

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**“USO DE Bacteroidales COMO RASTREADOR DE FUENTE DE
CONTAMINACIÓN FECAL EN FRESA Y TOMATE CONTAMINADOS
ARTIFICIALMENTE”**

POR

Q.C.B. LINDA GRACIA HERNÁNDEZ RANGEL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2015

**“USO DE Bacteroidales COMO RASTREOR DE FUENTE DE CONTAMINACION
FECAL EN FRESA Y TOMATE CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE”**

Comité de tesis

Dr. José Santos García Alvarado
Presidente

Dr. José Ángel Merino Mascorro
Secretario

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
1er. Vocal

Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña
2do. Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
3er. Vocal

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado, la Coodirección de la Dra. Norma Laura Heredia y el Dr. José Angel Merino Mascorro y la asesoría de la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto y el Dr. Jorge Esteban Dávila Aviña.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto de Investigación titulado “Validación del uso de *Bacteroidales* como indicadores y rastreadores de fuentes de contaminación fecal en la cadena de producción de vegetales” de la convocatoria de Proyectos de Investigación para atender Problemas Nacionales del CONACYT (proyecto 213333)

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer el apoyo total y completo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la realización de esta investigación, al Dr. José Santos García Alvarado y a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, por permitirme formar parte de este trabajo y por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos (LABGEM), así como por su dedicación, su ejemplo, enseñanza y paciencia hacia a mí, quienes en conjunto al resto de mi comité de tesis el Dr. José Ángel Merino Mascorro, la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto y el Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña, de quienes aprendí mucho, les estoy totalmente agradecida.

También quiero agradecer a mis colegas y hermanos de laboratorio por apoyarme tanto y estar allí en cada momento de desesperación y alegría, en especial a mi compañera y más que amiga Laiju KP por sobrellevar cargas, desvelos y risas conmigo, a Cindy Caballero Prado quien fue una gran mentora y amiga incondicional y por último, pero no menos importante, a mis compañeros que hicieron de mi estancia muchos momentos amenos en el laboratorio, en especial a Diego Fco. Benites Chao, Alfredo González y Alberto Aguayo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a mi alma mater, la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

Este proyecto y sueño se lo dedico primeramente a Dios quien hace posibles todas las cosas, a mis padres Esteban Hernández Gómez y Rosa Ofelia Rangel Aranda por su apoyo y amor incondicional, así también por su paciencia y tolerancia al escucharme hablar y hablar sobre bacterias, a mi más grande mejor amiga y hermana Jesica Esther Hernández Rangel, por escucharme y ser siempre honesta conmigo durante toda mi vida y en especial en esta aventura, en la cual lloramos y reímos al mismo tiempo.

Quiero agradecer de manera especial al resto de mis hermanos Ale, Steve, Liz, Benjy, Zuly, Cecy y Josué, quienes han hecho de toda mi vida un ambiente amoroso y especial, compartiendo sus experiencias y permitiéndome aprender de sus aciertos y errores, a quien debo a gradecer a mis padres por ello. Gracias hermanos por su apoyo económico, material, emocional y sobre todo por su amor hacia mí.

También quiero agradecer a mis compañeros de generación y en especial a mis amigos de maestría Laiju KP, Martha Jacqueline Tamez, Fátima del Carmen Reta, Joel Delgadillo Medrano y Jessica Lizzeth Gtz. Ferman, por su amistad y apoyo mutuo en el estrés, las desveladas y las risas durante toda esta travesía.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi maestra Laura Rodríguez Flores, quien fue y sigue siendo una gran mentora, un ejemplo de ser humano a seguir y una amorosa hermana en Cristo.

*“Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas. A él sea la gloria por los siglos.
Amén”.*

Romanos 11:36

(RVR1960)

ÍNDICE

	Sección	Página
Portada		i
Hoja de firmas		ii
Agradecimientos		iv
Dedicatorias		v
Índice		vi
Índice de Tablas		viii
Índice de Figuras		ix
Lista de símbolos y abreviaturas		xi
Resumen		xiii
Abstract		xiv
1 Introducción		1
2 Antecedentes		2
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos		2
2.2 Bacterias indicadoras de contaminación fecal		7
2.3 Uso de <i>Bacteroidales</i> como indicadores de contaminación fecal		9
2.4 Rastreo de Fuente Microbiana (MST)		10
2.5 Tomate		16
2.6 Fresa		16
3 Definición del problema y justificación		18
4 Hipótesis		19
5 Objetivo general		20
6 Objetivos particulares		21
7 Material y métodos		22
8 Resultados		33
8.1 Validación de marcadores genéticos para <i>Bacteroidales</i> totales y específicos		33

8.2 Limite de detección y cuantificación del marcador universal AllBac para <i>Bacteroidales</i> totales.	35
8.3 Enumeración de <i>Bacteroidales</i> e indicadores tradicionales de contaminación con heces	36
8.4 Correlación de <i>Bacteroidales</i> e indicadores tradicionales en lavados de tomate y fresa	47
9 Discusión	51
10 Conclusión	54
11 Bibliografía	55
12 Resumen bibliográfico	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Condiciones para PCR de marcadores genéticos para Bacteroidales	24
2	Preparación de la qPCR para los marcadores de Bacteroidales	25
3	Número de copias logarítmicas del plásmido (con inserto del marcador Allbac) en base a la concentración de ADN.	28
4	Inóculo inicial de indicadores fecales en log UFC/100 μ l de las diluciones contaminantes de heces para tomate y fresa.	45
5	Enumeración promedio de indicadores fecales en 250 ml de lavado de tomates contaminados.	45
6	Enumeración promedio de indicadores fecales en 90 ml de lavado de fresas contaminadas.	46
7	Datos estadísticos para la correlación entre indicadores tradicionales y Bacteroidales en los lavados de tomate y fresa.	48
8	Tabla de correlación tipo Pearson entre indicadores tradicionales y Bacteroidales específicos de huésped.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Preparación de las diluciones de heces para la contaminación de vegetales.	30
2	Detección del marcador Allbac en muestras de heces humanas y animales.	33
3	Detección de marcadores genéticos de <i>Bacteroidales</i> específicos de huésped mediante PCR punto final.	34
4	Curva estándar del marcador universal Allbac mediante PCR tiempo real.	35
5	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de tomate contaminados con heces humanas. (B) Detección de marcador Bvulg específico de huésped en lavados de tomate contaminados con heces humanas.	39
6	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de fresas contaminadas con heces humanas. (B) Detección de marcador Bvulg específico de huésped en lavados de fresas contaminadas con heces humanas.	40
7	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de tomate contaminados con heces caninas. (B) Detección de marcador BacCan específico de huésped en lavados de tomate contaminados con heces caninas.	41
8	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de fresas contaminadas con heces caninas. (B) Detección de marcador BacCan específico de huésped en lavados de fresas contaminadas con heces caninas.	42

9	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de tomate contaminados con heces bovinas. (B) Detección de marcador BoBac específico de huésped en lavados de tomate contaminados con heces bovinas.	43
10	(A) Promedio de UFC log de indicadores fecales en lavados de fresas contaminadas con heces bovinas. (B) Detección de marcador BoBac específico de huésped en lavados de fresas contaminadas con heces bovinas.	44
11	Graficas de correlación entre los indicadores tradicionales y Bacteroidales totales en lavados de vegetales contaminados con heces.	11

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
BPA	Buenas Prácticas de Agricultura
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CDC	Center for Disease Control
CEG	Copias Equivalentes Genómicos
Ct	Ciclo de amplificación
DGE	Dirección General de Epidemiología
EDA	Enfermedades Diarreicas Agudas
EEUU	Estados Unidos
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOLEX	Legislative Database on Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FIB	Fecal Indicator Bacteria
g	Gramos
h	Horas
L	Litros
LB	Luria Bertani
log	Logaritmo
min	Minutos

ml	Mililitros
MST	Microbial Source Tracking
nm	Nanometros
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
s	Segundos
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SS	Solución Salina
SSA	Secretaria de Salud
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μl	Microlitro

RESUMEN

El consumo de vegetales contaminados con materia fecal es un problema de salud en todo el mundo. Los métodos actuales utilizados para investigar la posible presencia de patógenos, como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157: H7 en estos alimentos, se basan en la búsqueda de organismos indicadores de contaminación fecal (FIBs); sin embargo, éstos métodos son tardados y no indican el origen de la contaminación. Se ha reportado que los microorganismos pertenecientes al orden Bacteroidales se pueden utilizar como indicadores alternativos para la identificación y cuantificación de la fuente de contaminación, ya que algunas especies son específicas de huésped debido a secuencias conservadas del gen ARNr 16S en su genoma. El objetivo de este trabajo fue identificar la fuente de contaminación fecal mediante el uso de marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de huésped y determinar la asociación entre estos y los FIBs en lavados de fresas y tomates contaminados artificialmente con heces humanas y animales. La validación de los marcadores del gen ARNr 16S de Bacteroidales específicos de humano, bovino y canino, se realizó mediante PCR. Las muestras de tomate y fresa se contaminaron con heces diluidas con una carga inicial de Bacteroidales entre 6 y 7 log UFC/100 μ l y de 3 a 6 log UFC/100 μ l de los FIBs coliformes totales, *E. coli* y *Enterococcus* spp. Los FIBs fueron enumerados por cuenta en placa y el marcador universal AllBac se cuantificó por qPCR, mientras que la fuente de contaminación se identificó por PCR punto final. El límite de detección de la qPCR fue de 1.35 a 10.35 copias de genes logarítmicas, correspondiente a un límite de cuantificación de 2 células. No se observó ninguna correlación entre los niveles de Bacteroidales y los FIBs en muestras de lavados de tomate y fresa contaminados con heces de humanos y bovinos. En las muestras de vegetales contaminadas, generalmente los niveles de Bacteroidales fueron mayores que los indicadores tradicionales; sin embargo, los indicadores tradicionales mostraron una alta variación en aquellas muestras contaminadas con bajas concentraciones de heces (0.1 y 0.01 mg). La detección de marcadores específicos de huésped en las muestras de lavado fue del 100% en casi todos los casos cuando las muestras estaban contaminadas con concentración de 10 y 1 mg de heces por fruto. Con base en estos resultados, el uso de Bacteroidales proporciona información para identificar la fuente de contaminación fecal, y podría ayudar a reducir los riesgos de contaminación de los productos frescos.

ABSTRACT

Fecal contamination associated with the consumption of vegetables is a health issue worldwide. Current methods used to investigate the possible presence of pathogens, such as *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 in vegetables, are based in searching fecal indicator organisms; however, these are time-consuming and do not indicate the origin of contamination. The order Bacteroidales can be used as an alternative indicator and for tracking the source of contamination, due to host-specific sequences conserved in its genome. The objective of this study was to identify the source of fecal contamination by using genetic markers specific for host Bacteroidales and determine the association between fecal contamination indicators, Bacteroidales and traditional bacteria, in strawberry and tomato rinsates. Fecal sources from humans and animals were used and added to tomato and strawberry samples. Validation of oligonucleotides of host-specific (human, bovine and canine) markers of the 16S rRNA gene of Bacteroidales was performed using PCR. Tomato and strawberry samples were contaminated with diluted stool with an initial charge of Bacteroidales (between 6 and 7 log CFU/100 μ l) and 3 to 6 log CFU/100 μ l of traditional indicators of the various hosts. Traditional indicators (*E. coli*, total coliform and *Enterococcus*) were enumerated and the universal marker AllBac was quantified by qPCR. Host source was identified by PCR. The limit of detection of PCR was 1.35 to 10.35 logarithmic gene copies, corresponding to an LOQ up to 2 cells. No correlation between levels of Bacteroidales and traditional bacterial indicators was observed in samples contaminated with human and bovine faces. In all samples of contaminated vegetables, levels of Bacteroidales was 2 log CFU higher than traditional indicators; however, traditional indicators showed high variation and *E. coli* from bovine source was not detected in contaminated samples with lower concentrations (0.1 y 0.01 mg). Identification of host specific markers in vegetables samples was 100% in almost all cases when the samples were contaminated with 10 and 1 mg of feces. Contamination with dog feces was detected by PCR in 100% in tomatoes even with 0.1 mg of feces, and in 60% in strawberry. Based on these results, the use of Bacteroidales provides information to identify the source of fecal contamination, and could help to reduce the risks of contamination of produce.

1. INTRODUCCION

La producción de vegetales en el mundo, se ha incrementado en los últimos años debido a la demanda de estos productos por sus numerosos beneficios para la salud. Este incremento se ha visto acompañado del aumento en el número de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos. Por normativa ningún microorganismo patógeno debe estar presente en los productos frescos, sin embargo, de manera recurrente la fuente de contaminación comúnmente asociada a los vegetales, es por materia fecal, la cual puede ocurrir antes, durante y después de la cosecha del producto. Patógenos bacterianos como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7, tienden a ser transmitidos predominantemente por desechos fecales animales, ya sea directa o indirectamente a través del agua o suelo, contaminados con las heces.

Los Bacteroidales son bacterias comensales, que se encuentran en el tracto intestinal humano y de otros mamíferos superiores, las cuales presentan secuencias del gen 16S ARNr específicas de huésped. De hecho, son las bacterias que se encuentran en mayor número en el intestino delgado de los humanos, donde se han calculado 10^{10} células por cada gramo de heces humanas, en tanto que en otras especies llegan a alcanzar hasta 10^{15} UFC (Brock, 2014).

El uso de Bacteroidales como microorganismos indicadores de contaminación fecal ha funcionado en muestras de agua como una herramienta efectiva para establecer el origen de la contaminación y así poder reducir riesgos potenciales, diseñar estrategias para el control de los procesos y evitar la proliferación de microorganismos patógenos. Por lo que en este trabajo, simulamos una posible contaminación fecal en vegetales frescos como tomate y fresa, donde con la ayuda de análisis de identificación molecular de marcadores genéticos, determinamos el origen de contaminación, si era humana o de tipo animal, además de que realizamos un estudio con microorganismos indicadores fecales tradicionales de los productos frescos para correlacionarlos con miembros del género Bacteroidales y determinar su importancia como microorganismos indicadores alternativos.

2. ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Importancia de las enfermedades transmitidas por alimentos

En la actualidad, las cadenas de suministro de alimentos tienen destinos nacionales a veces lejanos, e incluso atraviesan fronteras, por lo que es necesario garantizar la inocuidad de los alimentos, dando como resultado un suministro seguro compatible con la economía, el comercio, la nutrición, y la estimulación del desarrollo sostenible. Sin embargo, aún se presentan problemas de salud pública ocasionados por alimentos que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas que provocan más de 200 enfermedades, las cuales van desde una diarrea leve hasta cáncer (WHO, 2016).

Según la OMS, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son el resultado de la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier etapa del proceso, desde su producción hasta su consumo y puede ser el resultado de la contaminación del medio ambiente, incluida la contaminación del agua, el suelo o el aire. Así mismo, describe que las ETAs generan síntomas gastrointestinales, sin embargo, tales enfermedades también pueden terminar en problemas neurológicos, ginecológicos e inmunológicos, entre otros representando una carga económica considerable por discapacidades e incluso la muerte (WHO, 2014).

De las más de 250 ETAs que se conocen, tienen diferentes síntomas por lo que no hay un solo “síndrome” de enfermedad transmitida por alimentos, sin embargo, en la mayoría de estas enfermedades, el microbio o la toxina entra al cuerpo a través del tracto gastrointestinal y normalmente causa como primeros síntomas náusea, vómito, calambres abdominales y/o diarrea. Cada año, 1 de cada 6 estadounidenses se enferma por el consumo de alimentos y bebidas contaminados, y más de dos millones de personas mueren a causa de enfermedades diarreicas, muchas de las cuales se adquirieron al ingerir alimentos contaminados (Global Foodborne Infections Network, CDC 2011). Lamentablemente, los sistemas de vigilancia tradicionales solo capturan una pequeña fracción del estimado de 48

millones de casos reales de enfermedades transmitidas por alimentos al año, tan solo en los Estados Unidos (Nsoesie et al, 2014).

Actualmente, las infecciones más comunes son las causadas por bacterias y virus como *Campylobacter*, el cual es un patógeno causante de enfermedades diarreicas en todo el mundo y vive en el intestino de aves de consumo humano; *Clostridium perfringens* que es una bacteria que se encuentra en el ambiente y en el intestino humano y de algunos animales como aves, algunas de sus cepas producen una toxina que es la causante de enfermedad y se transmite por comidas mal cocinadas; Norovirus o virus tipo Norwalk, causa enfermedades gastrointestinales agudas con vómito y diarrea, es contaminante de agua, y se transmite principalmente por los trabajadores que preparan los alimentos; y *Salmonella*, que es una bacteria que se encuentra en el intestino de aves, reptiles y mamíferos, por lo que se puede propagar a los humanos mediante una gran variedad de alimentos de origen animal (CDC, 2011).

En el año 2013, en México se registraron poco más de 5 millones de casos de infecciones intestinales en menores de 9 años, y en el 2014 se reportó un incremento en el número de casos de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) en menores de 5 años, siendo Baja California sur y Sonora las entidades federativas más afectadas (DGE, 2014). Un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales y en 2001, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional, siendo los estados con mayor incidencia Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y la Ciudad de México. Tan solo en el 2008, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) brindó 2,000,188 consultas por enfermedades gastrointestinales y los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. De acuerdo con estadísticas del IMSS, las infecciones, como salmonelosis, tifoidea, cólera y gastroenteritis por rotavirus representaron un severo problema de salud pública para nuestro país (Hernández Cortez et al, 2011). En Nuevo León, en el año 2014, se registraron 4,056 nuevos casos de intoxicación alimentaria bacteriana, según la Dirección General de Epidemiología (DGE) de la Secretaría de Salud, siendo uno de los 3 estados con mayor incidencia, entre los que

se encontraron también Coahuila con 2,872 casos y Baja California con 2,823 nuevos casos (DGE, 2013).

