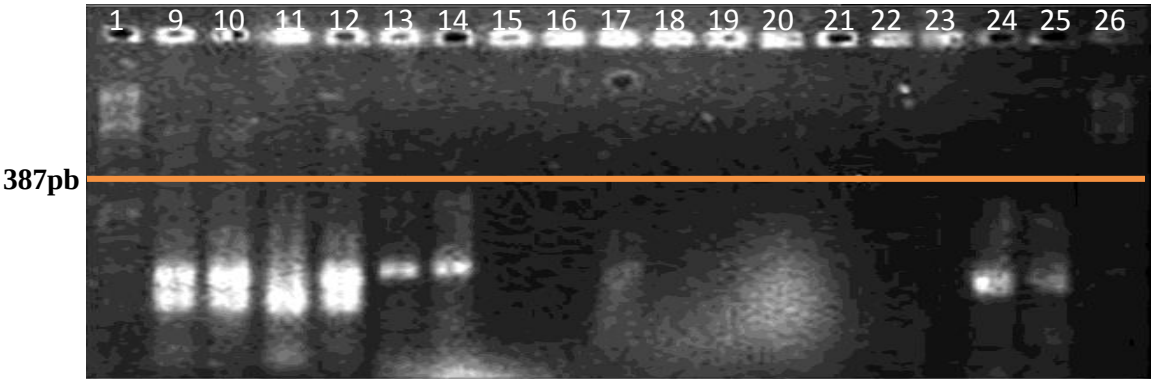

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*.

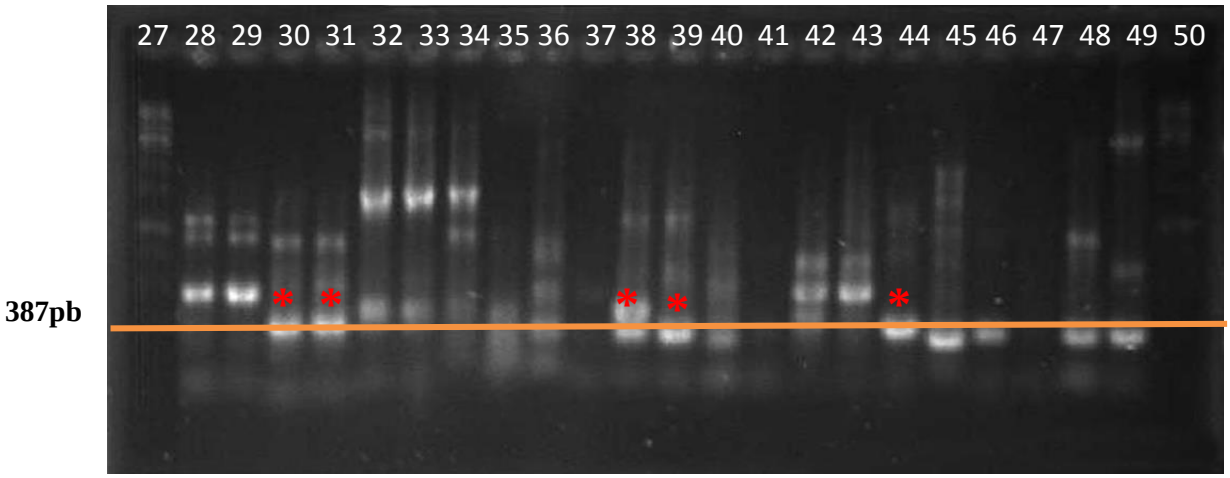

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado; sin embargo se observan otros fragmentos que más o menos están dentro del rango.

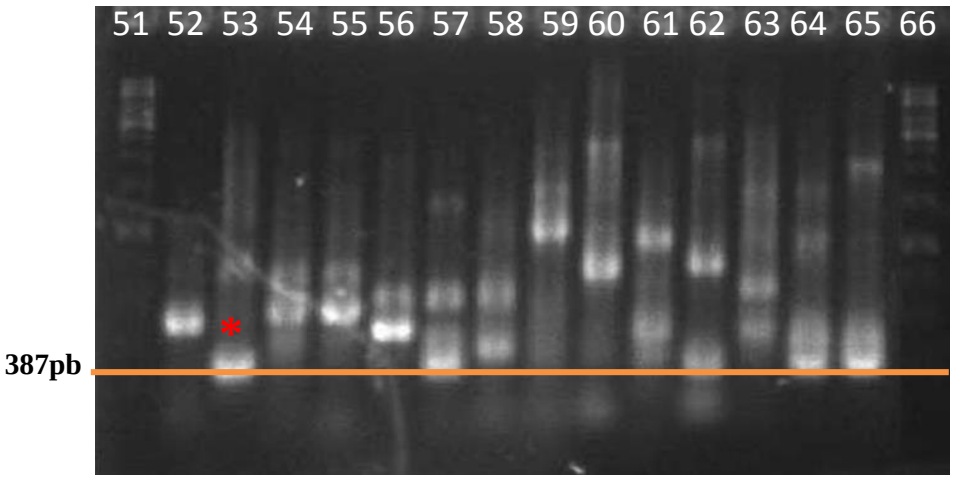

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SalmI y Salm2 para la amplificación del gen Inva en *Salmonella*. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado; sin embargo se observan otros fragmentos que más o menos están dentro del rango.

En el cuadro 16 se muestra la referencia y la procedencia de las muestras obtenidas en los diferentes lugares de muestreo (unidades de producción y empaques) y su relación con los productos de PCR obtenidos a partir de los primers utilizados Salm1 y Salm2 e indicados en las Figuras 8, 9 y 10.

Cuadro 16. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 8, 9, y 10.

