

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PERSISTENCIA DE MARCADORES PARA *Bacteroidales* COMO  
MICROORGANISMOS INDICADORES DE TRAZABILIDAD EN TOMATE  
Y MELÓN CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE**

**POR**

**MVZ GILBERTO ORDAZ CERVERA**

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

**AGOSTO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PERSISTENCIA DE MARCADORES PARA *Bacteroidales* COMO  
MICROORGANISMOS INDICADORES DE TRAZABILIDAD EN TOMATE  
Y MELÓN CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE**

**POR**

**MVZ GILBERTO ORDAZ CERVERA**

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

**AGOSTO, 2017**

PERSISTENCIA DE MARCADORES PARA *Bacteroidales* COMO  
MICROORGANISMOS INDICADORES DE TRAZABILIDAD EN  
TOMATE Y MELÓN CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE

Comité de Tesis

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Presidente

---

Dr. José Angel Merino Mascorro  
Secretario

---

Dr. José Santos García Alvarado  
1er. Vocal

---

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

---

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto  
3er. Vocal

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto # 213333) y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL. Se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia, la Coodirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de Dr. José Angel Merino Mascorro, Dra. Luisa Yolanda Solís Soto y el Dr. Jorge Estaben Dávila Aviña.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi completa gratitud al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca con el número 707221/587872, la cual fue indispensable para culminar exitosamente los estudios de la Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología.

De la misma forma agradecer a todo el personal del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la FCB UANL, por recibirme, por su orientación y apoyo; lo cual fue decisivo para concluir mi proceso de formación.

A todo el personal administrativo y manual de la Facultad de Ciencias Biológicas y en general a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## DEDICATORIAS

Mi sincero reconocimiento a la persona que me forjó como el ciudadano que soy y quien me inculcó sus valores, deseos de superación y vocación de servicio; por ser un modelo a seguir y por demostrarme su fortaleza y apoyo incondicional. A mi madre; Sra. María Dolores Cervera Delgado.

A todos y cada uno de los integrantes de ese maravilloso núcleo de respaldo y fortaleza, a mi familia. Leonardo Cervera Pérez(q.e.p.d.), María del Angel Ordaz Cervera, Andrea Margarita Ordaz Cervera, Itzael Rubio Hernández y a la alegría y luz de la familia; Guillermo Rubio Ordaz, por traernos la más grande bendición que pudimos recibir.

A mis compañeros de generación: Mayra, Silvia, Dianelys, Carolina, Alejandra, Jesús Mario, Hugo, Mario, Mario, Eliud; por las experiencias y conocimientos compartidos en los ámbitos académico y personal.

A todos los integrantes del H. Síno de tesis; a todo el personal del LABGEM, a los profesores y personal de apoyo de la maestría. A la M. en C. Linda Gracia Hernández García y la QBP Janeth Pérez Garza, por todos los consejos, orientaciones, sugerencias y apoyo; que fueron indispensables para la realización del trabajo experimental.

A mis amigos y compañeros de trabajo en Yucatán; por la fortaleza y apoyo incondicionales; Gridley, Ariely, Miguel, Israel, Angelo, Andrea, Laura, Marco, Enrique, Anita, Iris, Pilar; porque se que siempre puedo contar con ustedes y saben que el cariño es recíproco. A mi gran inspiración y modelo a seguir, tanto en el entorno académico y personal y a quien le debo el enfocar mis pasos al área de la Microbiología, MCs Rosa Gabriela Ramírez Porras.

Porque en Nuevo León también encontré apoyo de muchas personas; a David Alberto Bárcenas Cerda y su familia por su apoyo y comprensión; por siempre brindarme un consejo, un hombro para recargarme y el respaldo que fueron cruciales cuando las fuerzas o el cansancio parecían abatirme. A los grandes amigos Mario, Miguel, Fernando y Luci, por hacer realmente gratos los momentos compartidos.