El impacto económico de las ETAs en países ricos como los Estados Unidos, además de la pérdida de vidas, asciende a altos costos por hospitalizaciones, honorarios a abogados, investigación en salud pública, salarios bajos y la pérdida de confianza en el consumidor, lo cual produce pérdidas desde 20 hasta 43 mil millones de dólares por año, siendo los principales patógenos causantes *E. coli* O157:H7 y *E. coli* no O157:H7 productor de Shiga toxina, *Listeria monocytogenes* y la salmonelosis humana (Wesley, 2009). La reducción de estas enfermedades tan solo en un 10%, mantendría 5 millones de americanos libres de enfermarse por año, incluso se ha estimado que solo previniendo los casos notificados de *E. coli* O157, se ahorraría un estimado de \$ 7 millones de dólares (CDC, 2014; FDA, 2014).

Producción y consumo de vegetales

La producción de productos frescos se está incrementado en el mundo cada año, debido a la demanda de estos productos por sus numerosos beneficios hacia la salud, los cuales incluyen la mejoría nutricional y la reducción de riesgos de enfermedades.

México es uno de los principales países en la producción y exportación de vegetales, principalmente hortalizas. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), para el año 2012, México ocupaba el décimo lugar en la producción de tomate, consolidándose como el principal país exportador de este fruto a nivel mundial para el año 2015 con una producción anual de 2.8 millones de toneladas, según la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el que el Estado de San Luis Potosí ocupa el segundo lugar en producción después del Estado de Sinaloa (FAO, 2012 y SAGARPA 2015).

En cuanto a la fresa, México ocupa el 3er lugar entre los principales países productores de esta fruta, con una cosecha anual de 379,464 toneladas tan solo en el año 2014, estando por debajo de Estados Unidos y China, mientras que SAGRAPA reportó en el año agrícola 2014 una producción de 458, 971 toneladas (FAO, 2015, SAGARPA 2015).

Enfermedades transmitidas por vegetales

Este incremento en el consumo de vegetales frescos se ha visto acompañado por el aumento del número de brotes de enfermedades transmitidas por este tipo de alimentos a nivel mundial. Basados en los análisis de datos del Sistema de Vigilancia de brotes por transmisión de alimentos de los Estados Unidos, estos se han incrementado, hasta alcanzar 16 brotes por año en los noventas. La proporción de los brotes de ETAs ligadas a la contaminación de vegetales en las últimas dos décadas, se ha incrementado casi 10 veces (de 0.7% a mediados de 1970s a 6% a mediados de 1990s). De 1990 al 2004, los vegetales fueron relacionados a 19.3% de los brotes de ATAs y al 33.8% de los casos (León *et al*, 2009).

Los productos frescos se han incrementado como vehículos de transmisión de enfermedades entéricas y como regularmente no hay un paso final de calentamiento importante antes de ser ingeridos, los consumidores son vulnerables aun con dosis bajas del patógeno. Esto también es debido a que su control es limitado ya que hay muchas etapas en la producción en donde los patógenos pueden entrar en la cadena alimentaria. Un ejemplo de esto son los brotes de *Salmonella* debido a melones contaminados que se han producido por décadas y que en el 2011 estuvieron implicados en dos brotes multiestados en los Estados Unidos (melones Del Monte con 20 enfermos en 10 estados y productos de Jensen Farms afectando a 139 personas en 28 estados, Tood, 2013).

Otros brotes multiestado de gran importancia que se presentaron en Estados Unidos fueron uno donde 202 personas enfermaron de gravedad por *E. coli* O157:H7 presente en espinacas empaquetadas en bolsas en el 2006; otro en donde 1438 personas se contaminaron por *Salmonella* presente en tomate y chile en el 2008; y 106 personas enfermaron también por *Salmonella* al ingerir papaya importada de México en 2011 (Tood, 2013).

Como medida preventiva, y con el fin de mejorar la inocuidad en el suministro de producción de vegetales tanto para consumo como para exportación, en nuestro país entró en vigor la Ley Federal de Sanidad Vegetal en 1993, la cual tiene como finalidad promover y vigilar la observancia de las disposiciones fitosanitarias; diagnosticar y prevenir la diseminación e introducción de plagas de los vegetales, sus productos y subproductos;

establecer medidas fitosanitarias; y regular la efectividad biológica, aplicación, uso y manejo de insumos, así como el desarrollo y prestación de actividades y servicios fitosanitarios (FAOLEX, 2015).

Fuente de contaminación de vegetales

Múltiples fuentes en el camino de la “*granja a la mesa*” pueden causar la contaminación de los vegetales, los cuales están divididos en pre-cosecha, cosecha y post-cosecha, en donde el producto puede ser contaminado con algún patógeno humano que pueda persistir y tal vez crecer. Dependiendo de los factores del huésped, la virulencia del patógeno y la dosis, el consumo de vegetales puede resultar en una enfermedad o incluso la muerte (León *et al*, 2009).

Pre-cosecha: Es considerada la fase más temprana en la que los vegetales se pueden contaminar, esta fase incluye la siembra, el crecimiento, irrigación y tratamientos asociados con la producción de la planta. La importancia de la contaminación durante el crecimiento y la cosecha no está bien caracterizada debido a que una vez que ocurre el brote, normalmente es difícil determinar la fuente específica de contaminación pre-cosecha (León *et al*, 2009).

Sin embargo, en la mayoría de la producción de los vegetales frondosos en los EEUU que se han implicado en brotes se ha visto involucrada el agua de riego potable como fuente de contaminación (Mandrell, 2009).

Cosecha: Es la etapa en la que los vegetales pueden ser contaminados por el humano o por máquinas recolectoras. Las fuentes de contaminación en esta etapa difieren algunas veces con las que ocurren durante la pre-cosecha. Además, el tipo de contaminación que ocurre durante la post-cosecha también se ve afectado por el empaquetado en el campo para su inmediata distribución, o cuando el producto es sometido a un lavado y posteriormente empaquetado en la planta procesadora. Algunos problemas higiénicos de los trabajadores del campo incluyen manos contaminadas, falta de higiene como el lavado de manos, ropa y cabello sucios, heridas abiertas e infectadas, llagas, etc. Inclusive, los trabajadores enfermos

(por ejemplo de gastroenteritis o hepatitis), en su estado de portadores asintomáticos, pueden contaminar los productos vegetales durante esta etapa (León et al, 2009).

Post-cosecha: Normalmente en esta etapa, la contaminación se desarrolla en los departamentos de empaquetado, para posteriormente distribuir los productos vegetales, por lo que también se pueden contaminar durante el transporte (León et al, 2009).

Particularmente, los grupos de los productos vegetales que parecen causar la vasta mayoría de los brotes asociados a productos frescos incluyen los vegetales de hojas verdes, tomate, melón y hierbas frescas. Muchas de estas enfermedades son entéricas y de origen fecal (Ravaliya *et al*, 2014). Por lo que la determinación de la fuente de contaminación fecal es un problema crítico en la producción de vegetales frescos. Una necesidad particular es la habilidad de diferenciar la contaminación fecal microbiana que resulta de las evacuaciones animales contra la que proviene de una fuente humana. El uso de bacterias fecales para determinar la fuente de la contaminación fecal está basado en el supuesto de que ciertas cepas de bacterias fecales están asociadas con animales huésped-específicos y que estas cepas pueden ser diferenciadas en base a marcadores genotípicos o fenotípicos (Layton et al, 2006).

2.2 BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACION FECAL

Muchos de los productos frescos (frutas y vegetales), se contaminan con patógenos por el contacto con heces humanas y animales. Por ejemplo, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (y otras *E. coli* patógenas) tienden a ser transmitidas predominantemente por desperdicios fecales animales, mediante agua y suelos contaminados directa o indirectamente. La fuente de contaminación con virus entéricos humanos (como el virus de la hepatitis A y los norovirus) y *Shigella* spp., es el contacto con materia fecal humana con las manos del humano o directamente con el agua y suelo contaminados (León et al, 2009).

Microflora normal de los productos frescos

En general, las especies bacterianas *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*, y *Enterobacter agglomerans*, son los principales componentes de la flora de la mayoría de las frutas y vegetales; aunque también se puede encontrar *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *P. fluorescens* pectinolectica, *Xanthomonas* spp., *Cytophaga* spp. y *Flavobacterium* spp. Estas bacterias se encuentran normalmente en estos productos y no son patógenos para el humano. La interacción entre la microflora de frutas y vegetales con microorganismos patógenos, no está bien estudiada y pueda ser que la flora normal inhiba o promueva el crecimiento de ciertos patógenos (León et al, 2009). Numerosos estudios han demostrado la relación entre las bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB) y patógenos causantes de enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Sin embargo, también es bien sabido que los animales pueden expulsar estos indicadores sin el acompañamiento de patógenos para humanos, por lo que hay cierto grado de incertidumbre respecto a la calidad del agua y productos frescos contaminados, asociados a una fuente (Colford et al, 2007).

Algunos de los organismos indicadores de contaminación fecal que se utilizan actualmente incluyen bacterias coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, y *Enterococcus* spp. Los colifagos han sido propuestos como indicadores alternativos de contaminación con patógenos virales, pero aun no son tan usados (León et al, 2009).

Coliformes totales

No son los mejores organismos para usarlos como indicadores de contaminación fecal en vegetales ya que pueden estar presentes en gran número en el suelo (León et al, 2009). Son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, pueden fermentar la lactosa gracias a la actividad de la enzima β -galactosidasa a una temperatura de 35°C junto la producción de gas en un lapso de 48 h (Ashbolt et al, 2001).

Coliformes fecales

Están asociados con el tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos (León et al, 2009). Son Gram negativos capaces de fermentar la lactosa con producción de gas en un período de 48 h a una temperatura de incubación de $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Están también definidos como coliformes termotolerantes (Ashbolt et al, 2001).

Escherichia coli

Es un miembro del grupo de los coliformes fecales, se encuentra exclusivamente en el tracto intestinal de animales y humanos, y es uno de los organismos indicadores más usados. La presencia de *E. coli* en vegetales es un indicador potencial de muchos otros patógenos entéricos. Sin embargo, la medición de *E. coli* contribuye poco al conocimiento de la fuente de contaminación debido a su presencia en heces animales y humanas, la persistencia y el crecimiento en el ambiente (León, 2009; Ravaliya et al, 2013). Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son Gram negativos, no esporulados y anaerobios facultativos que producen indol a partir de triptófano. Presenta características bioquímicas que permiten diferenciarle de otros coliformes al ser positivo para la prueba de indol (Ashbolt et al, 2001).

***Enterococcus* spp.**

Algunas especies del género *Enterococcus*, se encuentran casi exclusivamente en el tracto intestinal de humanos y animales, mientras que otras especies generalmente están presentes como contaminantes ambientales del suelo, agua y vegetación. Son Gram positivos, crecen en medio selectivo y diferencial como el agar bilis esculina en donde se pueden identificar a miembros de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* que poseen el antígeno D de Lancefield, y son catalasa negativa (León et al, 2009; Ashbolt et al, 2001).

2.3 USO DE Bacteroidales COMO INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL

Los Bacteroidales son un grupo de bacterias medioambientales y comensales que pertenecen al filo Bacteroidetes y constituyen el único orden de la clase Bacteroidia. Las especies del género *Bacteroides* son bacterias Gram-negativas con forma de bacilo, son anaerobias, no forman endosporas y pueden ser móviles o inmóviles, dependiendo de la especie. El ADN tiene un contenido GC del 40-48%. Inusualmente en las bacterias, las membranas de *Bacteroides* contienen esfingolípidos. También contienen ácido mesodiaminopimélico en su capa de peptidoglicano. Constituyen el principal componente de la microbiota gastrointestinal, vaginal y bucal en los mamíferos. En el intestino del huésped juegan un papel importante en el procesamiento de las moléculas complejas en

otras más simples. Se han encontrado concentraciones altas de estas células por gramo de heces humanas. Pueden también crecer en azúcares simples cuando están disponibles, pero su principal fuente de energía son los polisacáridos de origen vegetal (Brock, 2009).

Las bacterias comprenden una tercera parte del peso total de materia fecal, y de estos, los Bacteroides representan un 30 a 40% del total de bacterias fecales, lo que corresponde a un 10% de la masa total de las heces; por lo tanto, los miembros del orden *Bacteroides* proveen un objetivo abundante para la identificación de contaminación fecal (Layton *et al*, 2006). Mientras que los indicadores fecales tradicionales como los coliformes totales, *E. coli* y enterococos intestinales, proveen una indicación de contaminación fecal general, ensayos de *Bacteroidales* específicos de humano y rumiante, pueden ser usados como rastreo de fuente microbiana. Estos ensayos involucran marcadores genéticos específicos, de manera que pueden identificar la materia fecal del huésped en particular de humanos y animales de ganado (Sokolova *et al*, 2012).

Los miembros del orden Bacteroidales, son los indicadores alternativos más prometedores, ya que son considerados los más apropiados debido a que están limitados a animales de sangre caliente, son componentes dominantes de la microflora intestinal y no proliferan en el ambiente (Ravaliya *et al*, 2013).

La ventaja de usar genes marcadores de Bacteroidales como método de rastreo de fuente microbiana (MST), sobre otros métodos, incluyen la detección directa de secuencias, no requiere de cultivo prolongado o de mantenimiento, son abundantes en agua contaminada y materia fecal, los marcadores son específicos de huésped y la detección puede ser asociada con contaminación reciente, y, por último, estos marcadores están conservados geográficamente (Lee *et al*, 2010).

2.4 RASTREO DE FUENTE MICROBIANA (MST)

El rastreo de fuente microbiana (MST, por sus siglas en inglés) es una herramienta que tiene como objetivo determinar el origen de la contaminación fecal y los patógenos que puedan estar afectando el agua y la agricultura. Se basa en el supuesto de que haciendo uso de métodos apropiados con bacterias específicas, las fuentes de los microorganismos

pueden ser encontradas y caracterizadas como de origen animal o humano. La mayoría de estos métodos se enfocan en los perfiles de huellas de bacterias fecales como *E. coli*, sin embargo, también puede hacer uso de algunos protozoos, virus y marcadores químicos como la cafeína. Estos métodos se dividen en dos grupos; aquellos basados en métodos moleculares y los basados en los métodos bioquímicos. Aunque los métodos tradicionales incluyen cultivo y cuantificación de bacterias indicadoras fecales (coliformes fecales, *E. coli* y *Enterococcus* spp.), actualmente hay un aumento en el interés de los métodos moleculares, no solo para la detección, sino también para la identificación de la fuente de la contaminación fecal, entre estos se encuentran los perfiles de ADN, usando la genómica o genes filogenéticos específicos de bacterias fecales, como la secuencia 16S ARNr (Simpson et al, 2002).

Los indicadores tradicionales como los coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), tienen numerosas limitaciones asociadas con su aplicación como rastreo de fuente microbiana e incluye la habilidad para proliferar después de ser liberados en agua, su sensibilidad a los procesos de desinfección, su inhabilidad para identificar la fuente de contaminación fecal y los bajos niveles de correlación con la presencia de patógenos (Savichtcheva et al, 2007).

El método de PCR para *Bacteroidales* específicos de huésped, ofrece una vía rápida de diagnóstico, generalmente en agua. Sin embargo, los marcadores *Bacteroidales* serán detectados cuando los patógenos estén presentes, ya que ambos son excretados en la descarga fecal, de manera que se pueda hacer la correlación, por ejemplo, de humano, rumiante o cerdo, con patógenos fecales como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Campylobacter*. Se han detectado altas concentraciones de *Salmonella* cuando están presentes marcadores de rumiantes, y *Campylobacter* spp. cuando están presentes marcadores humanos (Walters et al, 2007).

Los miembros del genero *Bacteroidales* han sido sugeridos como indicadores fecales alternativos de *E. coli* o coliformes fecales, debido a que están presentes en gran cantidad en la población bacteriana fecal, tienen poco potencial de crecimiento en el ambiente y tienen un alto grado de especificidad de huésped. El enfoque de usar *Bacteroidales* spp. como indicadores de fuentes de contaminación de tipos de huéspedes animales, difiere de la

búsqueda de *E. coli* (indicador tradicional más usado) en dos maneras significativas: primero, no se hacen cultivos de aislamiento de especies de *Bacteroidales* ya que solo se examina la población total de *Bacteroidales* en muestras fecales; y segundo, que las metodologías basadas en *Bacteroidales* están diseñadas para secuencias específicas dentro del gen ARNr 16S de *Bacteroidales*, presentes en las heces de diferentes animales (Layton et al, 2006)

ADN ribosomal 16S

Siendo que los perfiles genotípicos pueden ser más estables que los fenotípicos y, en teoría, son capaces de discriminar entre las diferentes fuentes animales, las técnicas de huellas dactilares basadas en ADN han recibido una creciente atención como herramientas potenciales para el seguimiento de fuentes de contaminación fecal (Simpson et al, 2002). Desde que se conoce que las especies de *Bacteroidales* son altamente específicas de huésped, es posible identificar la fuente de contaminación fecal y asociarla con patógenos por rastreo de sus marcadores genéticos ADNr 16S (Savichtcheva et al, 2007).