1.-Marcador	23.-Agua de lavado de manos REY Bal	45.-Agua del Almacén REY Isla
2.-Heces de Ratón TEC Sal	24.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	46.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
3.-Heces de Ratón TEC Sal	25.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	47.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
4.-Heces de gallina TEC Sal	26.-Marcador	48.-Agua de canal REY Bal
5.-Heces de gallina TEC Sal	27.-Marcador	49.-Agua de canal REY Bal
6.-Heces de Lagartija TEC Sal	28.-Heces de Gallina REY Bal	50.-Marcador
7.-Heces de paloma REY Bal	29.-Heces de Gallina REY Bal	51.-Marcador
8.-Heces de paloma REY Bal	30.-Agua del pozo de riego TEC Sal	52.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
9.-Heces de Gato REY Joya	31.-Agua del pozo de riego TEC Sal	53.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya

10.-Heces de Gato REY Joya	32.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	54.-Agua de lavado de manos REY Isla
11.-Heces de Ratón TEC Sal	33.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	55.-Agua de lavado de manos REY Isla
12.-Heces de Ratón TEC Sal	34.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	56.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
13.-Heces de perro REY Bal	35.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	57.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
14.-Heces de perro REY Bal	36.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	58.-Agua del Almacén REY Bal
15.-Heces de pájaro en tomate Gto. Silao	37.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	59.-Agua del Almacén REY Bal
16.-Heces de paloma REY Joya	38.-Agua potable REY Bal	60.-Agua de la membrana REY Joya
17.-Heces de paloma REY Joya	39.-Agua potable REY Bal	61.-Agua de la membrana REY Joya
18.-Agua de riego por goteo REY Bal	40.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	62.-Agua del Almacén REY Isla
19.-Agua de riego por goteo REY Bal	41.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	63.-Agua del almacén REY Isla
20.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	42.-Agua de lavado de manos REY Isla	64.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
21.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	43.-Agua de lavado de manos REY Isla	65.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
22.-Agua de lavado de manos REY Bal	44.-Agua del Almacén REY Isla	66.-Marcador

REY Bal: Los Reyes Michoacán, Rancho Baltazar. **REY Isla:** Los Reyes Michoacán, Rancho la Isla. **REY Joya**: Los Reyes Michoacán, Rancho la Joya. **TEC Tamez**: Tecomán, Colima, Rancho del Ing. Tamez. **TEC Retoño:** Tecomán, Colima, Rancho el Retoño. **TEC Sal:** Tecomán, Colima, Rancho del Señor salvador **Gto. Silao**: Silao, Guanajuato, Rancho la Aldea.

4.2.2.3 Identificación del serotipo *E. coli* O157:H7 mediante el gen de la toxina Shiga

Se identificó el serotipo de *E. coli* O157:H7 con los primers SK7 y SK8 (Rüssmann, 1995), estos amplificaron el gen de la toxina Shiga y se esperó un fragmento de 285 pb. Debido a que prácticamente no se detectan las bandas en los geles a excepción de las muestras 43, 44, 46 y 49, se decidió correr nuevamente las muestras en un gel de acrilamida que es más sensible (Figura 12). En este gel se descartaron varias muestras y se observó con mayor claridad que las muestras 49, 28, 29, 67 y 68 fueron positivas a *E. coli* O157:H7.

De las 61 muestras analizadas, el 8 % correspondieron a *E. coli O157:H7* (muestra 49, 28, 29, 67 y 68).

Las muestras en donde se corroboró molecularmente la presencia de *E. coli O157:H7* correspondieron a la muestra 49 (Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla), 28 (Heces de Gallina REY Bal), 29 (Heces de Gallina REY Bal), 67 (Agua del almacén REY Isla) y 68 (Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla).

Aun cuando *E. coli* se considera indicador de contaminación fecal (Brooks et al., 2005), no se observaron crecimientos en las muestras aisladas de heces fecales de animales, a excepción de la muestra 28 que pertenece a Heces de gallina; Sin embargo este organismo se encuentra principalmente en ganado Vacuno, pero también se puede encontrar en mamíferos tales como: cerdos, conejos, caballos, perros, mapaches y zarigüeyas, y en aves como pollos, pavos, gansos, palomas, gaviotas y aves silvestres, pero en algunos casos, no se conoce si esta especie normalmente sirve de reservorio o si es solamente un portador temporal (Marvasi *et., al.* 2015).

El agua también se considera un vehículo potencial en la contaminación de las hortalizas, lo cual se sustenta con lo reportado con Tanaro *et al.,* (2006) quienes encontraron a *Escherichia coli* O157:H7 en aguas de ríos, y algunas cuencas.

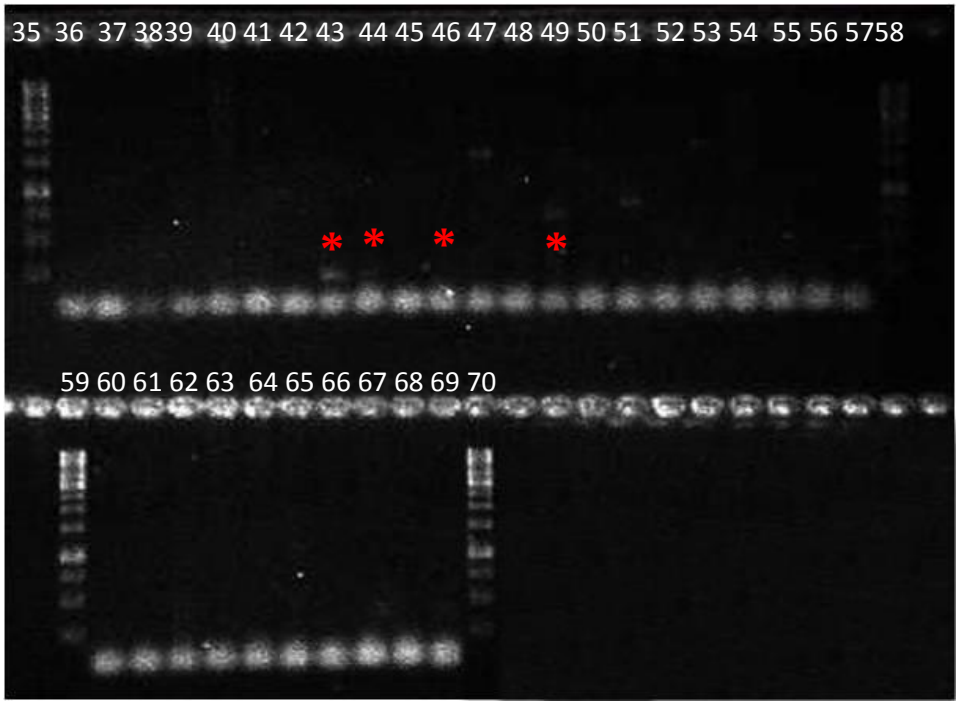

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SK7 y SK8 para la amplificación del gen de la toxina Shiga en *E. coli* O157:H7. El asterisco (*) nos hace referencia al fragmento esperado.