A la vida y a Dios por permitirme concluir una meta más.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ABSTRACT</b> .....	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	5
4.1 Impacto de las ETAs a la salud pública.....	5
4.1.1 El agua y los alimentos como vehículos para la transmisión de ETAs.....	6
4.1.2 Los vegetales como vehículos para la transmisión de ETAs.....	7
4.2 Bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB).....	9
4.2.1 Indicadores tradicionales de contaminación fecal y métodos para su enumeración.....	9
4.2.1.1 Problemática de la utilización de los indicadores tradicionales.....	11
4.3 El rastreo de fuentes de contaminación fecal (MST).....	14
4.3.1 Métodos empleados para MST.....	15
4.3.2 Uso de <i>Bacteroidales</i> como herramienta para MST.....	17
4.3.2.1 Persistencia de los marcadores para <i>Bacteroidales</i> .....	20
4.3.2.2 Retos para la utilización de <i>Bacteroidales</i> en MST.....	22
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>VII. OBJETIVOS</b> .....	26
7.1 Objetivo general.....	26
7.2 Objetivos específicos.....	26
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
8.1 Conservación y manejo de cepas.....	27
8.2 Obtención de controles positivos.....	27

8.2.1 Extracción de DNA plasmídico.....	28
8.2.2 PCR punto final.....	29
8.3 Aislamiento de cepas de <i>Bacteroidales</i> .....	30
8.4 Curvas de cuantificación por qPCR.....	31
8.5 Preparación de inóculos de contaminación.....	32
8.6 Persistencia de FIB y marcador AllBac en superficies artificiales.....	32
8.6.1 Obtención de DNA a partir de lavados de unidades contaminadas.....	33
8.7 Persistencia de FIB y mezcla de <i>Bacteroidales</i> de distintos hospederos en superficies artificiales.....	33
8.8 Persistencia de FIB y mezcla de <i>Bacteroidales</i> de distintos hospederos en melones y tomates contamiandos artificialmente.....	34
8.8.1 Protocolo de descontaminación.....	34
8.8.2 Contaminación de vegetales.....	35
8.9 Análisis estadístico.....	36
<b>IX. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
9.1 Obtención de controles positivos.....	37
9.2 Aislamiento de cepas de <i>Bacteroidales</i> .....	38
9.3 Curvas de cuantificación por qPCR.....	40
9.4 Persistencia de FIB y marcador AllBac en superficies artificiales.....	41
9.5 Persistencia de FIB y mezcla de <i>Bacteroidales</i> en superficies artificiales.....	46
9.6 Persistencia de FIB y mezcla de <i>Bacteroidales</i> en melones y tomates contamiandos artificialmente.....	49
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>XIV. RESUMEN BIOGRÁFICO.....</b>	<b>77</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Descripción de los oligonucleótidos empleados en los ensayos del presente trabajo.	29
<b>Tabla 2.</b>	Crecimiento de <i>Bacteroidales</i> aislados de diversos hospederos en cCC y fTG así como su identificación mediante PCR.	38
<b>Tabla 3.</b>	Valores obtenidos de las curvas de calibración de los diferentes marcadores para <i>Bacteroidales</i> especie específicos, mediante qPCR.	40
<b>Tabla 4.</b>	Reducciones de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> en filtros y corchos contaminados con heces de humano o perro y almacenados por 25 días bajo cuatro condiciones controladas.	43
<b>Tabla 5.</b>	Reducciones promedio en logUFC de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> recuperado de lavados de filtros (F) y corchos (C) contaminados con heces de humano (H) y de perro (D) y almacenados bajo dos condiciones controladas.	44
<b>Tabla 6.</b>	Reducciones de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> recuperados de filtros y corchos contaminados con heces de humano y perro, almacenados por 25 días bajo dos condiciones controladas.	44
<b>Tabla 7.</b>	Valores medios estimados de logUFC/ml de <i>B. thetaiotamicron</i> recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con heces de humano y de perro y almacenados bajo dos condiciones controladas.	46
<b>Tabla 8.</b>	Reducciones de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> recuperados de filtros y corchos contaminados con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo, almacenados por 25 días bajo dos condiciones ambientales controladas.	47
<b>Tabla 9.</b>	Recuentos de <i>Bacteroidales</i> (logUFC/ml) universal y especie-específicos, recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con heces, después de su almacenamiento por	48