El ADN ribosomal 16S es la molécula más utilizada en los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Es por esto que se han utilizado para establecer relaciones filogenéticas, clasificación e identificación bacteriana. Entre las características que permiten al ADNr 16S ser utilizado para el análisis taxonómico de las especies de microorganismos se incluyen que es una secuencia altamente conservada y se encuentra de manera universal en todas las bacterias, su estructura y su función han permanecido constantes durante un tiempo prolongado, los cambios ocurren de manera lenta pero permite la suficiente variabilidad para diferenciar organismos alejados y próximos y su tamaño es de 1500 pb (Rodicio y Mendoza, 2004). El gen ADNr 16S se compone de 9 regiones hipervariables, donde las secuencias divergen a través del tiempo. Las regiones altamente conservadas, flanquean estas regiones hipervariables, por ello la importancia de diseñar oligonucleótidos que puedan unirse a las regiones conservadas y amplificar las regiones hipervariables (Wu et al., 2010). No se requiere de una amplificación completa del ADNr 16S para la identificación de bacterias específicas (Rodicio y Mendoza, 2004; Chakravorty et al, 2007). En estas secuencias existen secciones altamente conservadas entre

las especies, lo que puede dar paso a crear oligonucleótidos universales para su amplificación (Chakravorty et al, 2007).

Los ensayos por PCR han permitido diferenciar genotipos que son específicos del huésped animal sin importar la localización geográfica. El diseño de oligonucleótidos que puedan amplificar genes de ARNr 16S de Bacteroidales ha permitido diferenciar a Bacteroidales de origen humano y de ganado, así como de origen de cerdos y equinos. Las técnicas por PCR tiempo real ha demostrado ser una técnica para identificar y cuantificar bacterias en alimentos, agua y muestras fecales y de tejidos (Layton et al, 2006).

Análisis de regresión logística, revelan que los marcadores ARNr 16S totales y humano-específicos de Bacteroidales, predicen valores de presencia de *E. coli* O157, *Salmonella* y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Estas bacterias patógenas se vuelven significativamente altas cuando las concentraciones de marcadores totales y específicos ARNr 16S de Bacteroidales, exceden 10^3 y 10^4 copias/100 ml (Savichtcheva et al, 2007).

Enfoque de los métodos de detección contemporáneos

Dependiendo del tiempo que requieren los estudios desde la colecta de la muestra hasta tener el resultado final, los métodos de detección se agrupan en: métodos en base a cultivo (3-14 días de duración), métodos rápidos (24-48 h), ultra rápidos (8 h o menos) y métodos de tiempo real (de segundos a minutos). El enfoque de los métodos de estudio ultra rápidos es similar a los métodos de 24 a 48 h, pero incorpora el método de PCR cuantitativa en tiempo real o el método de biosensor que tienen un límite de detección de 10^2 a 10^4 UFC, por lo que no se necesita de cultivo enriquecido prolongado. Los ensayos de PCR son altamente sensibles, requieren un mínimo de 50 a 10^2 UFC para un resultado positivo, aunque es posible que falle debido a los inhibidores presentes en muestras de alimentos (Bhunja, 2013).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que se realiza en tubos de ensayo para amplificar una secuencia seleccionada de ADN o ARN, si previamente se sintetiza su ADN complementario, y permite sintetizar millones de copias de esta secuencia de nucleótidos en unas cuantas horas. El método puede usarse para cualquier fuente;

bacterias, virus, plantas o animales. Sin embargo, es un requisito imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de ADN o ARN que se quiera amplificar (Herráez, 2012; Champe et al 2006).

El principio del método se basa primeramente en la desnaturalización del DNA para dar moléculas monocatenarias y posteriormente hibridarlas con oligonucleótidos, por lo que se debe conocer parte de la secuencia, por último, se lleva a cabo la replicación de la molécula monocatenaria mediante una ADN polimerasa que emplea el oligonucleótido anterior como cebador de las nuevas cadenas a amplificar (Herráez, 2012).

La especificidad de la PCR es muy elevada ya que está determinada especialmente por la secuencia de los dos cebadores utilizados y por las condiciones de hibridación. Se puede determinar la especificidad, analizando en electroforesis el producto de la PCR, la cual se ve como la aparición de una banda única para el fragmento específico. La PCR tiene una sensibilidad muy alta, tanto que puede detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra, sin embargo, esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra. Se han sugerido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad, adaptarse a muestras particulares, amplificar moléculas de ARN en lugar de ADN, etc., entre las que se encuentra la PCR en tiempo real (Herráez, 2012).

PCR en tiempo real

La PCR en su diseño original, es una técnica de punto final, es decir, analiza el producto obtenido tras finalizar la reacción (Herráez, 2012). Debido a la necesidad de tener un ensayo medible, se ha desarrollado la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real que mide la velocidad a la que se va amplificando el ADN. En concreto, se observa la fase en la que la reacción es aun exponencial por tanto mantiene la proporcionalidad respecto a la cantidad inicial de ADN, y se cuantifica el número de ciclos que han sido necesarios para alcanzar una cantidad prefijada de ADN producto. La cuantificación depende de un compuesto que se une al ADN bicatenario, producto de la reacción de amplificación. Habitualmente se utilizan fluorocromos (intercambiantes o ligandos en el surco menor del ADN) que se unen muy preferentemente en la cadena bicatenaria e

incrementan de forma notable su fluorescencia. De forma automatizada, prácticamente en continuo, se mide la intensidad de fluorescencia en cada muestra al finalizar cada ciclo de amplificación, como índice del número de copias conseguidas (Herráez, 2012).

Una desventaja de esta técnica, es que no es demasiado selectiva, pues es independiente de la secuencia del ADN y no permite diferenciar si ese DNA bicatenario corresponde efectivamente a la amplificación selectiva del ADN diana (Herráez, 2012; Ashbolt et al, 2001).

PCR en tiempo real para Bacteroidales

Los ensayos moleculares para Bacteroidales han sido diseñados para identificar regiones altamente conservadas del gen del ARNr 16S, haciendo que las regiones variables sean representativas de un huésped específico. Se han diseñado oligonucleótidos para los genes ARNr 16S de *Bacteroidales* para diferenciar entre humano y animales rumiantes, y más recientemente para identificar los genes de cerdo y de equinos.

Ensayos realizados para determinar el origen de la contaminación fecal en muestras de cuencas de agua utilizando PCR en tiempo real diseñados para genes de Bacteroidales de bovinos (BoBac) y humano (HuBac), probados en heces de humanos, bovinos, cerdos, caninos y equinos, demostraron que el marcador BoBac fue específico e identificable para muestras fecales de bovinos con un 100% de positivos verdaderos y un 0% de falsos positivos; mientras que la identificación del marcador HuBac tuvo un 100% de positivos verdaderos, pero un 32% de falsos positivos (Layton et al, 2006).

En base a estas nuevas tecnologías y a que las bacterias indicadoras tradicionales de contaminación fecal como *E. coli* presentan un alto grado de diversidad genética no atribuible a la fuente animal específica de huésped, es por lo que el siguiente trabajo estará dedicado al estudio de la validación de secuencias genética conservadas o marcadores, presentes en el gen 16S ARNr de Bacteroidales en muestras de heces de animales de diferentes especies de humanos y combinación de todos ellos, simulando una contaminación en vegetales a nivel de laboratorio, para posteriormente identificar la fuente de la que provienen.

2.5 TOMATE

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es, en sentido estricto, una fruta, pues nace de una flor y tiene semillas de las cuales nacerá otro arbusto. Ya sea que le llamemos tomate o jitomate, dependiendo de la región de México en la que se encuentra, constituye uno de los ingredientes más utilizados en la cocina de nuestro país y de una buena parte del mundo. Se utiliza sobre todo en ensaladas, platillos y jugo fresco. La industria de la alimentación lo prepara de muchas maneras: desde jugos, purés, conservas de tomates enteros y pelados, fritos, hasta como ingredientes de diversas salsas picantes, dulces, mermeladas, esencia para la elaboración de alimentos, saborizantes y más productos. En otras palabras, el jitomate está presente en muchas de las cosas que comemos.

El jitomate es una fruta de forma generalmente redondeada y achatada, excepto algunas variedades de fruto alargado, como el saladette. Aunque son de diferentes tamaños, por lo general es un fruto grande. A veces no es completamente liso, sino que presenta gajos algo profundos. Al madurar adquiere un color rojo en la cáscara y en la pulpa, que es un tanto gelatinosa y dividida en lóculos con semillas. El color del jitomate, verde al principio y rojo cuando madura, se debe a una sustitución de clorofila por carotenos. Las variedades más conocidas son saladette, bola y cherry. Es una planta muy versátil que crece bien en casi todos los climas y terrenos. Una tierra rica en nutrientes y en especial el estiércol bien descompuesto favorecen que los frutos sean más gruesos, y por tanto, más solicitados. (SAGARPA-SIAP, 2014)

2.6 FRESA

La fresa (*Fragaria vesca*) es un fruto nativo de las regiones templadas del planeta. Se cultiva en grandes cantidades tanto con fines comerciales como por parte de horticultores aficionados. Son también un importante insumo para la industria alimenticia. Se emplean sobre todo en la pastelería para hacer pasteles, mousses, suflés, así como en confitería. Con las fresas también se elaboran mermeladas y jaleas. Además, se les atribuyen grandes propiedades curativas y antioxidantes.

La planta de la fresa es una hierba perenne, es decir, vive más de un año. Sus raíces son fasciculadas; se componen de raíces y raicillas. En condiciones óptimas, la planta puede alcanzar entre dos y tres metros de longitud, aunque lo normal es que no sobrepasen los cuarenta centímetros; aun en estos casos, la mayor parte de la planta se encuentra en los primeros 25 centímetros. Las flores son blancas y se organizan en cimas. Tienen cáliz de cinco piezas hendidas, cinco pétalos redondeados y numerosos estambres y pistilos. El fruto es el resultado de la agregación de muchos carpelos secos diminutos sobre un receptáculo pulposo de color rojo escarlata. La fresa es la única fruta que tiene las semillas en la piel, por lo que su superficie es algo irregular.

Las fresas deben sembrarse a una profundidad tal que el cuello de la raíz quede a nivel del suelo, de manera que no queden raíces expuestas. La fruta se recolecta manualmente, cada tres días, ya que es altamente perecedera. Una fresa cosechada en plena maduración se deteriora casi por completo en sólo ocho horas, a temperatura ambiente. Cuando empieza la recolección se van separando de acuerdo a su calidad y se empacan en el mismo sitio. Más tarde vendrá el proceso de transporte y almacenamiento (SAGARPA-SIAP, 2014).

3. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La incidencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos asociados con vegetales frescos ha ido en aumento durante las últimas décadas acompañada de grandes pérdidas financieras en el campo. La mayoría de los brotes normalmente son causados por bacterias provenientes de contaminación fecal, por lo que la preocupación de tener alimentos más seguros ha llevado al desarrollo de técnicas que puedan establecer la fuente principal de contaminación en estos alimentos, ya que son fácil de contaminar antes, durante y después de su cosecha, hasta que llegan al plato para ser ingeridos. Algunos de los organismos indicadores de contaminación más utilizados actualmente para asegurar la inocuidad de los vegetales frescos incluyen bacterias coliformes fecales, *E. coli*, y *Enterococcus* spp. Sin embargo, entre los indicadores más prometedores se encuentran los miembros del orden Bacteroidales, los cuales son considerados como los más apropiados debido a que están limitados a animales de sangre caliente, son los componentes dominantes de la microflora intestinal en humanos y animales, y no tienen la habilidad de proliferar en el ambiente.

Los métodos convencionales como el cultivo enriquecido, medios selectivos y confirmación, para la detección de patógenos transmitidos por alimentos, suelen ser algo tardado y no muy específicos, por lo que se ha optado por utilizar métodos más eficientes como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que reemplaza estos tres pasos en uno solo, siendo incluso éste un método con mayor sensibilidad y especificidad. El análisis de Bacteroidales es de los más utilizados para la detección e identificación de la fuente de contaminación fecal en agua, mientras que en alimentos como los vegetales frescos, es muy escaso, por lo que la justificación del proyecto se centra en proponer el uso de microorganismos del género *Bacteroidales* como indicadores alternativos para el rastreo de la fuente de contaminación fecal en vegetales, mediante técnicas moleculares que puedan dar no solo la detección, sino la cuantificación de estos organismos para hacer una correlación con la presencia y cantidad de indicadores tradicionales presentes en estos alimentos. De esta manera, podremos mejorar el control higiénico y así atacar de raíz el problema de contaminación, repercutiendo esto en la salud humana y en la economía alimentaria.

4. HIPÓTESIS

El uso de marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de humano, perro y vaca, permiten el rastreo e identificación de la fuente de contaminación fecal en lavados de tomate y fresa.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar el uso de marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de humano, perro y vaca, para el rastreo e identificación de la fuente de contaminación fecal y compararlo con las bacterias tradicionales indicadoras de contaminación fecal, en lavados de tomate y fresa.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Validar oligonucleótidos para marcadores específicos de Bacteroidales en heces de humano, vaca, perro, cerdo y ave mediante PCR punto final.
- 2) Construir una curva de cuantificación del marcador universal AllBac de una cepa *E. coli* transformada con un plásmido del gen ARNr 16S mediante PCR tiempo real.
- 3) Diseñar protocolos de descontaminación y contaminación fecal para tomate y fresa; y determinar el límite de detección de células Bacteroidales en lavados de tomate y fresa, en base a la cuantificación del marcador universal AllBac.
- 4) Enumerar indicadores tradicionales (*E. coli*, *Enterococcus* spp. y coliformes totales) mediante técnicas microbiológicas, cuantificar el marcador AllBac para Bacteroidales mediante qPCR e identificar los marcadores específicos de huésped en lavados de tomate y fresa contaminados artificialmente con heces de humano, perro y vaca.
- 5) Realizar un análisis de correlación entre presencia de Bacteroidales con indicadores bacterianos tradicionales con contaminación fecal

7. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó la cuantificación del marcador genético universal Allbac para *Bacteroidales* spp. mediante qPCR, la identificación de los marcadores de Bacteroidales específicos de huésped y la enumeración de *E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus* spp., en lavado de tomate y fresa contaminados artificialmente con heces de animales en el laboratorio.

Obtención de las muestras

Las muestras de tomate y fresa fueron obtenidas de supermercados del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se seleccionaron los vegetales que no tuvieran daño visible como cortaduras o que presentaran zonas con hongos o putrefacción, estas fueron transportadas en refrigeración y se analizaron durante las siguientes 24 h de haber sido obtenidas.

Las muestras de heces de cerdo, vaca y ave se obtuvieron del Rancho Agrícola-Ganadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León con sede en Marín, Nuevo León, mientras que las de humano y perro se tomaron en diferentes puntos del área metropolitana de Monterrey N. L. Todas las muestras se transportaron en condiciones de refrigeración y fueron congeladas a -20°C al llegar al laboratorio.

Activación de las cepas bacterianas

Se utilizaron 2 cepas control para el análisis de *Bacteroidales*

- *Bacteroidales thetataomicron* ATCC 29148, la cual está conservada en crioviales a -80°C a una concentración de 1.1×10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) por ml. La cepa se activó en 7 ml de caldo Fluido Tiogicolato a 37° C por 48 h y de allí se pasó una asada al medio Agar Soya Trypticasa con 5% de sangre y se colocó en anaerobiosis (Gas Pack) para ser incubada a 37°C por 48 h. Esta cepa se utilizó como cepa control positivo para el marcador universal Allbac.
- *Escherichia coli* que contiene un plásmido (4071 pb) con un inserto positivo para el gen AllBac (171 pb), la cual está conservada en crioviales a -80°C. La cepa se

activó en tubos de 4 ml de caldo Luria Bertani con Ampicilina y se incubó a 37°C por 20 h.

Las cepas fueron donadas por la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Estados Unidos, y sirvieron para la elaboración de curvas de crecimiento de Bacteroidales presentes en las muestras.

VALIDACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA Bacteroidales

Los marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de huésped se validaron mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en punto final a diferentes condiciones de temperatura (Tabla 1), especialmente a diferente temperatura de alineamiento en donde los oligonucleótidos se unen a la hebra de ADN. Se validó el marcador universal para Bacteroidales, AllBac, en muestras de heces de humano, perro, vaca y cerdo, así también el marcador específico Bvulg para Bacteroidales de humano, Bobac para vaca, Pig-2-Bac para cerdo y BacCan para perro. Para la validación, se tomaron 0.2 g de cada muestra de heces y se colocaron en un tubo de lisis para la extracción de ADN mediante el kit comercial ISOLATE Fecal DNA de la marca Biorline.

La detección del marcador universal para el gen ARNr 16S para *Bacteroidales spp.* Allbac, así como para los marcadores específicos de humano (Bvulg) y para vaca (BoBac), fue realizada utilizando oligonucleótidos y sondas específicas. Los 20 µl del master mix de la qPCR contenían 1X del buffer PCR (SensiFast, marca Biorline), 200 nM de desoxinucleosido de trifosfato (dNTP), 1.5 mM de MgCl₂, 200 nM de oligonucleótidos, 80 nM de sonda, 1U de Taq polimerasa, de 2 a 5 µl de ADN experimental y el resto de agua libre de DNasas hasta completar el volumen. En el caso del marcador específico para cerdo (Pig-2.bac) y perro (BacCan), los 20 µl contenían la misma concentración de los reactivos antes mencionados a excepción de la sonda (Tabla 2), y además contenía la fluoresceína SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, marca BIORAD).