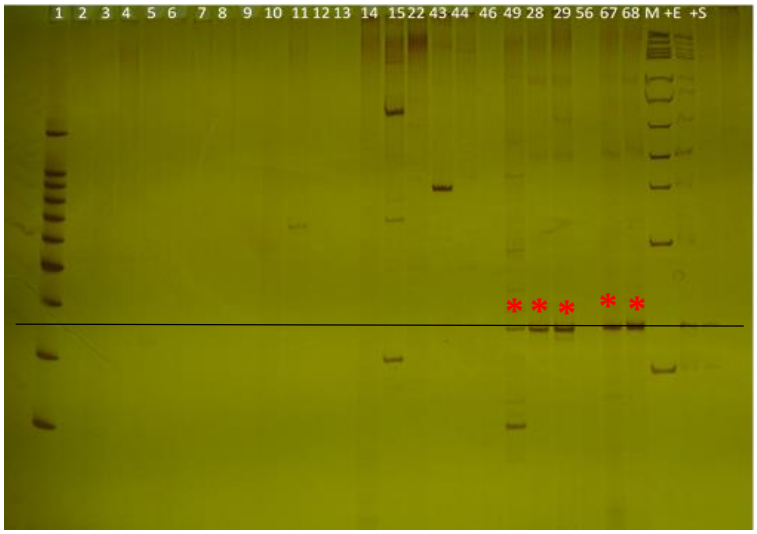

Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos obtenidos de PCR, utilizando los iniciadores SK7 y SK8 para la amplificación del gen de la toxina Shiga.

Se observa que los carriles etiquetados con el número 49, 28, 29, 67 y 68 corresponden a en *E. coli* O157:H7 porque exhiben el fragmento esperado de 285 pb.

En el cuadro 17 se muestra la referencia y la procedencia de las muestras obtenidas en los diferentes lugares de muestreo (unidades de producción y empaques) y su relación con el producto de PCR obtenidos a partir de los primers SK7 y SK8 e indicados en las Figuras 11 y 12.

Cuadro 17. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 11, 12, 13 y 14.

1.-Marcador	24.-Agua de lavado de manos REY Bal	48.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
2.-Heces de Ratón TEC Sal	25.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	49.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
3.-Heces de Ratón TEC Sal	26.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	50.-Agua de canal REY Bal
4.-Heces de gallina TEC Sal	27.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	51.- Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla repetida
5.-Heces de gallina TEC Sal	28.-Heces de Gallina REY Bal	52.- Agua de canal REY Bal repetida
6.-Heces de Lagartija TEC Sal	29.-Heces de Gallina REY Bal	53.-Agua de canal REY Bal
7.-Heces de paloma REY Bal	30.-Agua del pozo de riego TEC Sal	54.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
8.-Heces de paloma REY Bal	31.-Agua del pozo de riego TEC Sal	55.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
9.-Heces de Gato REY Joya	32.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	56.-Agua de lavado de manos REY Isla
10.-Heces de Gato REY Joya	33.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	57.-Agua de lavado de manos REY Isla
11.-Heces de Ratón TEC Sal	34.-Marcador	58.-Marcador
12.-Heces de Ratón TEC Sal	35.-Marcador	59.-Marcador
13.-Heces de perro REY Bal	36.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	60.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
14.-Heces de perro REY Bal	37.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	
15.-Marcador	38.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	61.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
16.-Marcador	39.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	62.-Agua del Almacén REY Bal
17.-Heces de pájaro en tomate Gto. Silao	40.-Agua potable REY Bal	63.-Agua del Almacén REY Bal
18.-Heces de paloma REY Joya	41.-Agua potable REY Bal	64.-Agua de la membrana REY Joya
19.-Heces de paloma REY Joya	42.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	65.-Agua de la membrana REY Joya
20.-Agua de riego por goteo	43.-Agua potable del pozo profundo	66.-Agua del Almacén REY Isla

REY Bal	REY Bal	
21.-Agua de riego por goteo REY Bal	44.-Agua de lavado de manos REY Isla	67.-Agua del almacén REY Isla
22.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	45.-Agua de lavado de manos REY Isla	68.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
23.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	46.-Agua del Almacén REY Isla	69.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
	47.-Agua del Almacén REY Isla	70.-Marcador

REY Bal: Los Reyes Michoacán, Rancho Baltazar. **REY Isla:** Los Reyes Michoacán, Rancho la Isla. **REY Joya**: Los Reyes Michoacán, Rancho la Joya. **TEC Tamez**: Tecomán, Colima, Rancho del Ing. Tamez. **TEC Retoño:** Tecomán, Colima, Rancho el Retoño. **TEC Sal:** Tecomán, Colima, Rancho del Señor salvador **Gto. Silao**: Silao, Guanajuato, Rancho la Aldea.

4.3 Corroboración molecular de *Salmonella* y *E. coli* con RFLPs

Los patrones de restricción generados a partir del fragmento del Gen 16S, presentaron polimorfismo al cortarse con las enzimas *Hha*I, *Sma*I y *EcoR*I. De acuerdo al análisis virtual, *E. coli* y *Salmonella* presentarían los fragmentos referidos en el cuadro 10.

Las enzimas de restricción fueron una herramienta muy importante para separar los grupos de *E.coli y Salmonella*, con base en los análisis RFLPs. Todas las muestras fueron cortadas con las enzimas, evidenciando diferencias entre las muestras (figuras 13, 14, 15 y 16).