	25 días bajo dos condiciones ambientales.	
<b>Tabla 10.</b>	Prueba de Tukey para la comparación de valores medios estimados (logCFU/ml) de <i>Bacteroidales</i> recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con un heces, después de su almacenamiento por 25 días bajo dos condiciones ambientales.	49
<b>Tabla 11.</b>	Recuentos de <i>Bacteroidales</i> (logUFC/ml) universal y especie-específicos, recuperados de lavados de tomates y melones contaminados con heces, después de su almacenamiento por 10 y 20 días bajo dos condiciones ambientales.	50
<b>Tabla 12.</b>	Prueba de Tukey para la comparación de valores medios estimados (logCFU/ml) de <i>Bacteroidales</i> recuperados de lavados de tomates y melones contaminados con un heces, después de su almacenamiento por 10 y 20 días bajo dos condiciones ambientales.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Gel de agarosa al 1% con los productos obtenidos de la PCR de controles positivos de DNA extraído de heces de los distintos hospederos y plásmidos obtenidos de cepas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con insertos positivos para <i>Bacteroidales</i> .	37
<b>Figura 2.</b> Amplicones obtenidos para las distintas cepa de <i>Bacteroides</i> obtenidas, con los oligonucleótidos empleados en el presente estudio.	39
<b>Figura 3.</b> Gráficas obtenidas de las curvas estándar para la cuantificación de los marcador universal AB (a), humano VB (b), bovino BB (c) y porcino PB (d).	40
<b>Figura 4.</b> Persistencia de FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días a 25°C y 95% HR (A), 10°C y 65% HR (B), 10°C y 95% HR (C) y 25°C y 65% HR (D).	42
<b>Figura 5.</b> Representación de los logUFC de reducción de las FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días bajo cuatro combinaciones de humedad y temperatura.	43
<b>Figura 6.</b> Persistencia de FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días a 10°C y 95% de humedad relativa (A) y 25°C y 65% de humedad reativa (B).	45
<b>Figura 7.</b> Reducciones de <i>E. coli</i> y <i>E. faecalis</i> recuperados de filtros y corchos contaminados con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo, almacenados por 25 días bajo dos condiciones ambientales controladas.	47

**Figura 8.** Viabilidad de *E. coli*, coliformes totales (TC) y *E. faecalis* 50  
en tomates (T) y melones (M) contaminados artificialmente  
con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo y  
almacenados por 20 días a 10°C y 95% de humedad relativa  
(A) y 10 días a 25°C y 65% de humedad relativa (B).

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AB.	Marcador AllBac utilizado en el presente trabajo, universal para <i>Bacteroidales</i> .
BB.	Marcador BoBac utilizado en el presente trabajo, específico para <i>Bacteroidales</i> de origen bovino.
BC.	Marcador BacCan utilizado en el presente trabajo, específico para <i>Bacteroidales</i> de origen canino.
CST.	Rastreo químico de fuentes de contaminación fecal (por sus siglas en inglés).
Cq.	Ciclo en amplificación en qPCR.
DNA.	Acido Desoxiribonucleico (por sus siglas en inglés).
ETAs.	Enfermedades Transmitidas por los Alimentos.
FC.	Coliformes fecales (Por sus siglas en Inglés).
FCB.	Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
FIB.	Bacterias Indicadoras de contaminación Fecal (por sus siglas en inglés).
FISH.	Técnica de hibridación fluorescente <i>in situ</i> para el marcaje de cromosomas con sondas que emiten fluorescencia.
GEC.	Copias de equivalentes génicos (por sus siglas en inglés).
HR.	Humedad relativa.
LABGEM.	Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
LOD.	Límite de detección (por sus sigla en inglés).
LOQ.	Límite de cuantificación (por sus siglas en inglés).
MPN.	Enumeración de microorganismos indicadores por técnica del Número Más Probable (por sus siglas en inglés).
MST.	Rastreo microbiano de fuentes de contaminación fecal (por sus siglas en inglés).

PB.	Marcador PigBac utilizado en el presente trabajo, específico para <i>Bacteroidales</i> de origen porcino.
PCR.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés).
qPCR.	Cuantificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés).
rpm.	Revoluciones por minuto.
RTE.	Alimentos listos para su consumo (por sus siglas en inglés).
RT-PCR.	Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Reversa.
RNA.	Ácido Ribonucleico (por sus siglas en inglés).
rRNA.	Ácido Ribonucleico ribosomal.
TC.	Coliformes totales (por sus siglas en inglés).
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UANL.	Universidad Autónoma de Nuevo León.
UV.	Ultravioleta.
VB.	Marcador VulgBac utilizado en el presente trabajo, específico para <i>Bacteroidales</i> de origen humano.
WHO.	Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés).