Tabla 1. Condiciones de PCR para marcadores de Bacteroidales

Contaminación	Marcador	Nombre del oligonucleótido/s onda (conc. en nM)	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb)	Condiciones qPCR	Referencias		
General	AllBac	AllBac296f (200)	GAGAGGAAGGTCCCCCAC	108	1 ciclo: 2 min a 95°C 45 ciclos: 15 seg a 95°C 1 ciclo: 30 seg a 53°C 30 seg a 72°C	Ravaliya, et al , 2013		
	AllBac	AllBac412r (200)	CGTACTTGGCTGGTTCAG					
	AllBac	AllBac375Bhqr (80)	CCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCCT					
Humano	Bvulg	BVulgF1 (200)	CATCATGAGTCCACATGTTCA	166				
	Bvulg	BFDRev (200)	CGTAGGAGTTTGGACCGTGT					
	Bvulg	BDFDAM (80)	CTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGA					
Vaca	BoBac	BoBac367f (200)	GAAG(G/A)CTGAACCAGCCAAGTA	116	1 ciclo: 2 min a 95°C 45 ciclos: 15 seg a 95°C 1 ciclo: 30 seg a 57°C 30 seg a 72°C			
	BoBac	BoBac467r (200)	GCTTATTCATACGGTACATACAAG					
	BoBac	BoBac402Bhqr (80)	TGAAGGATGAAGGTTCTATGGATTGTAAC TT					
Perro	BacCan	BacCan-545f1 (200)	GGAGCGCAGACGGGTTTT	145			1 ciclo: 2min 50° 10 mins 95° 40 ciclos: 15 s a 95° 1 min a 60°	Silkie, et al, 2009
	BacUni	BacUni-690r1 (200)	CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA					
Cerdo	PigBac	Pig-2-Bac41F (200)	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	116			1 ciclo: 10 min a 95°C 40 ciclos: 15 seg a 95°C 1 min a 60°	Mieszquin, et al, 2009
	PigBac	Pig-2-Bac163Rm (200)	ACCTCATACGGTATTAATCCGC					

FAM, 6-carboxyfluorescein; BHQ-1, black hole quencher 1; TET, 6-carboxy-2-,4,7,7=-tetrachlorofluorescein succinimidyl ester

Tabla 2 Preparación de la qPCR para los marcadores de Bacteroidales

Ingredientes	Concentración inicial	Cantidad (μ l)	Concentración final
Master Mix	2X	10	1X
Primer F	4000 nM	1	200 nM
Primer R	4000 nM	1	200 nM
Sonda	80 nM	1	80 nM
H2O	Completar hasta un volumen final de 20 μ l		
ADN experimental	30 ng/ μ l	2-5	60-150 ng/ μ l

ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN AllBac

Para la construcción de la curva de cuantificación del marcador Allbac se utilizó una cepa control de *E. coli* transformada que contenía un plásmido con el inserto Allbac, la cual se activó en tubos con 4 ml de caldo Luria Bertani con ampicilina (50 μ g/ μ l), 20 h antes de la extracción. Para la extracción de ADN plasmídico, se tomaron 2 alícuotas del cultivo y se centrifugaron a 14,000 x g por 2 min, se desechó el sobrenadante y al pellet se le realizó la extracción por lisis alcalina según lo especificado por el Protocolo No. 1 (Preparación del ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS) del manual *Molecular Cloning* (Green y Sambroock, 2012), siguiendo el mismo protocolo para muestras de cultivo bacteriano de baja escala (1-2 ml). Esto se realizó con el fin de verificar la presencia de los genes deseados en las cepas de *E. coli* transformadas y el funcionamiento de los oligonucleótidos (Green y Sambroock, 2012). El protocolo que se siguió consistió en lo siguiente:

Extracción de ADN plasmídico de cepa control *E. coli* – AllBac mediante lisis alcalina con SDS.

Se inocularon 4 ml de caldo Luria Bertani con kanamicina (50µg/ml) con una sola colonia de bacteria transformada y se dejó en incubación por 20 h a 37° C, del cultivo se tomaron 3 ml y se repartieron en dos tubos Eppendorf de 1.5 ml para centrifugarse a máxima velocidad por 30s a 4° C. Después se removió el medio por aspiración, dejando el pellet lo más seco posible. En cada tubo se resuspendió el pellet bacteriano en 100 µl de solución I por vortex y se adicionaron 200 µl de solución II mezclándolo por inversión 5 veces. Seguido de eso se le adicionaron 150 µl de solución III y se mezcló por inversión 10 veces para posteriormente almacenarlo en hielo de 3 a 5 min. Pasado el tiempo se centrifugó el lisado bacteriano a máxima velocidad por 5 min a 4° C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para precipitar los ácidos nucleicos añadiendo 2 volúmenes (de 900 µl) de etanol al 96%, mezclando la solución en vortex y dejándolo asentar por 2 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4° C y se decantó el sobrenadante. Al pellet se le añadió 1 ml de etanol al 70% o isopropanol y se invirtió 10 veces para posteriormente centrifugarlo a máxima velocidad por 2 min a 4° C para recuperar el ADN removiendo el sobrenadante gentilmente por aspiración asegurándose que no queden restos de etanol en el tubo manteniéndolo abierto a temperatura ambiente de 5 a 10 min hasta evaporarse todo el etanol. Por último, se disolvió el ácido nucleico en 50 µl de buffer TE o agua miliQ libre de DNAasas, re suspendiéndolo en vortex por unos segundos y se almacenó el tubo a -20° C hasta su uso.

Solución I

- Glucosa 50 mM
- EDTA 10 mM
- Tris-Cl 25 mM

Solución II

- NaOH 0.2 N
- SDS 1%

Solución III

- KOAC 5 M
- Ácido acético glacial

Curva de cuantificación de marcador Allbac

Una vez obtenido el DNA plasmídico, se cuantificó en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), obteniendo entre 800 y 1000 ng/μl por extracción. A partir de este ADN se hicieron diluciones seriadas 1:10 (correspondientes a 100 ng/μl a 1×10^{-4} pg/μl [0.0000001 ng/μl]) y se realizó la reacción de qPCR en el equipo Piko Real (Thermo Scientific (Tabla 3). Cada concentración del ADN del plásmido equivalía a un número específico de copias génicas logarítmicas correspondiente al tamaño del plásmido, el cual se calculó en base a la fórmula:

$$\text{Número de copias} = (\text{cantidad ADN} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{longitud} * 1 \times 10^9 * 650)$$

$$\text{Número de copias} = (\text{ng} * \text{numero/moles}) / (\text{pb} * \text{ng/g} * \text{g/ moles de bp})$$

Este cálculo está basado en la suposición de que el peso medio de un par de bases (pb) es de 650 Daltons, esto significa que un mol de un pb pesa 650 g y que el peso molecular de cualquier molde de ADN de doble cadena puede ser estimado tomando el producto de su longitud (en pb) y 650 (URI Genomics & Sequencing Center, 2004). El número de moléculas o número de copias del ADN molde en la muestra se puede estimar mediante la multiplicación por 1×10^9 para convertir a ng y luego multiplicando por la cantidad del ADN (en ng).

Tabla 3. Número de copias logarítmicas del plásmido (con inserto del marcador Allbac) en base a la concentración de ADN.

Concentración ADN plasmídico (ng/ μ l)	Copias génicas \log_{10}	Ct (Ciclo de amplificación)
100	10.35	14.5
10	9.35	15.73
1	8.35	19.11
0.1	7.35	21,76
0.01	6.35	23.42
0.001	5.35	25.35
0.0001	4.35	27.42
0.00001	3.35	29.83
0.000001	2.35	32.72
0.0000001	1.35	34.66

CONTAMINACION ARTIFICIAL DE LOS VEGETALES CON HECES DE HUMANO, PERRO Y VACA.

Descontaminación de tomate y fresa

Al llegar al laboratorio, los vegetales se colocaron en charolas en donde se les retiró cualquier material orgánico o suciedad visible con ayuda de una torunda con etanol al 95%, después se lavaron con un jabón comercial y se desinfectaron colocándolos en una solución de plata coloidal al 0.32% sumergiendo 7 tomates en 1 L de solución o 7 fresas en 500 ml durante 15 min seguidos de 3 lavados con agua destilada estéril durante 1 min con agitación delicada, se dejaron secar por 1 h y se expusieron a luz UV durante 20 min, esto con el fin de asegurarnos que no hubiera ADN de Bacteroidales que pudieran darnos falsos positivos.

Preparación del inóculo de heces

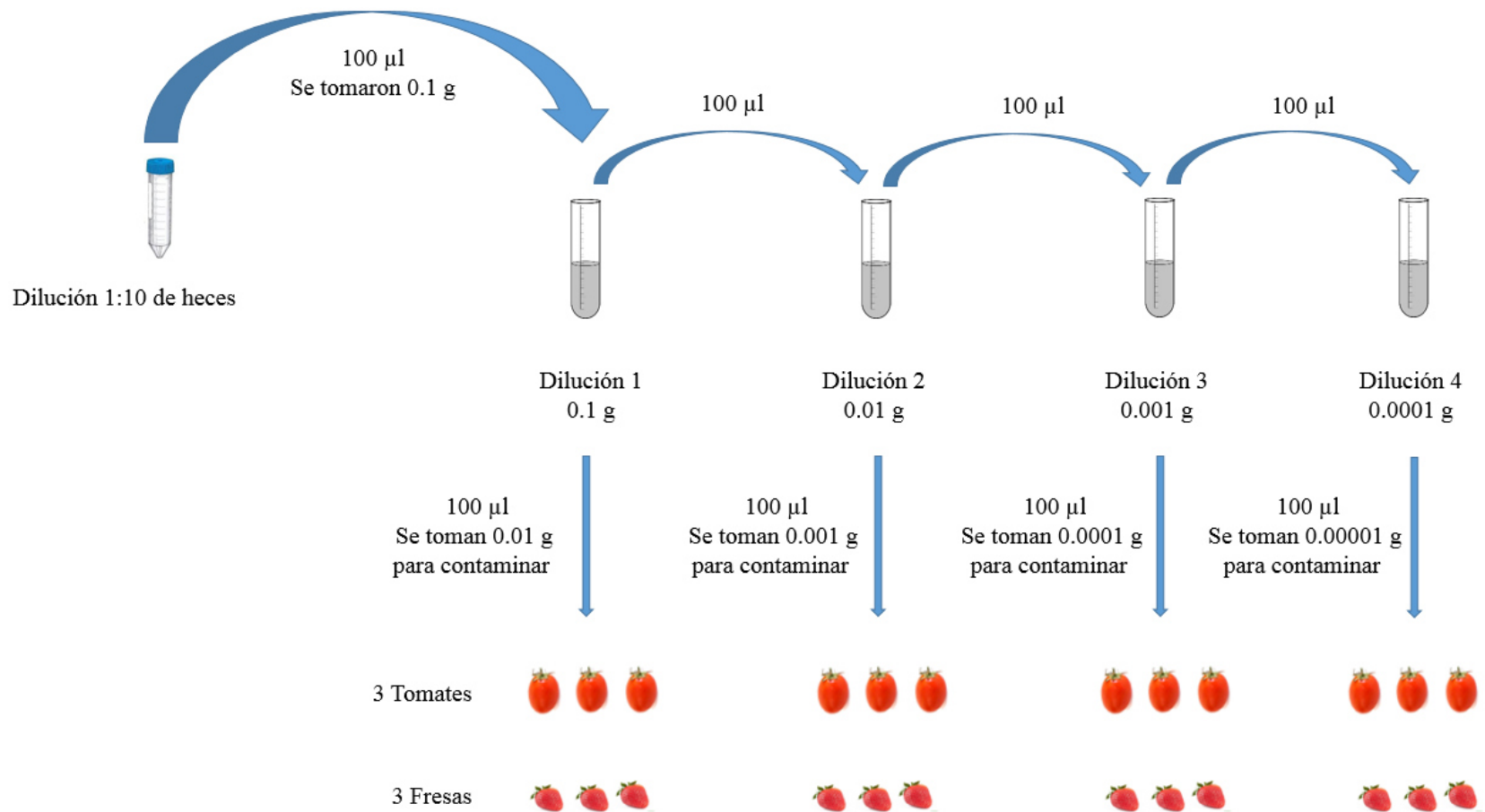
Se hicieron mezclas de 4 muestras de heces por tipo de huésped de manera independiente, es decir, se mezclaron 4 muestras de heces de humano en un tubo cónico de 50 ml, 4 de perro en otro tubo y 4 de vaca en otro tubo, y se homogenizaron. De cada muestra de heces se tomó 1g y se diluyeron en solución salina estéril hasta completar un volumen de 40 ml (dilución 1:10, 4 g de heces + 36 ml de SS), se mezcló en vortex y por último se filtró en gasa estéril para eliminar restos de alimento no digerido. A partir de la mezcla filtrada se hicieron 4 diluciones seriadas, las cuales se utilizaron para inocular los tomates y las fresas.

Contaminación de tomate y fresa con heces diluidas a partir de una mezcla filtrada.

Se tomaron 3 tomates o 3 fresas previamente descontaminadas y se contaminaron inoculando 100µl de la dilución de heces, colocando en 10 ocasiones alícuotas de 10µl en la superficie de cada vegetal. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Los vegetales contaminados se colocan en una cámara bioclimática (Thermo Scientific) a 25°C y 30% de humedad relativa durante 1h con el fin de favorecer la adherencia de las células bacterianas a la superficie de los vegetales. Posteriormente, los vegetales se lavaron con agua peptonada al 0.1% en una proporción de 100 ml por cada tomate y de 36 ml por cada fresa (300 ml para una bolsa con 3 tomate y 110 ml para una bolsa con 3 fresa) y se homogenizaron por 1 min. De cada lavado se filtraron diferentes volúmenes a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. Las membranas se colocaron en agar Rapid *E. coli* 2TM para la enumeración de coliformes totales y de *E. coli*, y en agar KFStreptococcus para la enumeración de *Enterococcus*. Por último, se filtraron 200 ml del resto del lavado en el caso de los tomates y 70 ml en el caso de las fresas a través de membranas, las cuales se cortaron en dos, se colocaron en tubos cónicos de 15 ml y se congelaron a -20 °C para su posterior extracción de ADN mediante el kit ISOLATE Fecal DNA (Bioline).

Figura 1. Preparación de las diluciones de heces para la contaminación de vegetales



ENUMERACIÓN DE INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN TOMATE Y FRESA

Enumeración de *E. coli* y coliformes totales

De cada bolsa de lavado de tomates o fresas contaminados, se filtraron de 3-5 ml o 1- 3 ml respectivamente a través de membranas de nitrocelulosa de 45 μm . Los filtros fueron removidos y colocados sobre una placa Petri conteniendo agar Rapid' *E. coli* 2 para ser incubadas a 37°C por 24 h. Se contaron las colonias considerándose como coliformes a colonias azul-verdosas o colonias rosas o violetas para *E. coli*. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Enumeración de *Enterococcus* spp.

Se siguió el procedimiento especificado en el punto anterior, con la diferencia que el agar que se utilizó fue KFStreptococcus y la incubación fue a 37°C durante 48 h. Se contaron las colonias pequeñas de color rojo de 0.3 a 2 mm, con halo amarillo que corresponden a las sales biliares precipitadas.

Cuantificación del marcador AllBac y enumeración de Bacteroidales

De los lavados de tomate y fresa, se filtraron de cada dilución 250 ml de tomate y 90 ml de fresa a través de membranas de nitrocelulosa de 45 μm , las cuales fueron cortadas y colocadas en tubos cónicos de 15 ml. En ellas se realizó la extracción de ADN mediante el kit ISOLATE Fecal ADN. Todas las muestras de ADN obtenidas de estas extracciones, se resuspendieron en 50 μl de agua mili Q estéril y fueron cuantificadas en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para posteriormente realizarles qPCR (Piko Real, Thermo Scientific) utilizando 5 μl de ADN que correspondía a 100 y 150 ng/ μl . Por último, se cuantificó el marcador Allbac extrapolando el ciclo de amplificación de cada muestra en la ecuación de la recta de la curva estándar, dando como resultado el total de copias génicas logarítmicas del fragmento de amplificación correspondiente al marcador de interés, el cual se dividió entre 6.5 para obtener el número de células Bacteroidales.

Identificación de marcadores específicos de Bacteroidales en muestras compuestas de lavado de tomate y fresa contaminados artificialmente.

Con el mismo ADN extraído a partir de los lavados de tomate y fresa, se realizó PCR punto final (termociclador PCR Express, Thermo Hybaid) utilizando los oligonucleótidos de los marcadores Bvulg (para humano), BoBac (para vaca) y Bac Can (para perro). Terminada la amplificación, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% con un tinte libre de agentes tóxicos y cancerígenos (Hydra Green). Por último, los geles se observaron en un transiluminador de UV.

8. RESULTADOS

8.1 VALIDACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA Bacteroidales TOTALES Y ESPECIFICOS.

El marcador genético universal AllBac, para todos los Bacteroidales se validó mediante la técnica de PCR punto final en muestras de ADN extraídas de heces de humano, perro, vaca, cerdo, ave y en las cepas control *E. coli* - Allbac y una cepa de *Bacteroidales thetaiotamicron*, observándose una banda correspondiente a 108 pares de bases de este marcador en todas las muestras de los diferentes huéspedes (Fig. 2).

Los marcadores genéticos para Bacteroidales específicos de huésped, Bvulg para humano, PigBac para cerdo, BoBac para vaca, BacCan para perro y Lac para *Lactobacillus* de ave, también se validaron mediante PCR punto final en muestras de ADN extraídas de heces y posteriormente por la PCR tiempo real. Estos marcadores correspondieron a un peso de entre 100 y 345 pares de bases (Fig. 3).