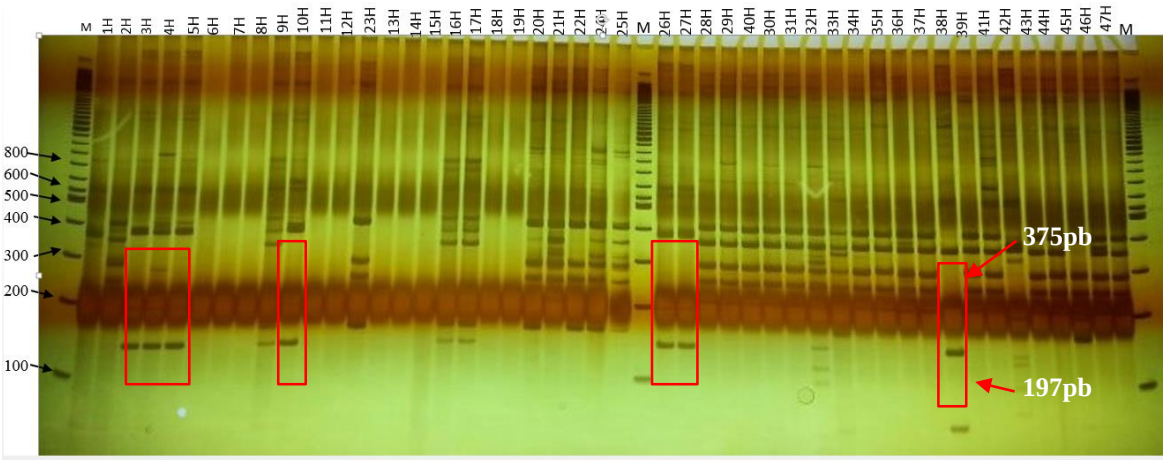

Figura 13. Perfiles RFLP del gen 16S, con la enzima *Hha*I separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 3, 4, 5, 10, 26, 27 y 38 marcados con un el rectángulo, indican la presencia de *E. coli* en función de los perfiles esperados (cuadro 10).

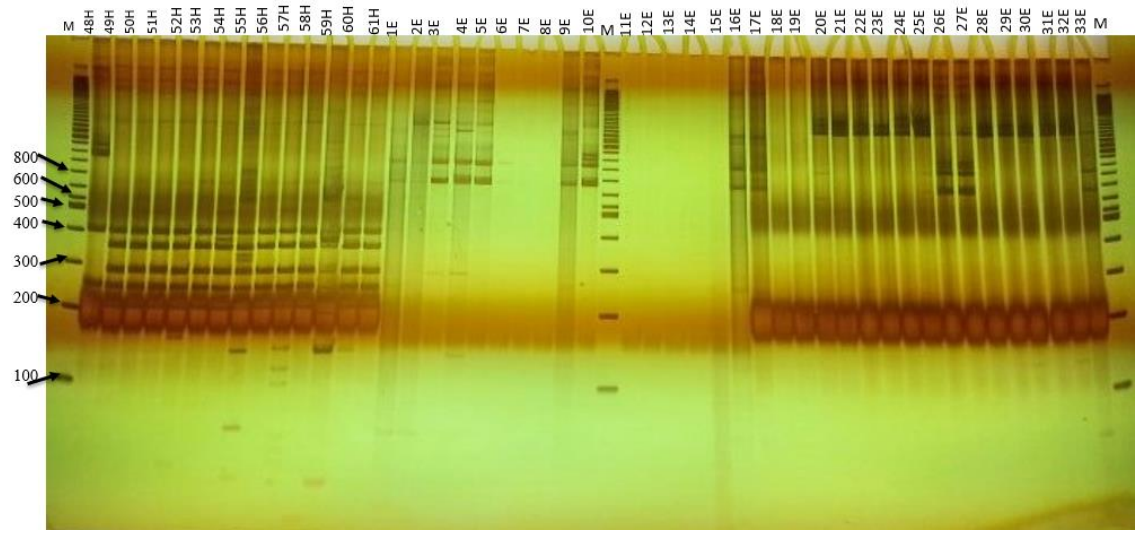

Figura 14. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *Hha*I e inicio de perfiles con *EcoR*I separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Este gel no nos indica la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en función de los perfiles esperados (cuadro 10).

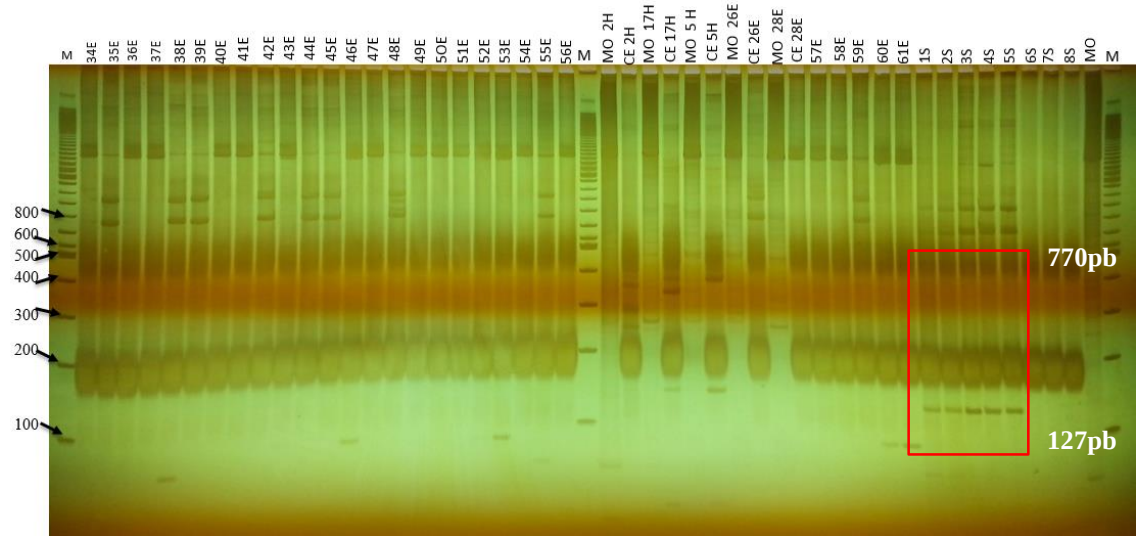

Figura 15. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *Eco*RI he inicio de perfiles con *Sma*I, separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 1, 2 3, 4 y 5 marcados con un el rectángulo, indican la presencia de *E. coli* en función de los perfiles esperados (cuadro 10).

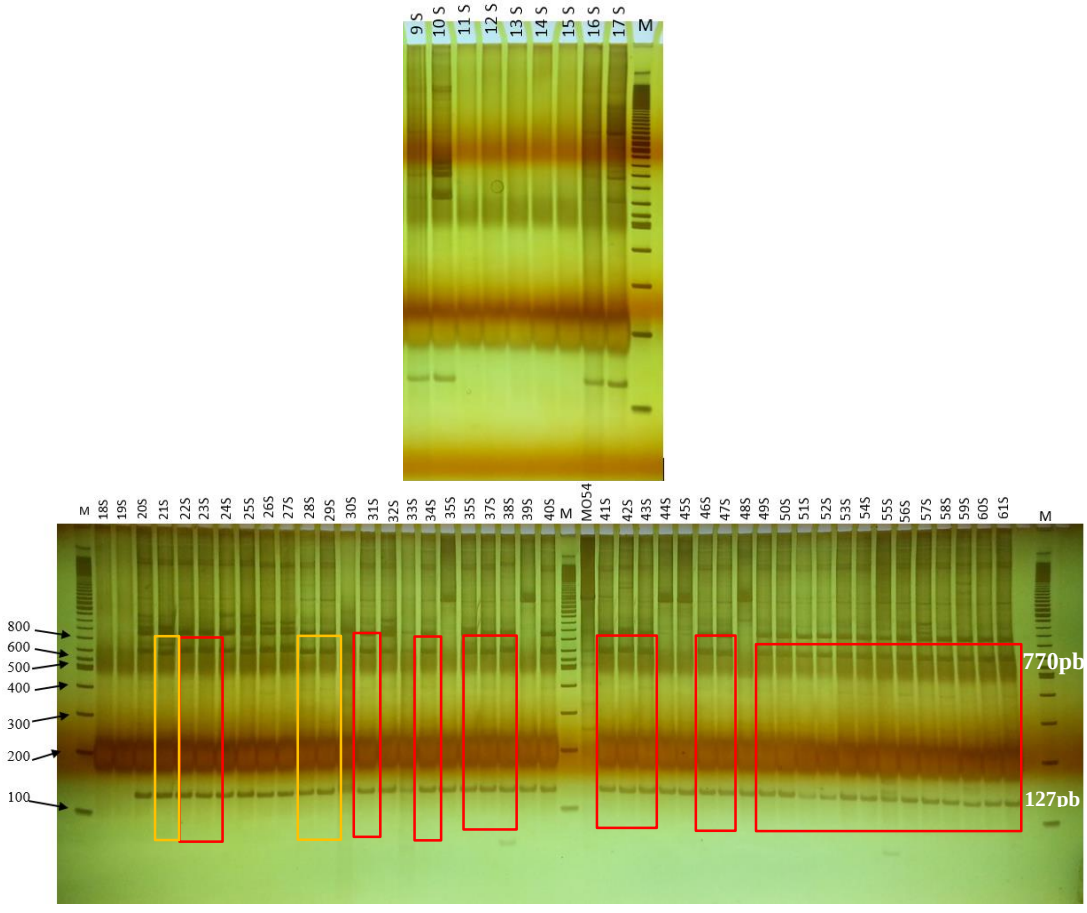

Figura 16. Continuación de los perfiles del gen 16S, con la enzima *Sma*I, separados en gel de acrilamida al 6% y un marcador de 100 pb. Los carriles 21, 28 y 29 marcados con un el rectángulo amarillo, indican la presencia de *Salmonella* en función de los perfiles esperados (cuadro 10); los carriles 22, 23, 34, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 y 61 marcados con un el rectángulo rojo, indican la presencia de *E.coli* en función de los perfiles esperados (cuadro 10).

En el cuadro 18 se muestra la referencia y la procedencia de las muestras obtenidas en los diferentes lugares de muestreo (unidades de producción y empaques) y su relación con el producto de PCR obtenidos a partir del corte con las enzimas *Hha*I, *Sma*I y *Eco*RI e indicados en las Figuras 13, 14, 15 y 16.

Cuadro 18. Referencia y procedencia de las muestras de DNA a la que pertenece cada número de los geles en las figuras 13, 14, 15 y 16.

1.-Heces de Ratón TEC Sal	25.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez	48.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
2.-Heces de Ratón TEC Sal	26.-Heces de Gallina REY Bal	49.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya
3.-Heces de gallina TEC Sal	27.-Heces de Gallina REY Bal	50.-Agua de lavado de manos REY Isla
4.-Heces de gallina TEC Sal	28.-Agua del pozo de riego TEC Sal	51.-Agua de lavado de manos REY Isla
5.-Heces de Lagartija TEC Sal	29.-Agua del pozo de riego TEC Sal	52.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
6.-Heces de Lagartija TEC Sal	30.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	53.-Agua potable del pozo profundo REY Bal
7.-Heces de paloma REY Bal	31.-Agua de la área de mezclas TEC Retoño	54.-Agua del Almacén REY Bal
8.-Heces de paloma REY Bal	32.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	55.-Agua del Almacén REY Bal
9.-Heces de Gato REY Joya	33.-Agua potable de pozo profundo TEC Retoño	56.-Agua de la membrana REY Joya
10.-Heces de Gato REY Joya	34.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	57.-Agua de la membrana REY Joya
11.-Heces de Ratón TEC Sal	35.-Agua de Almacén antes del filtro REY Joya	58.-Agua del Almacén REY Isla
12.-Heces de Ratón TEC Sal	36.-Agua potable REY Bal	59.-Agua del almacén REY Isla
13.-Heces de perro REY Bal	37.-Agua potable REY Bal	60.-Agua para la aplicación de