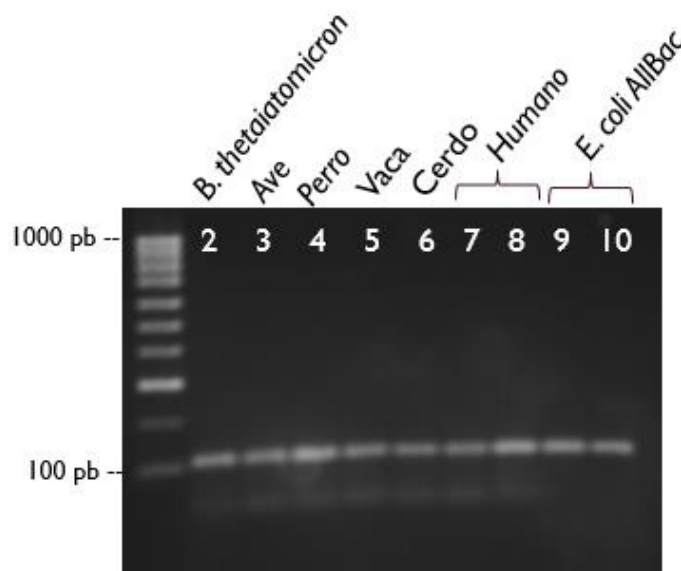


Figura 2. Detección del marcador universal Allbac (108 pb) en muestras de heces de humano (carriles 7 y 8), animales (carriles 3 a 6) y cepas control *E. coli* – Allbac (carriles 9 y 10) y *B. thetaiotamicron* (carril 2) mediante PCR punto final.

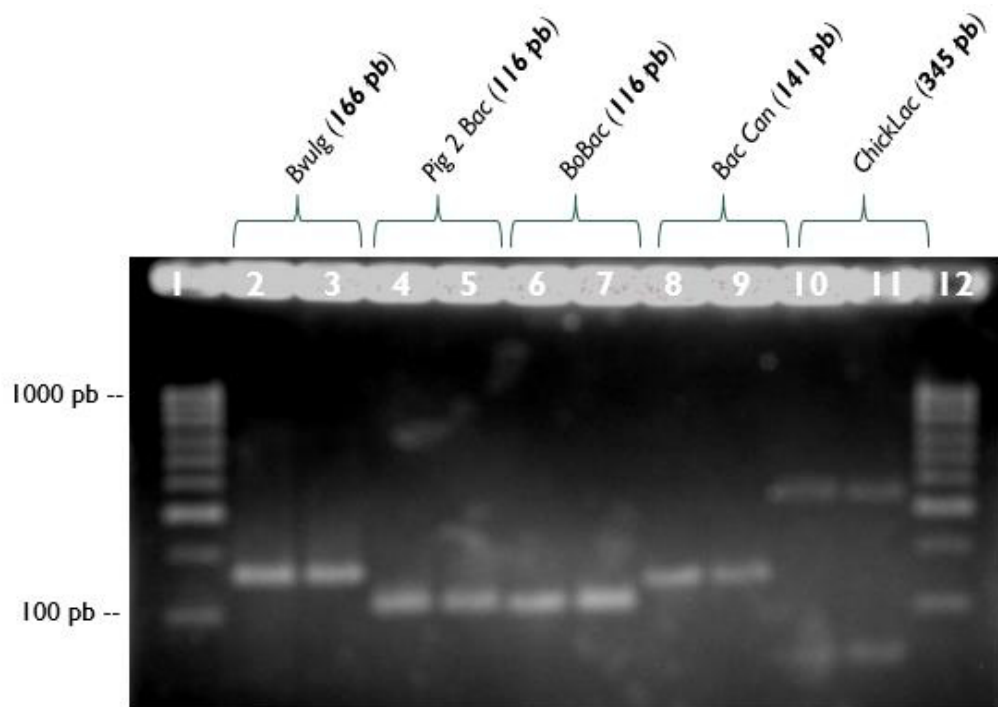


Figura 3. Detección de marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de huésped mediante PCR punto final. Carriles 2 y 3 marcador humano (Bvulg) de 166 pb, carriles 4 y 5 marcador de cerdo (PigBac) de 116 pb, carriles 6 y 7 marcador de vaca (BoBac) de 116 pb, 141 pb para marcador de perro (BacCan) y carriles 8 y 9 marcador de ave (Lac) de 345 pb.

Todos los marcadores alinearon los oligonucleótidos, aunque en algunos casos hubo necesidad de variar la temperatura de extensión de la polimerasa. En la Tabla 1 se resumen todas las condiciones de la validación de los marcadores utilizados, y de estos marcadores se escogieron Bvulg para humano, BacCan para perro, BoBac para vaca y el universal Allbac para la realización de la contaminación artificial del tomate y la fresa.

8.2 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MARCADOR UNIVERSAL ALLBAC PARA Bacteroidales TOTALES.

El límite de cuantificación del marcador AllBac para la enumeración de Bacteroidales totales, en base a las copias génicas logarítmicas de la curva de cuantificación fue de 1.35 CEG, siendo el rango dinámico de cuantificación de 1.35 a 10.35 CEG (Fig. 4), que corresponde al rango de 2 a 10^9 células, tomando en cuenta que existen de 4 a 7 copias del gen ARNr 16S en una célula de *Bacteroidales* spp.

Se realizaron ensayos preliminares de contaminación de los vegetales con diferentes diluciones de la mezcla de heces y se determinó el límite de detección, el cual fue de 0.6 copias génicas logarítmicas, que corresponden a 1 célula.

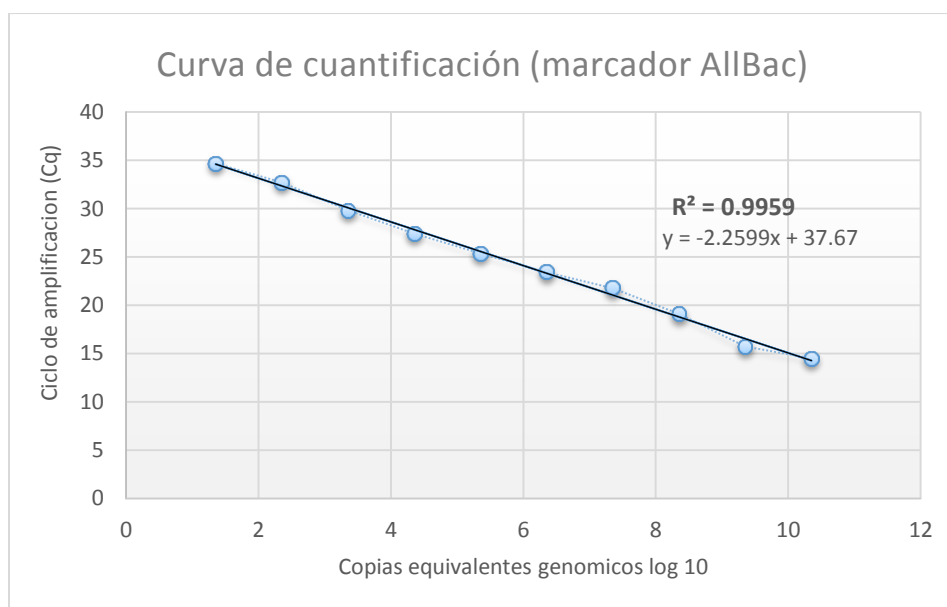


Figura 4. Curva estándar del marcador universal AllBac mediante PCR tiempo real para la cuantificación de Bacteroidales totales.

8.3 ENUMERACIÓN DE Bacteroidales E INDICADORES TRADICIONALES DE CONTAMINACIÓN CON HECES

Contaminación con heces humanas

Para los lavados de los tomates contaminados con cuatro diluciones correspondientes a una concentración de 10 a 0.01 mg de heces humanas a partir de un inóculo de 10^7 log UFC de Bacteroidales, se recuperaron 6 logaritmos en aquellos contaminados con 10 mg de heces, y en las contaminadas con 0.01 mg (4ta dilución) fue posible realizar el recuento, aunque fue menos de 1 logaritmo (Tabla 5). En cuanto a los coliformes totales y *Enterococcus* spp., estos se recuperaron hasta la contaminación con 0.01 mg de heces, tomando en cuenta el inóculo inicial de cada uno, sin embargo, en el caso de *E. coli*, este se recuperó hasta la contaminación con 0.1 mg (tercera dilución) con un inóculo inicial de 10^3 log de UFC (Tabla 4). El marcador genético Bvulg para la identificación de la fuente de contaminación humana, se logró detectar en el 100% los lavados de muestras compuestas de tomates contaminados con 10 mg y 1 mg mediante PCR punto final, siendo que en las mismas muestras de lavado se cuantificó un promedio de 10^5 log UFC Bacteroidales spp. utilizando el marcador Allbac, sin embargo, este inóculo no correspondió al total de Bacteroidales específicos de humano presentes en la muestra (Fig. 5B).

En los lavados de fresas contaminadas con heces humanas a partir de un inóculo de 10^7 log UFC de Bacteroidales, se recuperaron 6 logaritmos en las primeras dos contaminaciones (10 y 1 mg) así como con 0.01 mg aún fue posible detectar a estos microorganismos (Tabla 6). En cuanto a los indicadores tradicionales de contaminación fecal (*E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus* spp.) estos se pudieron recuperar en todas las diluciones analizadas (Tabla 4). El marcador genético Bvulg para la identificación de la fuente de contaminación humana en los lavados de fresas, se logró detectar en el 100% de 10 mg y 1 mg de las muestras analizadas, y en el 33% de las contaminadas con 1 mg mediante PCR punto final. Cabe señalar que en estas muestras se cuantificó un promedio de 10^2 log UFC Bacteroidales spp. utilizando el marcador Allbac, que tampoco concordó con el total de Bacteroidales específicos de humano inoculados (Fig. 6B).

Contaminación con heces de perro

En este caso se recuperaron 6 logaritmos de UFC de Bacteroidales en los lavados de muestras de tomate contaminadas con 10 mg de heces, pudiéndose detectar en las contaminadas con 0.01 mg (2 logUFC) (Tabla 5). Los indicadores tradicionales de contaminación fecal, se recuperaron en los lavados de muestras contaminadas hasta con 0.1 mg (Tabla 4). El marcador genético BacCan para la identificación de la fuente de contaminación canina en los lavados de tomate, se logró detectar en el 100% de las muestras compuestas contaminadas con 10 y 1 mg, y hasta en un 66% de las muestras contaminadas con 0.1 mg (10^3 log UFC *Bacteroidales* spp.) (Fig. 7B).

En los lavados de fresas se recuperaron 6 logaritmos de UFC de Bacteroidales en aquellas contaminadas con 10 mg, siendo aún cuantificable hasta en las contaminadas con 0.1 mg (< 1 log UFC, Tabla 6). Los indicadores tradicionales se recuperaron en las fresas contaminadas con hasta 1 mg de heces, y los coliformes totales hasta las contaminadas con 0.01 mg (Tabla 6). El marcador genético BacCan en los lavados de fresas, se logró detectar en el 100% de las muestras compuestas contaminadas con 10 y 1 mg, y hasta en un 33% de las muestras contaminadas con 0.1 mg (0.5 log UFC *Bacteroidales* spp., Fig. 8B).

Contaminación con heces de vaca

En el caso de los lavados de tomate a partir de un inóculo de 10^6 log UFC de Bacteroidales spp., se recuperaron 6 logaritmos en los lavados de muestras contaminadas con 10 mg, siendo aún cuantificable hasta 2 logaritmos de UFC en aquellos contaminados con 0.1 mg (Tabla 5). Los indicadores tradicionales de contaminación fecal, *E. coli* y *Enterococcus* spp., se recuperaron aun en los lavados de muestras contaminadas con hasta 0.1 mg, y los coliformes totales hasta los contaminados con 0.01 mg, tomando en cuenta el inóculo inicial de cada uno (Tabla 4). El marcador genético BoBac para la identificación de la fuente de contaminación bovina en los lavados de tomate, se logró detectar en el 100% de las muestras compuestas contaminadas con 10 y 1 mg (correspondiente a un inóculo de 10^6 y 10^5 log UFC *Bacteroidales* spp., Fig. 9B).

Para los lavados de fresas se recuperaron 6 logaritmos de UFC de Bacteroidales en aquellas contaminadas con 10 mg, siendo aún cuantificable hasta las contaminadas con 0.1 mg (3 log UFC *Bacteroidales* spp., Tabla 6). De los indicadores tradicionales de contaminación fecal, *E. coli* y *Enterococcus* spp., se recuperaron aun en las muestras contaminadas con 1 mg, y los coliformes totales hasta las contaminadas con 0.01 mg de heces (Tabla 6). El marcador genético BoBac para la identificación de la fuente de contaminación bovina en los lavados de tomate, se logró detectar en el 100% de las muestras compuestas contaminadas con 10 mg, y en un 33% en las contaminadas con 1 mg, siendo que en estas últimas muestras de lavado se cuantificó un promedio de 10^4 log UFC *Bacteroidales* spp. (Fig. 10B).

CONTAMINACIÓN CON HECES HUMANAS

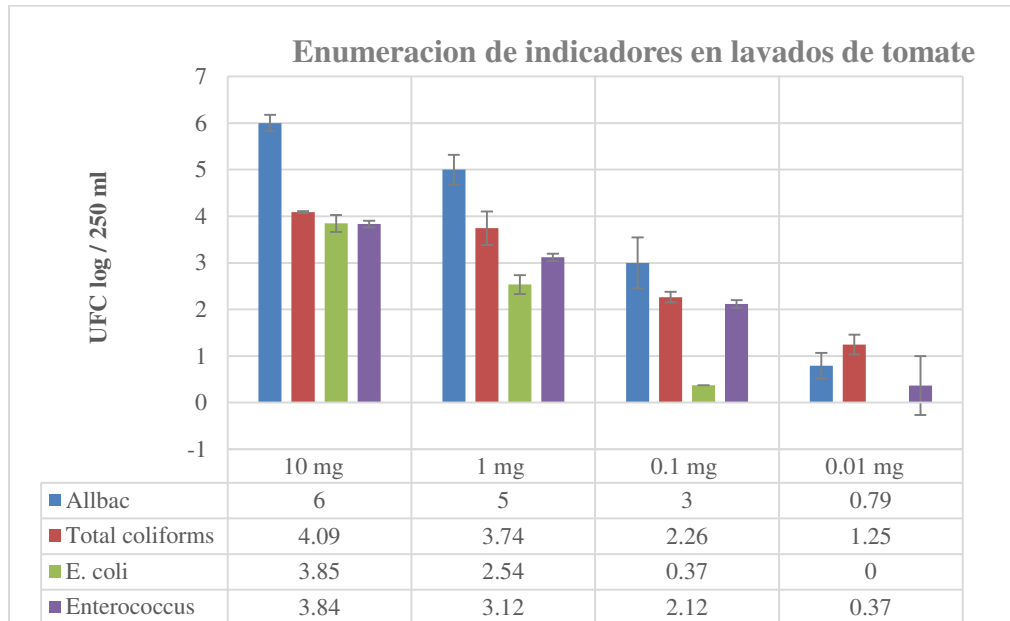


Figura 5 (A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de tomate contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

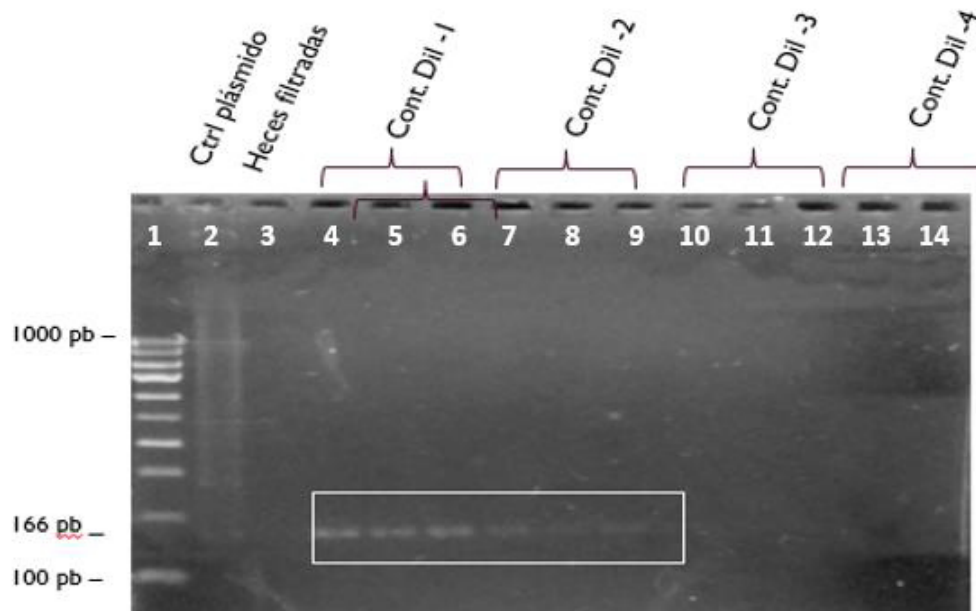


Figura 5 (B). Mercador genético Bvulg (166 pb) detectado por PCR de punto final en lavados de tomate correspondiente a los carriles 4 al 9.