		fungicidas REY Isla
14.-Heces de perro REY Bal	38.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	61.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla
15.-Heces de pájaro en tomate Gto. Silao	39.-Agua potable del pozo profundo REY Bal	MO 2H.- Muestra original
16.-Heces de paloma REY Joya	40.-Agua de lavado de manos REY Isla	CE.- Corte con enzima 2H
17.-Heces de paloma REY Joya	41.-Agua de lavado de manos REY Isla	MO 17H.- Muestra original
18.-Agua de riego por goteo REY Bal	42.-Agua del Almacén REY Isla	CE 17H.- Corte con enzima
19.-Agua de riego por goteo REY Bal	43.-Agua del Almacén REY Isla	MO 5H.- Muestra original
20.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	44.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla	CE 5H.- Corte con enzima
21.-Agua de riego por goteo TEC Tamez	45.-Agua para la aplicación de fungicidas REY Isla	MO 26H.- Muestra original
22.-Agua de lavado de manos REY Bal	46.-Agua de canal REY Bal	CE 26H.- Corte con enzima
23.-Agua de lavado de manos REY Bal	47.-Agua de canal REY Bal	MO 28H.- Muestra original
24.-Agua de Tina 3 con fungicidas para lavado TEC Tamez		CE 28H.- Corte con enzima

REY Bal: Los Reyes Michoacán, Rancho Baltazar. **REY Isla:** Los Reyes Michoacán, Rancho la Isla. **REY Joya**: Los Reyes Michoacán, Rancho la Joya. **TEC Tamez**: Tecomán, Colima, Rancho del Ing. Tamez. **TEC Retoño:** Tecomán, Colima, Rancho el Retoño. **TEC Sal:** Tecomán, Colima, Rancho del Señor salvador **Gto. Silao**: Silao, Guanajuato, Rancho la Aldea.

En el dendgrama se apreció que las muestras 9, 16, 35, 39, 48, 3, 1, 4, 5, 10, 20, **26, 27**, 32, 38, 42, 55, 57 y 59 correspondieron al género de *Escherichia coli*. Dichas muestras correspondieron a: 9 (heces de gato; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 16 (heces de paloma; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 35 (agua de almacén antes del filtro; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 39 (agua potable del pozo profundo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 48 (agua de almacén antes del filtro; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 3 (heces de gallina; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 1 (heces de ratón; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 4 (heces de gallina; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 5 (heces de lagartija; Rancho Señor

Salvador, Tecomán, Colima), 10 (heces de gato; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 20 (agua de riego por goteo; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán Colima), 26 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 27 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 32 (agua potable de pozo profundo; Rancho el Retoño, Tecomán, Colima), 38 (agua potable del pozo profundo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 42 (agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 55 (agua del almacén; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 57 (agua de la membrana; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán) y 59 (agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán) (figura 17).

Asimismo, se detectó que las muestras 45, 44, 21, 2, 25, 28 y 29 pertenecieron al género *Salmonella.* Dichas muestras correspondieron a: 45 (agua para la aplicación de fungicidas; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 44 (agua para la aplicación de fungicidas; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 21 (agua de riego por goteo; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán Colima), 2 (heces de ratón; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima), 25 (agua de tina 3 con fungicidas para lavado; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán, Colima), 28 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima) y 29 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima) (figura 17).

Como se puede apreciar en este estudio, la mayor población de bacterias patógenas de humanos encontradas, correspondió a *E. coli* (31%) y en menor proporción a *Salmonella* (11%). Lo anterior coincide con lo reportado por López *et.,al.* 2009 quienes demostraron la existencia de bacterias en agua de riego, en una mayor frecuencia para *E. coli* (98 %) y menor para *Salmonella* (39 %).

Los resultados obtenidos de los productos amplificados de PCR con los primers SalmI y Salm2 para *Salmonella* coinciden con las muestras 29 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima) y 28 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima) obtenidas en el análisis del dendograma.

Así como también las muestras 26 (Heces de Gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán) y 27 (Heces de Gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán) concuerdan con los resultados obtenidos en la amplificación del gen de la toxina Shiga para el serotipo *E. coli* O157:H7 con los primers SK7 y SK8.

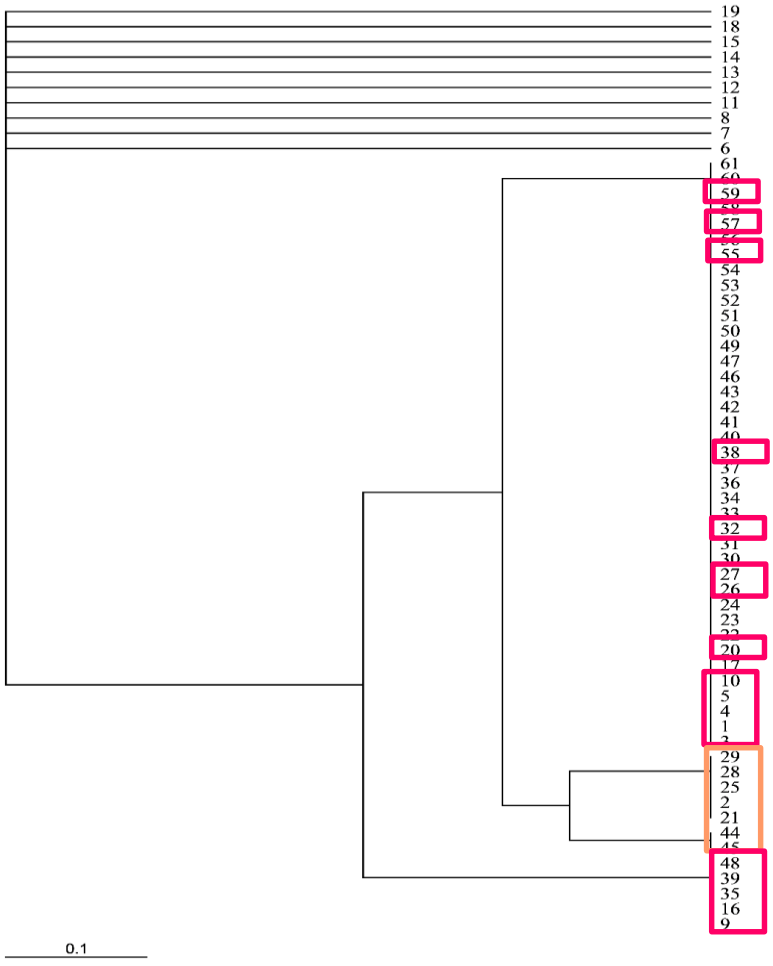

Figura 17. Dendograma realizado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hha*I, *Sma*I y *Eco*RI.