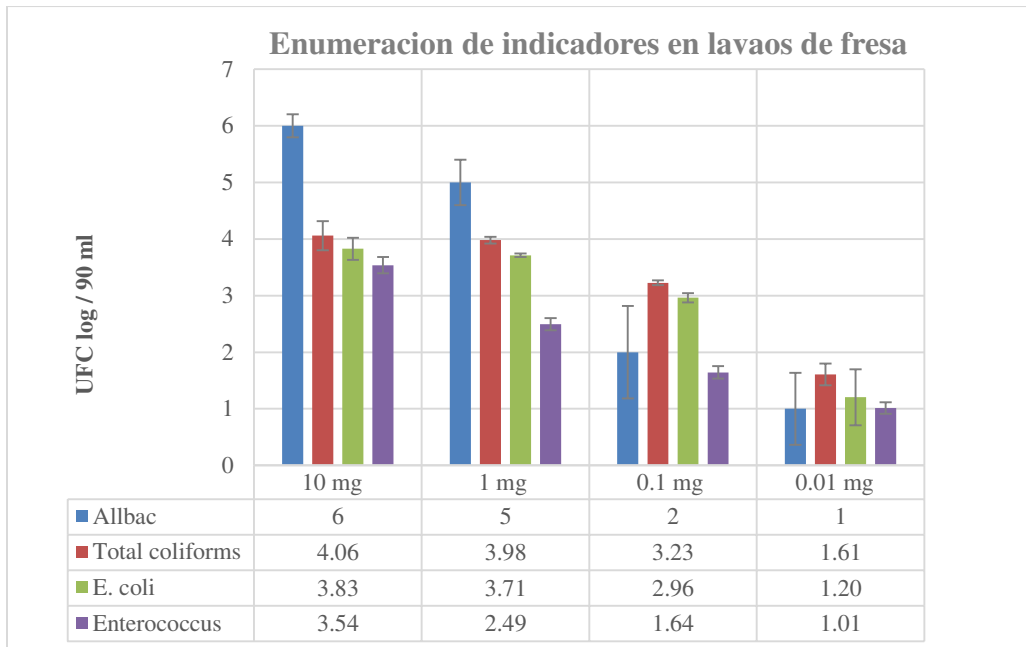


Figura 6 (A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de fresa contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

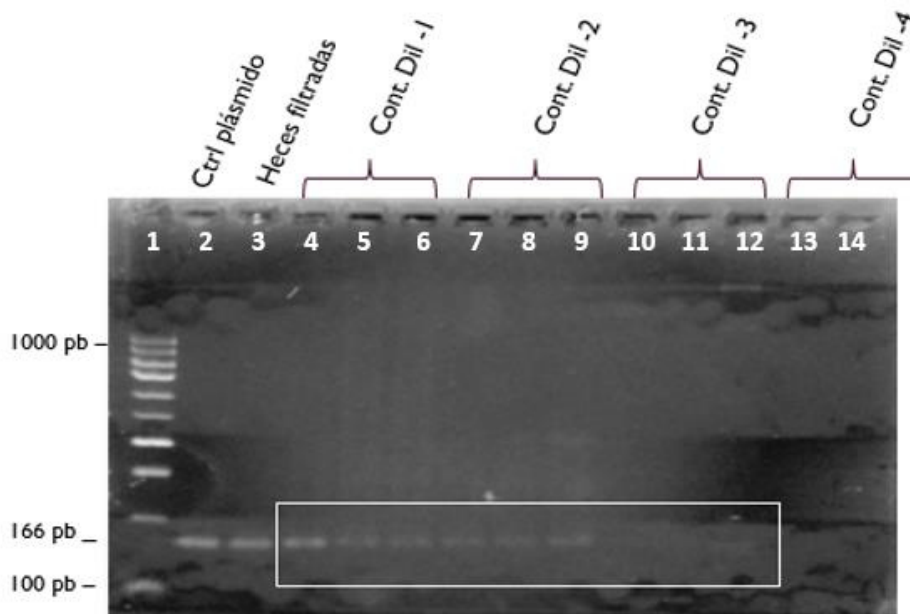


Figura 6 (B). Marcador genético Bvulg (166 pb) detectado por PCR punto final en los lavados de fresas contaminados correspondiente a los carriles del 4 al 12.

CONTAMINACIÓN CON HECES DE PERRO

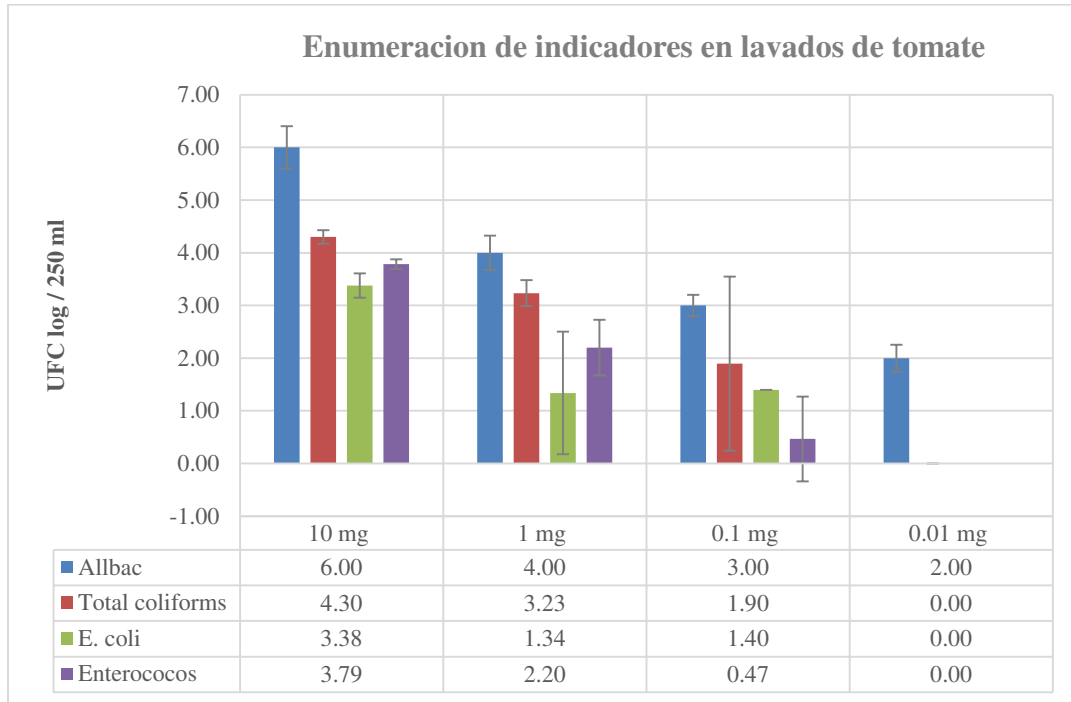


Figura 7(A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de tomate contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

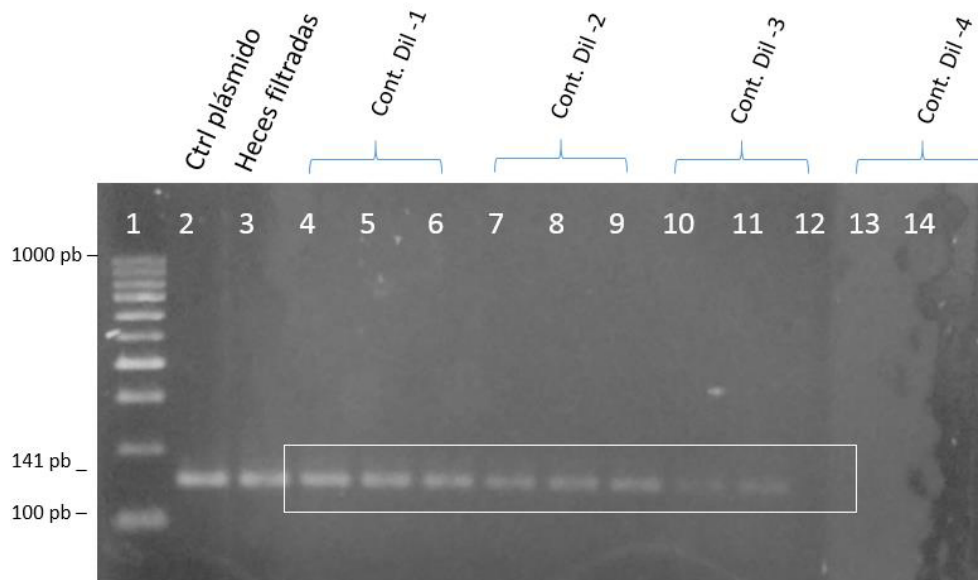


Figura 7(B). Marcador genético BacCan (141 pb) detectado por PCR punto final en los lavados de tomates contaminados correspondiente a los carriles 4 al 12.

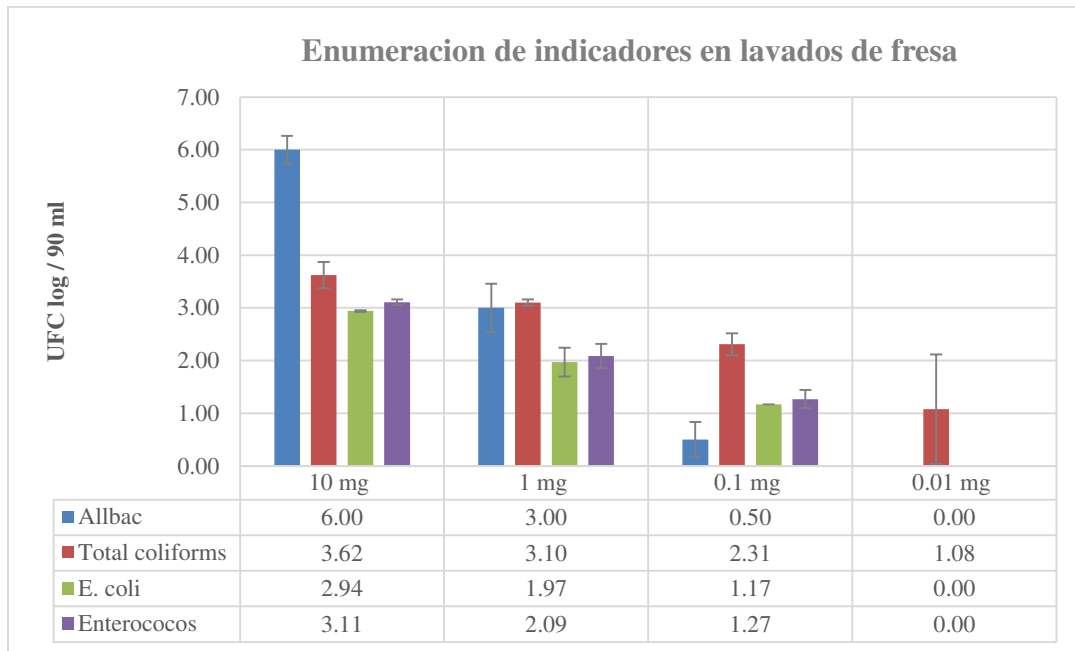


Figura 8(A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de fresa contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

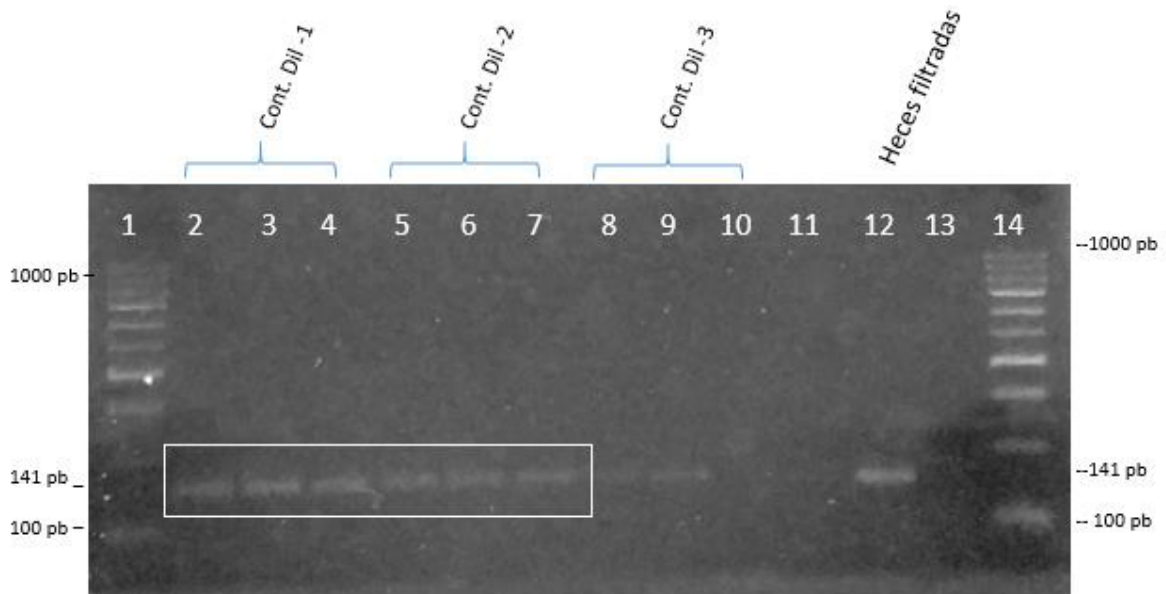


Figura 8(B). Marcador genético BacCan (141 pb) detectado por PCR punto final en los lavados de fresas contaminados correspondiente a los carriles del 2 al 7.

CONTAMINACIÓN CON HECES DE VACA

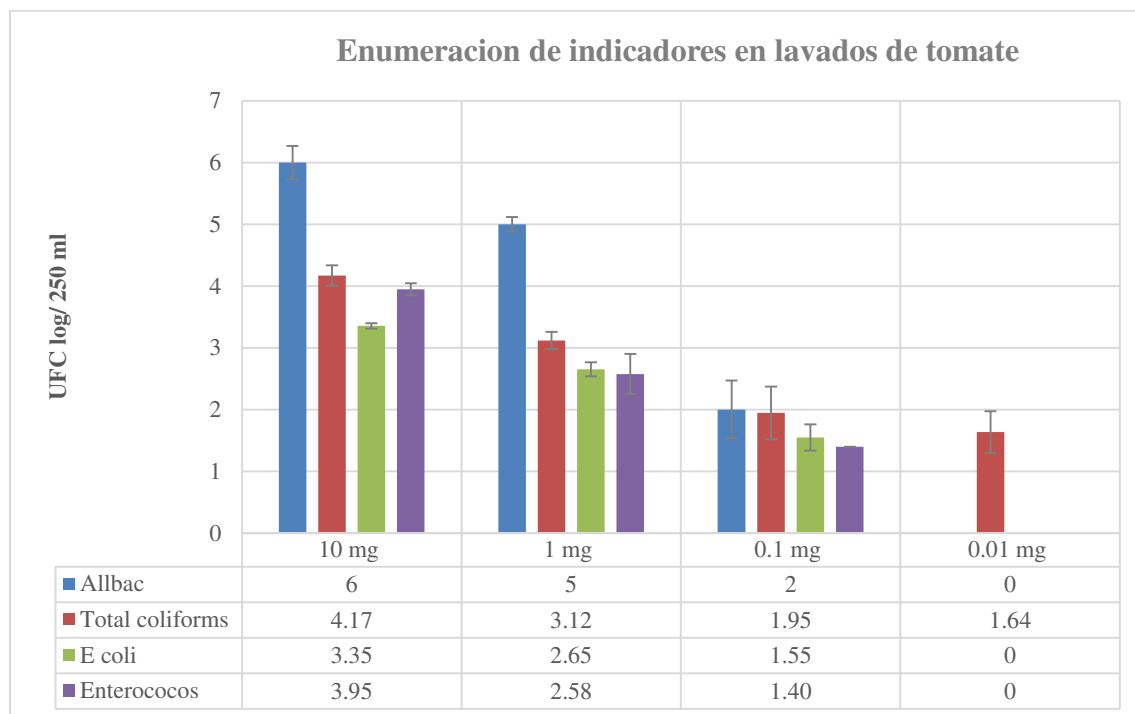


Figura 9(A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de tomate contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

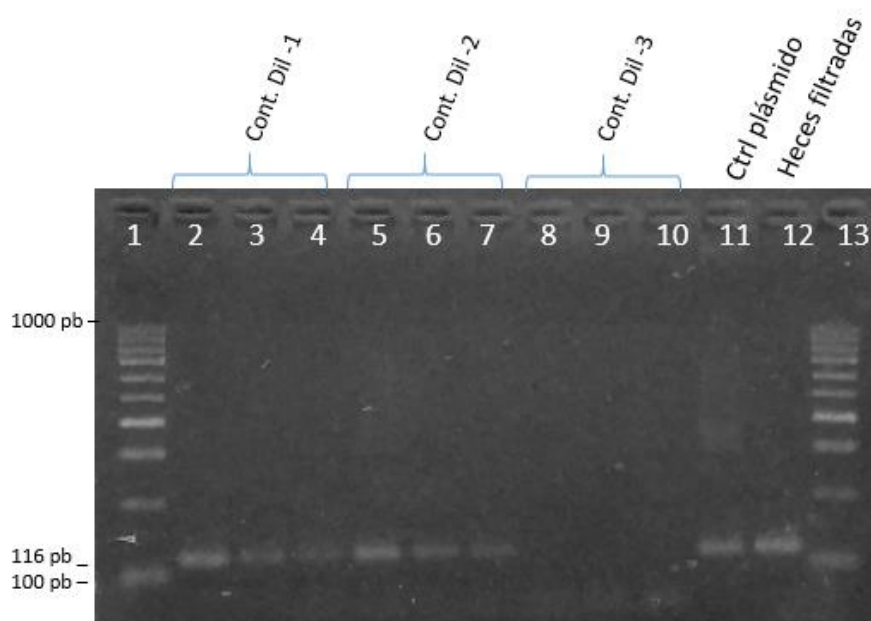


Figura 9(B). Marcador BoBac (116 pb) detectado por PCR punto final en los lavados de tomates contaminados correspondiente a los carriles 2 al 7.

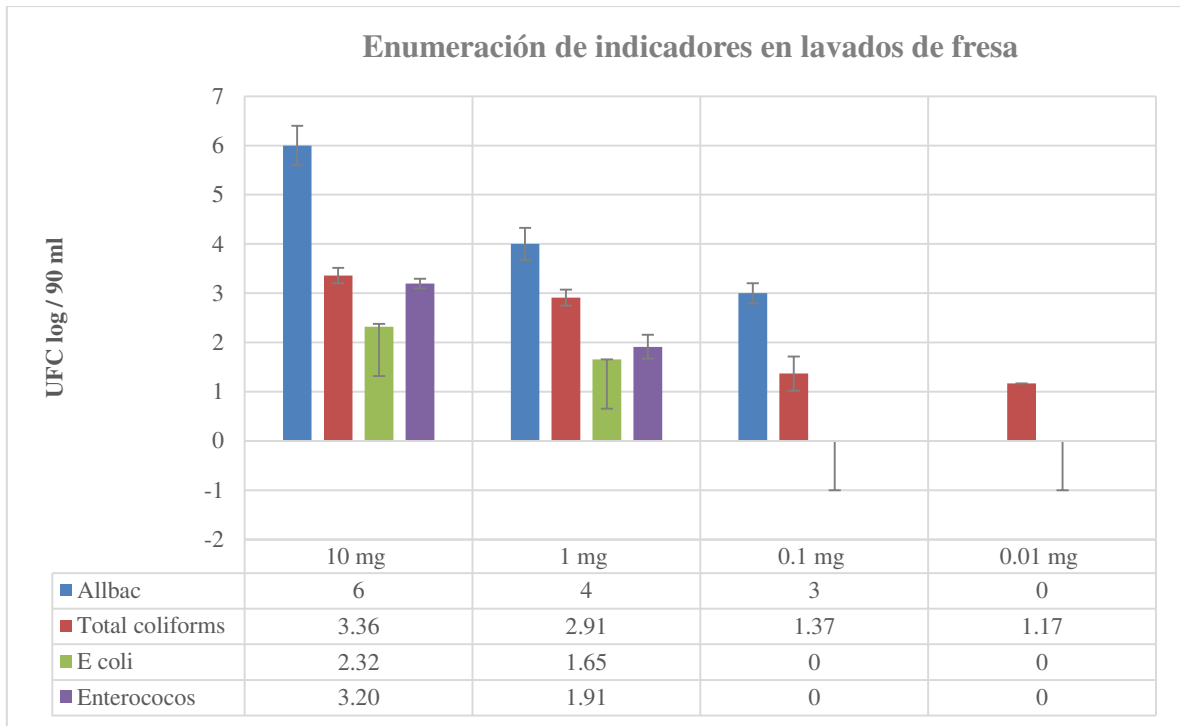


Figura 10(A). Representación gráfica del promedio de UFC log de indicadores fecales en los lavados de fresa contaminados con heces desde una concentración de 10 hasta 0.1 mg.

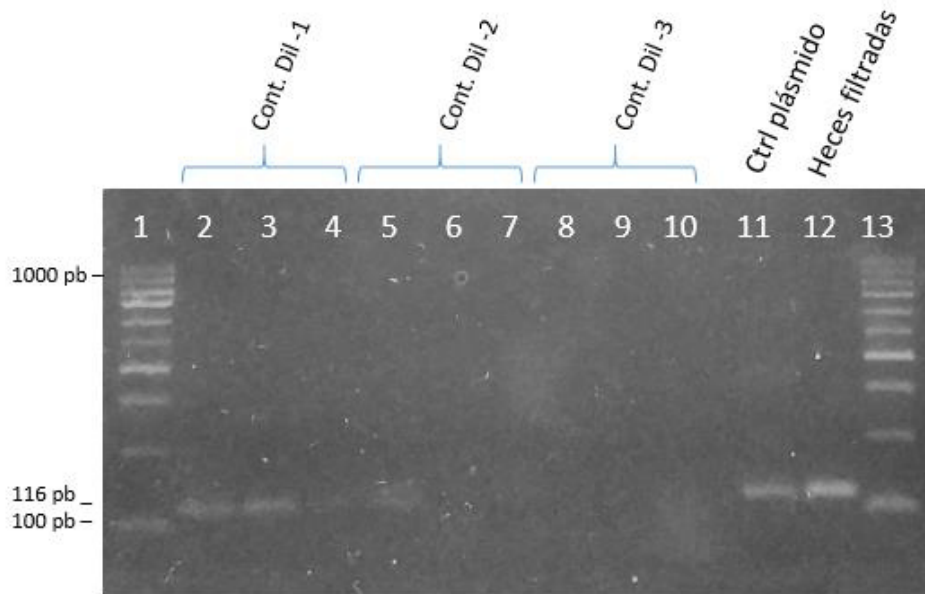


Figura 10(B). Marcador genético BoBac (116 pb) detectado en los lavados de fresas contaminados correspondientes a los carriles 2 al 5.

Tabla 4. Inóculo inicial de indicadores fecales en log UFC/100 µl de las diluciones contaminantes de heces para tomate y fresa.

Heces de huésped	Humano				Perro				Vaca			
	EC	CT	EN	BC	EC	CT	EN	BC	EC	CT	EN	BC
Concentración de heces agragadas por fruto (mg)												
10	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁷	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶
1	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁵
0.1	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁵	10	10 ²	10 ²	10 ⁴
0.01	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁴	0	10	10	10 ³

Indicadores de contaminación fecal; *E. coli* (EC), coliformes totales (CT), *Enterococcus* spp. (EN) y *Bacteroidales* spp. (BC).

Tabla 5. Enumeración promedio de indicadores fecales en 250 ml de lavado de tomates contaminados.

Concentración contaminante (mg)/indicador por huésped	<i>E. coli</i>			Coliformes totales			<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Bacteroidales</i> spp.		
	H	P	V	H	P	V	H	P	V	H	P	V
10	3.85 (0.18)	3.38 (0.23)	3.35 (0.05)	4.09 (0.02)	4.30 (0.13)	4.17 (0.17)	3.84 (0.07)	3.79 (0.1)	3.95 (0.10)	6 (0.17)	6.00 (0.4)	6 (0.27)
1	2.54 (0.20)	1.34 (1.16)	2.65 (0.11)	3.74 (0.36)	3.23 (0.24)	3.12 (0.14)	3.12 (0.08)	2.20 (0.53)	2.58 (0.33)	5 (0.32)	4.00 (0.33)	5 (0.11)
0.1	0.37 (0.63)	0.93 (0.8)	1.03 (0.91)	2.26 (0.11)	1.90 (1.65)	1.95 (0.43)	2.12 (0.08)	0.47 (0.8)	0.93 (0.81)	3 (0.54)	3.00 (0.2)	2 (0.47)
0.01	0.00	0.00	0.00	1.25 (0.21)	0.85 (1.2)	1.09 (0.97)	1.10 (0.63)	0.00	0.00	0.79 (0.27)	2.00 (0.26)	0.00

Fuentes de contaminación; humano (H), perro (P) y vaca (V). (±) Desviación estándar.

Tabla 6. Enumeración promedio de indicadores fecales en 90 ml de lavado de fresas contaminadas.

Concentración contaminante (mg)/indicador por huésped	<i>E. coli</i>			Coliformes totales			<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Bacteroidales</i> spp.		
	H	P	V	H	P	V	H	P	V	H	P	V
10	3.83 (0.2)	2.94 (0.01)	2.32 (0.6)	4.06 (0.26)	3.62 (0.24)	3.36 (0.15)	3.54 (0.14)	3.11 (0.06)	3.20 (0.10)	6 (0.2)	6.00 (0.26)	6 (0.40)
1	3.71 (0.03)	1.97 (0.28)	1.10 (0.95)	3.98 (0.06)	3.10 (0.06)	2.91 (0.16)	2.49 (0.1)	2.09 (0.23)	1.91 (0.24)	5 (0.4)	3.00 (0.46)	4 (0.33)
0.1	2.96 (0.08)	0.39 (0.67)	0	3.23 (0.04)	2.31 (0.2)	1.37 (0.35)	1.64 (0.11)	1.27 (0.17)	0	2 (0.8)	0.50 (0.34)	3 (0.20)
0.01	1.2 (0.5)	0	0	1.61 (0.2)	1.08 (1.03)	0.39 (0.67)	0.81 (0.28)	0	0	1 (0.6)	0	0

Fuentes de contaminación; humano (H), perro (P) y vaca (V). (±) Desviación estándar.

8.4 Correlación de Bacteroidales e indicadores tradicionales en lavados de tomate y fresa

Se realizó una correlación tipo Pearson mediante el paquete estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 20) de los logaritmos de UFC de los indicadores tradicionales y Bacteroidales totales para tomate y fresa con los datos de la contaminación utilizando la primera dilución de las heces correspondiente a una cantidad de 10 mg, ya que era donde la mayoría de las muestras se podían detectar por PCR y método de cultivo en placa.

a) Tomate y fresa contaminados con muestras humanas

La correlación encontrada en las muestras de lavados de tomate entre Bacteroidales y *E. coli*, Coliformes totales y *Enterococcus*, mostraron una $r^2 = -1.000$, $-.982$ y -1.000 , respectivamente (Tabla 8), lo que indicó que no hay correlación entre los microorganismos probados. En el caso de la fresa, la correlación fue de $r^2 = .400$, $.650$ y $.998$ respectivamente, lo que indicó baja correlación entre los Bacteroidales con *E. coli* y moderada con coliformes totales, sin embargo, mostró correlación alta con *Enterococcus* (Tabla 8).

b) Tomate y fresa contaminados con muestras caninas

La correlación entre Bacteroidales y *E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus*, en los lavados de tomate mostró una $r^2 = .500$, $.945$ y $-.23$, respectivamente (Tabla 8). Esto indicó de moderada a baja o inexistente correlación entre Bacteroidales con *E. coli* y *Enterococcus*, sin embargo, mostró alta correlación con coliformes totales. En el caso de la fresa, la correlación fue de $r^2 = 1.000$, $.84$ y $.99$ respectivamente, lo que indicó alta correlación entre Bacteroidales y los tres indicadores tradicionales (Tabla 8).

c) Tomate y fresa contaminados con heces de vaca

La correlación entre Bacteroidales y *E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus*, en los lavados de tomate no pudo ser obtenida debido a que las cuentas (6 log UFC), de los Bacteroidales siempre fueron constantes (Tabla 8). En el caso de la fresa, la correlación fue de $r^2 = -.500$, $-.99$ y 1.000 respectivamente, lo que indicó que no hubo correlación entre Bacteroidales con *E. coli* y coliformes totales, sin embargo, si se encontró una alta correlación con *Enterococcus* (Tabla 8).

Tabla 7. Datos estadísticos para la correlación entre indicadores tradicionales y Bacteroidales en los lavados de tomate y fresa.

			log de UFC															
Contaminacion de heces			0.01 g				0.001 g				0.0001 g				0.00001 g			
		muestras	BC	EC	CT	ENT	BC	EC	CT	ENT	BC	EC	CT	ENT	BC	EC	CT	ENT
tomate	humano	tomate 1	7	0.85	4.06	3.75	5	0.7	4.07	3.07	2	0.3	2.35	2.21	0.99	0	1.4	1.1
		tomate 2	6	0.78	4.09	3.88	5	0.7	3.8	3.21	3	0	2.14	2.1	0.6	0	1.1	0
		tomate 3	6	0.78	4.1	3.88	5	0.7	3.36	3.08	0	0	2.3	2.05	0.6	0	0	0
	perro	tomate 1	6	3.24	4.41	3.86	4	2.1	2.96	1.62	3	1.4	3.01	0	2	0	0	0
		tomate 2	5	3.24	4.17	3.82	4	0	3.29	2.32	3	1.4	2.68	0	2	0	1.7	0
		tomate 3	6	3.65	4.33	3.68	4	1.92	3.45	2.66	3	0	0	1.4	0	0	0	0
	vaca	tomate 1	6	3.41	4.32	3.98	5	2.73	3.27	2.94	2	1.7	2.44	1.4	0	0	1.88	0
		tomate 2	6	3.34	4.2	4.02	5	2.52	3	2.32	2	0	1.7	0	0	0	1.4	0
		tomate 3	6	3.32	3.99	3.83	5	2.7	3.08	2.46	0	1.4	1.7	1.4	0	0	0	0
fresa	humano	fresa 1	6	3.6	3.76	3.46	5	3.74	4.02	2.56	2	3.02	3.22	1.56	1	1.61	1.83	1.13
		fresa 2	7	3.92	4.24	3.7	5	3.72	4.01	2.37	2	2.99	3.27	1.77	0	1.35	1.5	0.65
		fresa 3	6	3.96	4.18	3.45	5	3.68	3.91	2.56	1	2.87	3.18	1.61	0	0.65	1.5	0.65
	perro	fresa 1	6	2.93	3.68	3.08	3	2.13	3.03	1.95	0.5	1.17	2.55	1.47	0	0	1.17	0
		fresa 2	7	2.95	3.84	3.17	3	1.65	3.14	2.35	0	0	2.17	1.17	0	0	2.07	0
		fresa 3	6	2.93	3.35	3.07	2	2.13	3.13	1.95	0	0	2.21	1.17	0	0	0	0
	vaca	fresa 1	6	2.26	3.3	3.26	4	0	3.08	2.13	3	0	1.77	0	0	0	1.17	0
		fresa 2	5	2.35	3.53	3.08	4	1.65	2.77	1.65	3	0	1.17	0	0	0	0	0
		fresa 3	6	2.35	3.24	3.26	4	1.65	2.88	1.95	0	0	1.17	0	0	0	0	0

Indicadores de contaminación fecal; *E. coli* (EC), coliformes totales (CT), *Enterococcus* spp. (EN) y *Bacteroidales* spp. (BC).

Tabla 8. Tabla de correlación tipo Pearson entre indicadores tradicionales y Bacteroidales específicos de huésped.

Fuente fecal	Determinación	Correlación tipo Pearson (P > 0,05)	
		Tomates	Fresas
Humana	<i>E. coli</i>	- 1.00 (NC)	0.40 (NC)
	Coliformes totales	-0.98 (NC)	0.65 (AC)
	<i>Enterococcus</i>	- 1.00 (NC)	0.99 (AC)
Canina (perro)	<i>E. coli</i>	0.50 (MC)	1.00 (AC)
	Coliformes totales	0.945 (AC)	0.84 (AC)
	<i>Enterococcus</i>	-0.23 (NC)	0.99 (AC)
Bovina (vaca)	<i>E. coli</i>	ND	-0.50 (NC)
	Coliformes totales	ND	-0.99 (NC)
	<i>Enterococcus</i>	ND	1.00 (AC)

NC: No correlación

AC: Alta correlación

MC: Moderada correlación

Valores por arriba de 0.6 indican correlación

Valores por debajo de 0.4 indican no correlación

Valores entre 0.4 y 0.6 indican MC

ND: No determinado, debido a que al menos una de las variables es constante.

(Daniel W. Wayne, 2005)

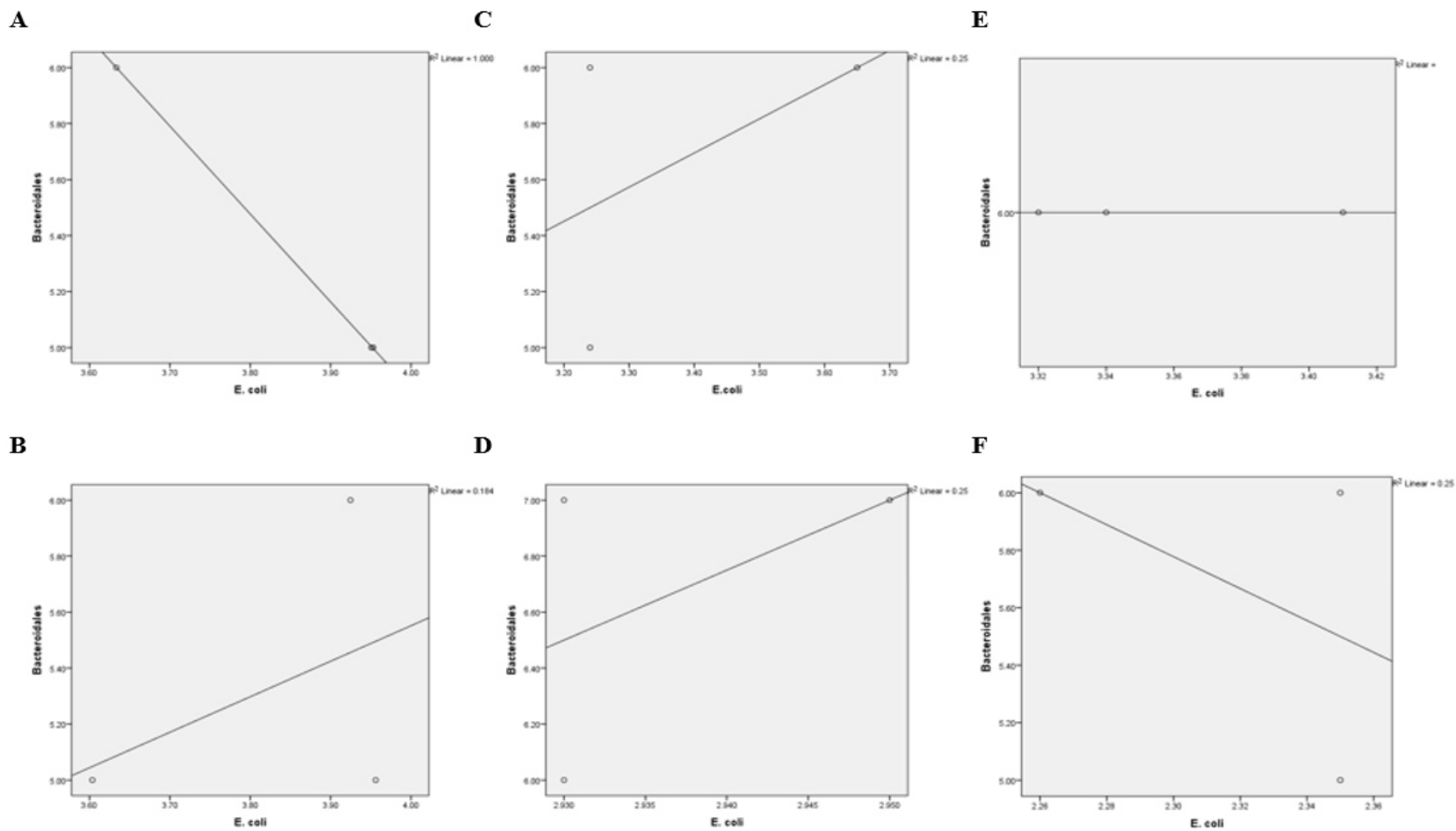


Figura 11. Graficas de correlación entre los indicadores tradicionales y Bacteroidales en los lavados de tomate contaminados con heces de humano (A), perro (C) y vaca (E), y en lavados de fresa contaminados con heces de humano (B), perro (D) y vaca (F).