V. CONCLUSIONES

La presencia de *E. coli* y *Salmonella* fue positiva en la mayoría de los lugares muestreados de los Reyes, Michoacán, Tecomán, Colima y Silao, Guanajuato. Por tanto, las fuentes de agua no garantizan una calidad sanitaria o de inocuidad adecuada en la producción y manejo de la zarzamora, papaya y jitomate.

La Técnica de PCR con los primer 8 F y U1492R demostraron que las muestras: 6 (heces de lagartija; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima), 7 (heces de paloma; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 8 (heces de paloma Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 11 (heces de Ratón; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima), 12 (heces de Ratón; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima), 13 (heces de perro; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 14 (heces de perro; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 20 (Agua de riego por goteo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán) y 21 (Agua de riego por goteo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán) no salieron positivas.

La amplificación del gen invA presente en *Salmonella* mediante la técnica de PCR y los primers Salm1 y Salm 2 demostró que el Agua del pozo de riego ; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima (30), agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima (31), agua potable; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán (38), agua potable; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán (39), agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán (44) y Agua de Almacén antes del filtro REY Joya (53) fueron positivas a *Salmonella*.

Se identificó molecularmente y corroboró la presencia del serotipo *E. coli* O157:H7 por medio de PCR y los primers SK7 y SK8 en las muestras: 49 (agua para la aplicación de fungicidas; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 28 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 29 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 67 (agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán) y 68 (agua para la aplicación de fungicidas Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán).

La técnica de RFLPs a través de las enzimas de restricción *Hha*l, *Sma*I y *EcoR*I y el dendograma identificaron molecularmente y evidenciaron la presencia de *E.coli* en las muestras 9 (heces de gato; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 16 (heces de paloma; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 35 (agua de almacén antes del filtro; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 39 (agua potable del pozo profundo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 48 (agua de almacén antes del filtro; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 3 (heces de gallina; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 1 (heces de ratón; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 4 (heces de gallina; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 5 (heces de lagartija; Rancho Señor Salvador, Tecomán, Colima), 10 (heces de gato; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán), 20 (agua de riego por goteo; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán Colima), 26 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 27 (heces de gallina; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 32 (agua potable de pozo profundo; Rancho el Retoño, Tecomán, Colima), 38 (agua potable del pozo profundo; Rancho Baltazar, Los Reyes Michoacán), 42 (agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 55 (agua del almacén; Rancho

Baltazar, Los Reyes Michoacán), 57 (agua de la membrana; Rancho la Joya, Los Reyes Michoacán) y 59 (agua del almacén; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán).

La técnica de RFLPs a través de las enzimas de restricción *Hha*l, *Sma*I y *EcoR*I y el dendograma identificaron molecularmente y demostraron la presencia *Salmonella* en las muestras 45 (agua para la aplicación de fungicidas; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 44 (agua para la aplicación de fungicidas; Rancho la Isla, Los Reyes Michoacán), 21 (agua de riego por goteo; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán Colima), 2 (heces de ratón; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima), 25 (agua de tina 3 con fungicidas para lavado; Rancho del Ing. Tamez, Tecomán, Colima), 28 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima) y 29 (agua del pozo de riego; Rancho del Señor salvador, Tecomán, Colima).

Recomendaciones

Se deben establecer programas preventivos y correctivos muy rigurosos como las buenas prácticas agrícolas (BPA y BPM) para reducir o minimizar los riesgos en zarzamora, papaya y jitomate.

VI. LITERATURA CITADA

Almonte, A.J. 1999. Inocuidad Alimentaria: Propuesta de estrategia. Ed. CONOCER. México.

Anónimo. 1997a. "Food Safety from Farm to Table: A National Food-Safety.

Anónimo. 1997b. Memorandum for the Secretary of Healt and Human Services, The Secretary of Agriculture. The White House. U.S.A.

Anónimo. 1998. "Microbiológical Safety Evaluations and ecommendations on Fresh Produce". National Advisory Committee on Microbiological Criterial for Foods. Propuesta de Plan de Trabajo en Materia de Inocuidad Alimentaria, 1999-2000. México.

Anónimo. 1999a. Propuesta de Plan de Trabajo en Materia de Inocuidad Alimentaria, 1999-2000. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México.

Anónimo. 1999b. "Manual de Aseguramiento de Inocuidad en Frutas y Hortalizas". CESAVEG. Guanajuato, México.

Arroyo, R. 1999. El Programa Nacional de Jornaleros Agrícolas en el contexto de la iniciativa sobre la inocuidad alimentaria. México.

Avendaño, R. B.D. 2004. El impacto de la iniciativa de inocuidad alimentaria de EE.UU en las exportaciones de hortalizas frescas de México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Edo. De México.

Ávila, Q. G, Sánchez E, Muñoz E, Martínez LR, Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México.

Barreto, G. A, and Rodríguez H. C. T.2012. La nomenclatura científica en el caso particular de Salmonella. Universidad de Camagüey. Cuba.

Blanco J, Blanco M, Blanco J. E, Mora A, Alonso M. P, González E. A, Bernárdez M. I. 2002. Enterobacterias: características generales. Género Escherichia. Manual de Microbiología Veterinaria. Interamericana España.

Brooks G F, J S Butel, S A Morse. 2005. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18a ed. trad. 23a ed. en inglés. El Manual Moderno. pp:159-188, 247-254.

Carranza, M. O. 2010. La inocuidad de los alimentos en el comercio (nacional e internacional) y su importancia en la Salud Pública. SAGARPA.

Chaidez, Q.C. 2001. Inocuidad de Frutas y Hortalizas frescas: efectos del agua contaminada. Sociedad Americana de Microbiología. EU.

Chacón, L; Barrantes Kgarcía C; Achí R. Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. Universidad de costa Rica.