9. DISCUSION

Para este estudio, se validaron marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de humano, bovino, y canino. La validación de estos marcadores mediante PCR punto final se realizó tomando en cuenta las posibles fuentes u orígenes de contaminación con que los vegetales como tomate y fresa pudieran contaminarse durante su producción, que pudiera deberse al mal uso de la composta animal, la fuente de agua utilizada para la irrigación y la invasión de animales salvajes que con sus excretas contaminan el área de siembra (Ravaliya et al, 2014).

Una de las vías principales por las que el agua de riego utilizada para la producción de vegetales se contamina con excretas animales es por el uso de agua sin tratar de ríos o lagos aledaños a las granjas en donde animales como vacas y cerdos defecan al momento de beber agua (Simpson et al, 2002). Otra vía importante de contaminación animal en los cultivos de vegetales está dado por las heces de las aves transitorias que contaminan directamente el cultivo y de las aves que normalmente habitan cerca como las gallinas, sin embargo, los marcadores más utilizados para la identificación de esta fuente además de los Bacteroidales, son miembros de la familia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Cisar et al 2010, Phong et al, 2010, Lu et al, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio fue difícil estandarizar una PCR para el marcador Bacteroidales y/o *Lactobacillus* de aves debido a que las muestras de heces de diferentes especies, entre ellas, gallina, codorniz y pato, mostraron consistencias menos sólidas y más dispersas, por lo que al momento de obtenerla duraban fresca muy poco tiempo.

Se escogieron los marcadores específicos Bvulg para humano, BoBac para bovino y BacCan para canino para la identificación de la fuente, y el marcador universal Allbac para la enumeración total de Bacteroidales en los lavados de tomate y fresa, ya que estos están entre los más reportados para la detección de la fuente de contaminación fecal en aguas de uso de riego para cultivos y agua tratada para consumo humano (Ravaliya et al, 2014; Silkie et al, 2009; Lee et al, 2010; Kobayashi et al, 2012).

Dentro de nuestro rango dinámico de cuantificación de copias génicas logarítmicas del marcador Allbac para la enumeración de Bacteroidales totales, fue posible detectar de 1.35 a 10.35 log de copias de genes, correspondiente a un límite de cuantificación de hasta 2 células, siendo incluso más sensible que lo reportado previamente de 6.5 a 10 copias del gen ARNr 16S para 1 célula de *Bacteroidales* spp. (Lee et al, 2010)

En nuestro estudio, detectamos los marcadores específicos en el 100% (3/3) de los lavados de tomate y fresa contaminados de heces de las tres fuentes a una concentración de 0.1 mg de heces, con 1g de heces en 1L de agua, y el 33% (1/3) de los enjuagues de tomate contaminados con heces caninas. Previos estudios en lavados de melón, tomate y chile, agua de riego y lavados de mano de trabajadores, en la región del noreste de México, mostraron una prevalencia del marcador Allbac en un 37% del total de las muestras, en donde reportaron una media de concentración de este marcador de 2.1 log₁₀ CEG/100ml de los tres tipos de lavado. En nuestro estudio, el marcador se identificó en el 100% de los lavados de vegetales contaminados con 0.01 mg de heces, donde la media de concentración del marcador fue de 3.8 CEG log₁₀ /250 ml en el caso del tomate, y de 2.12 CEG log₁₀ /90 ml en el caso de la fresa. En el mismo reporte, el marcador específico de humano Bvulg y otros marcadores específicos, se detectaron hasta en un 46% de las muestras, de las cuales el 58% eran de melón y 19% de tomate. Sin embargo, el mismo marcador se ha detectado en agua de riego y en lavados de manos de los trabajadores del campo en México en baja cantidad, por lo que esto también abre otra área para la identificación de la contaminación fecal en la producción de vegetales (Ravaliya et al, 2014).

El marcador específico BacCan fue el marcador que se detectó a mayor concentración de heces aplicado (10 mg), tanto para fresa como tomate, sin embargo, aunque no se ha reportado la presencia de este marcador en lavados de vegetales, en muestras de 100ml de aguas negras se ha encontrado en un 83% (Slikie et al, 2009).

Se ha encontrado baja prevalencia del marcador BoBac (específico para bovino) en muestras tomadas en campo de tomate y melón, sin embargo en este trabajo tanto en tomate y fresa contaminados con 10 mg de heces, se detectó a este marcador en el 100% de los

lavados y en donde el marcador Allbac pudo ser cuantificado en una contaminación de 0.1 mg de heces, en donde el promedio fue de 2.88 CEG $\log_{10}/250$ ml en tomate y de 4.01 CEG $\log_{10}/90$ ml en fresa (Ravaliya et al, 2014).

En cuanto a la correlación de los indicadores tradicionales de contaminación fecal humana y los Bacteroidales totales, en el caso del tomate, encontramos que la enumeración de *Bacteroidales* tiene poca o ninguna correlación con recuentos de *E. coli* y *Enterococcus* spp., ya que la prueba Pearson dio una r^2 menor de 0.5; encontrando a los *Bacteroidales* con cuentas elevadas (hasta 2 log de UFC) cuando se compararon con los recuentos de los indicadores tradicionales en la mayoría de las muestras bovinas, sin embargo para las heces caninas agregadas a tomate y fresa encontramos que si existió correlación ($r^2 = .945$) entre *Bacteroidales* y coliformes totales.

Para la fresa, obtuvimos correlación alta (r^2 entre .650 y 1.000) entre Bacteroidales con coliformes totales y *Enterococcus* spp., lo que indica una posible asociación entre ambos indicadores en las contaminaciones provenientes de las 3 fuentes, sin embargo hacen falta más estudios para confirmarlo. También encontramos que no había correlación entre Bacteroidales y *E. coli* en las muestras contaminadas con heces humanas y bovinas, así como no la había entre Bacteroidales y coliformes totales en fresas contaminadas con heces bovinas. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Lee y colaboradores (2010), en donde han reportado una baja correlación de Bacteroidales con *E. coli* ($r^2 = 0.22$) y *Enterococcus* ($r^2 = 0.40$), en agua de lagos aledaños a ranchos ganaderos. Por otra parte, se ha reportado baja correlación entre *Bacteroidales* y *Enterococcus* ($r^2 = 0.417$) en muestras fecales de animales domésticos. Adicionalmente hay reportes en donde no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre *E. coli* y el marcador para Bacteroidales Allbac utilizando la prueba de Pearson y Spearman ($P > 0,05$) en lavados tomate, melón y chile (Converse et al, 2009). Por lo que podemos decir que la cantidad de indicadores tradicionales no está relacionada con la cantidad de Bacteroidales.

Los resultados encontrados en este estudio dejaron ver al uso de marcadores Bacteroidales como una herramienta valiosa para no solo determinar que existe una contaminación de origen fecal, sino que además permite identificar de donde proviene esta contaminación en productos frescos.

10. CONCLUSIONES

1. El marcador genético universal Allbac (Bacteroidales totales) en lavados de tomates y fresas contaminados, se cuantificó en el 100% de los casos cuando se agregaron 10, 1.0 y 0.1 mg de heces sobre la fruta.
2. En el caso de tomate contaminado con 0.01 mg de heces de perro, el marcador específico BacCan se detectó en el 100% (3/3) de las muestras, y fue el marcador con mayor prevalencia en los lavados.
3. No se encontró asociación entre el número de UFC de Bacteroidales y el de indicadores tradicionales *E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus* spp., en la mayoría de los lavados de tomates contaminados con las tres fuentes fecales, excepto entre Bacteroidales y coliformes totales en las muestras contaminadas con heces caninas.
4. Se encontró una alta correlación entre Bacteroidales y *Enterococcus* spp. en las fresas contaminadas con las tres fuentes fecales, sin embargo no se halló correlación entre Bacteroidales y *E. coli* en fresas contaminadas con heces humanas y bovinas, así también entre Bacteroidales y coliformes totales en las contaminadas con heces bovinas.
5. Fue posible dectar la fuente de contaminación fecal en el 77% (20/26) y 70% (18/26) de los lavados de tomate y fresa respectivamente mediante el uso de los marcadores Bacteroidales específicos de huésped humano, canino y bovino.
6. El uso de los marcadores genéticos de Bacteroidales específicos de huésped humano, canino y bovino, permitieron la identificación de la fuente de contaminación fecal además de la enumeración de Bacteroidales totales, siendo mas sensible que los indicadores tradicionales *E. coli*, coliformes totales y *Enterococcus* spp.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1) AMSDA (Asociación Mexicana de Secretarios de Desarrollo Agropecuario A.C.). Sin fechas. Nuevo León. Chile. Plan rector del sistema producto chile. <http://www.amsda.com.mx/PREstatales/Estatales/NUEVOLEON/PREchile.pdf>
- 2) Ashbolt NJ, Grabow WOK and Snozzi M. 2001. World Health Organization. Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Indicators of microbial quality water. Chapter 13. IW Publishing, London, United Kingdom.
- 3) Bhunia Arun K. Forthcoming new technologies for microbial detection. Contemporary detection approaches. Guide to Foodborne Pathogens. Ronald G. Labbé and Santos Garcia. Second edition. 2013. Wiley Blackwell.
- 4) BioRad. 2007. RAPID' *E. coli* 2 Agar. Tech Sheet.
- 5) Champe Pamela C. Richard A. Harvey and Denise R. Ferrier. 2006. Biotecnología y enfermedad humana. Capítulo 32. Bioquímica. Tercera edición. Mc Graw Hill. New Jersey.
- 6) Chakravorty S, Helb D, Burday M, Conell N and Alland D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments of the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 69(2):330-339.
- 7) CDC (Centers for Diseases Control). 2011. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States. CDC 2011 Estimates: Findings. <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html> Accessed August 2013. United States.
- 8) CDC (Centers for Diseases Control). 2014. Food Safety. Findings <http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html> Accessed April 2014. United States.
- 9) Dale JW and Park SF. 2010. Molecular genetics of bacteria. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- 10) DGE (Dirección General de Epidemiología). 2013. Secretaria de Salud. Anuarios de Morbilidad. Casos nuevos de Intoxicación alimentaria bacteriana (A05) por fuente de notificación de los Estados Unidos Mexicanos 2013. Población General. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

- 11) DGE (Dirección General de Epidemiología). 2014. Enfermedades Diarreicas Agudas. Secretaria de Salud. Informe Semanal de Vigilancia epidemiológica. Semana 34-2014.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2014/eda/eda14_34.html
- 12) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Producción alimentaria agrícola 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- 13) FDA (Food and Drug Administration). 2014. Foodborne Illnesses: What You Need to Know. Updated May 2014.
<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/FoodborneIllnessesNeedToKnow/default.htm>
- 14) Global Foodborne Infections Network. Strategic Plan 2011-2015. WHO (World Health Organization).
- 15) Green, Michael R y Joseph Sambrook. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. Protocolo No. 1. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Minipreparation. Chapter 1. Plasmid and their usefulness in molecular cloning.
http://www.who.int/gfn/publications/gfn_strategic_plan_2011-2015.pdf?ua=1
- 16) Herráez Ángel, José Luke. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Estructura y función de los RNA. 2da Edición. 2012. Elsevier.
- 17) Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola MG y Castro-Escarpuli G. 2011. Situación de enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol.* 31(4): 137-151.
- 18) Kobayashi Ayuno, Daisuke Sano, Jun Hatori, Satoshi Ishii and Satoshi Okabe. Chicken and duck-associated Bacteroides-Prevotella genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. 2012. *Journal Environmental Biotechnology.*
- 19) Layton Alice, Larry McKey, Dan Williams, Victoria Garrett, Randall Gentry and Gary Sayler. 2006. Development of Bacteroides 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. *Journal Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 72. No. 6. p. 4214-4224.

- 20) Lee DY, Weir SC, Lee H, Trevors JT. 2010. Quantitative identification of fecal water pollution sources by TaqMan real-time PCR assays using *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88: 1373-1383.
- 21) Lee ZM-P, Bussema C III and Schmidt TM. 2009. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucl Acids Res.* 37:D489-D493.
- 22) Lefcourt AM, Kim MS, Chen YR. 2005. A transportable fluorescence imaging system for detecting fecal contaminants. *Computers and Electronics in Agriculture* 48, 63–74.
- 23) León Juan S, Lee-Ann Jaykus, and Christine I. Moe. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. *Microbiologically safe foods.* Heredia N, Wesley I and García S (eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States
- 24) Mieszkin Sophie, Furet Jean-Pierre, Corthie Gérard, Pommepuy Monique, Le Saux Jean Claude, Bougeard Morgane, Hervio-Heath Dominique and Gourmelon Michele. Discrimination between human, pig and ruminant faecal contaminations in a river catchment by real-time PCR using host-specific markers. 2009.
- 25)
- 26) NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud. México.
- 27) Nsoesie Elaine O, Sheryl A. Kluberg, John S. Brownstein. Online reports of foodborne illness capture foods implicated in official foodborne outbreak reports. *Jurnal Elsevier* 67 (2014) 264–269.
- 28) Ravaliya Kutri, Jennifer Gentry-Shields, Santos Garcia, Norma Heredia, Anna Fabiszewski de Aceituno, Faith E. Bartz, Juan S. Leon, Lee-Ann Jaykusa. 2013. Use of *Bacteroidales* Microbial Source Tracking To Monitor Fecal Contamination in Fresh Produce Production. *Jurnal Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 80, number 2. P. 612–617.
- 29) Reagan R. Converse, A. Denene Blackwood, Marek Kirsb, John F. Griffith, Rachel T. Noble. 2009. Rapid QPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp. as a tool

- for assessing fecal contamination in recreational waters. Journal Elsevier. 43 (2009) 4828 – 4837.
- 30) Rodicio MR y Mendoza MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 22, No. 4.
- 31) SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación – México). 2013. Chile Mexicano <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/ChileMexicano.aspx> Consultado Septiembre 2013.
- 32) SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación – México). 2013. Tomate. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/Tomate.aspx> Consultado Septiembre 2013.
- 33) SAGARPA-SIAP 2014. <http://www.siap.gob.mx/tomate-rojo-jitomate/>
<http://www.siap.gob.mx/fresa/>
- 34) Sarah S. Silkie, Kara L. Nelson. 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. Journal Elsevier. 43 (2009) 4860 – 4871.
- 35) Savichtcheva Olga, Noriko Okayama, Satoshi Okabe. 2007. Relationships between Bacteroides 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. Journal Elsevier. 41 (2007) 3615 – 3628.
- 36) Schriewer A, Miller WA, Byrne BA, Miller MA, Oates S, Conrad PA, Hardin D, Yang HH, Chouicha N, Melli A, Jessup D, Dominik C and Wuertz S. 2010. Presence of *Bacteroidales* as a Predictor of Pathogens in Surface waters of the Central California Coast. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 76, No. 17, p. 5802-5814.
- 37) Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR and Lukasik J. 2002. Microbial Source Tracking: Current Microbiology and Future Directions. App. Environ. Microbiol. Vol. 68, No. 12, p. 5796-5803.

- 38) Simpson Joyce M. Jorgew. Santo Domingo, and Donald J. Reasoner. 2002. Microbial Source Tracking: State of the Science. *Jurnal Environmental Science and Technology* / vol. 36, No. 24, 2002. Cincinnati, Ohio.
- 39)
- 40) Sokolova Ekaterina, Johan Åström, Thomas J. R. Pettersson, Olof Bergstedt, y Malte Hermansson. Decay of bacteroidales genetic markers in relation to traditional fecal indicators for water quality modeling of drinking water sources. 2012. *Jurnal Enviromental Science and Technology* 46, 892–900.
- 41) Tood, C. D. Ewen. 2013. Globalization and epidemiology of foodborne disease. *Guide to foodborne pathogens*. Edited by Ronald G. Labbé and Santos García. Second edition. Ewen Tood Consulting, Okemos, Michigan, USA.
- 42) URI Genomics & Sequencing Center, The University of Rhode Island, 29 de enero del 2004. <http://web.uri.edu/gsc/real-time-pcr/>
- 43) Van De Werfhost L, Sercu B, Holden PA. 2011. Comparison of the Host Specificities of Two Bacteroidales Quantitative PCR assays using for Tracking Human Fecal Contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 77, No. 17, p. 6258-6260.
- 44) Walters Sarah P. Victoria P. J. Gannon y Katherine G. Field. 2007. Detection of Bacteroidales Fecal Indicators and the Zoonotic Pathogens *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Campylobacter* in River Water. *Journal Envaironmental Science and Technology*. 41, 1856-1862.
- 45) Wesley I. 2009. Microbial Food Hazards. Public Health Impact of Foodborne Illness: Impetus for the International Food Safety Report. In *Microbiologically Safe Foods*. Heredia N, Wesley I and García S (eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States.
- 46) WHO (World Health Organization). Health topics. Foodborne diseases. Updated 2014. http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/
- 47) WHO (World Health Organization). Health topics. Foodborne diseases. Updated 2014. http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/

12. RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Linda Gracia Hernández Rangel

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: “USO DE Bacteroidales COMO RASTREADOR DE FUENTE DE CONTAMINACIÓN FECAL EN FRESA Y TOMATE CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE”

Campo de estudio: Microbiología clínica y de alimentos

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el 25 de abril de 1989, hija de Esteban Hernández Gómez y Rosa Ofelia Rangel Aranda

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Lic. Químico Clínico Biólogo obtenido en Junio del 2011.

Experiencia profesional: Análisis clínicos en laboratorio hospitalario.