DGIAAP. 2010. Dirección de Inocuidad Agrícola, Pecuaria, Acuícola y Pesquera. Estado de México.

Eslava C, Mateo J, Cravioto A. 1994. Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaria de Salud. México.

FDA. 2002. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: manual de formación para instructores.

FDA. 2012. La producción mundial de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas en 2014. AGRONoticias América Latina y el Caribe. Recuperado el 27 de febrero del 2015, de http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/159358/

FDA. 2014. Altibajos en la producción de tomate en México. AGRONoticias América Latina y el Caribe. Recuperado el 27 de febrero del 2015, de http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/234151/

FDA. 1998. "Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales frescos". FDA. Washington.

Fernández E.E. 2000. Microbiología de alimentos e inocuidad. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Gadea P, Varela G, Betancor L, Grotiuz G, Blanco JE, Sirok A, Vignoli R, Blanco M, Blanco J, Schelotto F. 1998. Escherichia coli en infecciones intestinales de niños: Caracterización de las cepas involucradas y optimización de su estudio. Montevideo.

Garza B.L.E. 1999. Capacitación y servicios de consultoría ante la iniciativa de inocuidad alimentaria. Ed. CONOCER. México.

GEAS. 2002: Enfermedades de reptiles y anfibios. Boletín Vol. III, No. II.

González O. M. G. 2010. Reducción de riesgos bilógicos (Escherichia coli) en jitomate con tratamientos químicos. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Téxcoco, Estado de México.

Gurría T.F.J. 1999. La Competencia Laboral y la Inocuidad Alimentaria.

Guzmán S. P. 2001. Inocuidad alimentaria y riesgos biológicos. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Téxcoco, Estado de México.

Guzmán S. Patricia. 2001. Inocuidad Alimentaria y Riesgos Biológicos. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Edo. De México.

Hernández D. C. 2006. Detección de *Salmonella* spp y conteo de coliformes fecales en agua de uso agrícola en la producción de melón cantaloupe. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Estado de México.

Hernández M. L; Hernández. A. A.M; Cháidez, Q. c, Rendón. S. G y Tevor V. S. 2009. Detección de *Salmonell*a spp. en Melón Cantaloupe en Unidades de Producción y Unidad de Empaque. Agricultura Técnica en México Vol. 35 Núm.2 1.

HORTO INFO. 2014. Diario digital de actualidad hortofrutícola. Recuperado el 01 de marzo del 2015, de http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias/3084-tomate-mundo-100314

INIA 2000: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Consulta Difus.

Irueste M. 1999. Consideraciones para el diseño de un plan HACCP en manejo de frutas y hortalizas frescas. Ed. CONOCER. México.

Islas R. 1999. Experiencias en la instauración de sistemas de calidad en la industria hortofrutícola mexicana. Ed. CONOCER. México.

Kolter R. 1992. Life and death in stationary phase Clinical Microbiology.

López C, O; León F, J; Jiménez E, M; Chaidez Q, C. 2009. DETECCIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Escherichia coli* Y *Salmonella* EN AGUA Y SUELO AGRÍCOLA Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 32, núm. 2. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.

Luna R. L. 2013. Bioquímica de una especie de *Shigella* de Rumen con capacidad para degradar celulosa. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Campus Montecillos, Texcoco, Edo. Méx.

Madrigal F. D. y Boza P. M. 2013. La competitividad en las exportaciones de papaya de México: un análisis cuantitativo. Revista de Análisis de Economía, Comercio y Negocios Internacionales. Volumen 7 / No. 2.

Marr A. G. 1992. Growth rate of Escherichia coli. Microbiological Reviews.

Martinez S.A, and Soler M. J. 2008. Parasites and infectious diseases in tortoises. Consulta Difus Vol. 150.

Marvasi. M.; Teplitski, M.; George, A. y Hochmuth, G. 2015. *Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatógena en el ambiente de producción de cultivos: fuentes potenciales, supervivencia y gestión. Universidad de Florida

Morales C.J.L, H López M, and Mandujano B.R. 1999. Plántulas de papaya maradol roja trasplantadas a campo en diferentes fases de desarrollo. Memorias del VIII Congreso de Horticultura. Manzanillo Colima, México.

Mossel D.A, Moreno B, Struijk. 2006. Microbiología de los Alimentos. España.

OECD, 1999. Food Safety and Quality, trade Considetations. Paros, codex 16, France.

Pefaur, L. J. 2014. El mercado de las frutillas. ODEPA, Gobierno de Chile. Chile.

ProPapaya. 2014. Situación actual de la papaya. Recuperado el 28 de febrero del 2015, de http://www.propapaya.org/acerca-de-la-papaya/situacion-de-la-papaya

Ramírez L. N. 2000. Supervivencia de Escherichia coli en fresa (Fragaria chiloensis) en postcosecha. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Edo. De México.

Ramírez A. N. 2013. Análisis molecular, identificación y comparación de microorganismos de raíz aislados de diferentes zonas nopaleras. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Edo. De México.

Roberts J. and Orden, 1999. A framework Ford analyzing techinical trade barriers in agricultural marketes. Washington, D.C.

Rüssmann, H., Kothe, E., Schmidt, H., Franke, S., Harmsen, D., Caprioli, A., Karch, H., 1995. Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 Escherichia coli strains associated with haemolytic uraemic syndrome. Journal of Medical Microbiology 42, 404– 410.

RYAN, K. J. y RAY, C. G. 2004. Sherris Medical Microbiology. McGraw Hill.

SAGARPA. 2012. Fortalece México la producción de berries, generador de empleos y nuevos mercados. México, DF.

SAGARPA. 2014. Emite SAGARPA acuerdo para proteger producción de uvas y frutillas. México, DF.

SAGARPA. 2015. Preparan primeros embarques de frutillas de exportación a China. Comunicado de prensa. México, DF.

SHCP. 2014. Panorama del Jitomate. Financiera nacional de desarrollo.

Tanaro J. D.; Lound, L. H.; y Domínguez, M. M. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas abiertas, heces y rumen de bovinos en las proximidades de casco urbano. Ciencias Exactas y Naturales. Ingenierías y Tecnologías.