## I. RESUMEN

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB) no permiten rastrear la fuente de contaminación (MST), por lo que miembros del orden *Bacteroidales* se han propuesto como indicadores alternativos, dada su abundancia en las heces y especificidad de hospedero; sin embargo, a la fecha, su compartamiento solo se ha evaluado en agua y su persistencia no está bien estudiada. En este trabajo se evaluó la persistencia de los marcadores de *Bacteroidales* y FIB en tomate y melón contaminados artificialmente y almacenados bajo dos condiciones de temperatura y humedad. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Bacteroides thetaiotamicron* (de origen humano) y las cepas de *Bacteroidales* spp. 15<sup>PIG</sup> y 28<sup>COW</sup>, de origen porcino y bovino respectivamente. Para determinar la persistencia de los *Bacteroidales*, heces estériles se inocularon con las cepas bacterianas y se utilizaron para contaminar filtros (superficie lisa), corchos (superficie rugosa), tomates y melones, que se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (10°C/95%HR) y medio ambiente (25°C/65%HR) hasta por 25 días, monitoreando la persistencia de las FIB por microbiología convencional y marcadores de *Bacteroidales* por qPCR. Se encontró que en filtros y corchos ambas FIB disminuyeron en concentración durante el estudio, *E. coli* redujo hasta 3.28 logUFC/ml en refrigeración a los 25 días y en medio ambiente fue indetectable hacia los 10-20 días. Para el caso de *E. faecalis* a los 25 días se redujo de 0.52 a 2.82 logUFC/ml. Cuando el ensayo se realizó en vegetales, ambas FIB aumentaron su concentración en ambas condiciones de almacenamiento, disminuyendo posteriormente. Para el caso de los marcadores de *Bacteroidales* todos fueron detectados en las muestras; con valores equivalentes a 1.15-5.68 logUFC. El análisis de ANOVA demostró que la humedad fue el factor que mayor efecto tuvo en la persistencia de las FIB; en tanto que para *Bacteroidales* no hubo diferencia ( $P \leq 0.05$ ) en los valores durante el tratamiento. Con esto se demostró la persistencia de marcadores (general y especie-específicos) de *Bacteroidales* durante la vida de anaquel de tomates y melones contaminados; por lo que pueden ser empleados como indicadores para determinación de la fuente de contaminación fecal en complementariadad o reemplazo de las FIB.

## II. ABSTRACT

Fecal Indicator Bacteria (FIB) requires time and selective culture media to grow and do not allow microbial source tracking (MST). *Bacteroidales* have been proposed as alternative indicators due to their abundance on feces and host specificity, allowing MST. *Bacteroidales* marker behavior has been mainly evaluated on water and their persistence is not well understood. Due to this, persistence of host-specific *Bacteroidales* markers and FIB on tomatoes and melons artificially contaminated and stored under two different environmental conditions was evaluated. The strains used were *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; *Bacteroides thetaiotamicron* (human origin); and *Bacteroidales* 15<sup>PIG</sup> and 28<sup>COW</sup> (pig and cow origin). To determine *Bacteroidales* persistence, sterile feces from the different hosts were contaminated with the strains and applied to filters, flat cork, tomatoes and melons, and stored under refrigeration (10°C/95%HR) and room conditions (25°C/65%HR). Persistence was monitored up to 25 days. FIB were analyzed by selective agar plating and *Bacteroidales* markers by qPCR. Both FIB showed reductions onto filters and cork surfaces during the study, *E. coli* reduced up to 3.28 logCFU/ml under refrigeration conditions and not detected between days 10 to 20 at room conditions. *E. faecalis* showed reductions from 0.52 to 2.82 logCFU/ml in both treatments by day 25. FIB increased numbers in produce in both storage conditions, showing a slight reduction by the end of the study at room conditions. All *Bacteroidales* markers were detected in all samples at levels 1.15-5.5,569 logCFU/ml. ANOVA analysis showed that persistence of FIB was affected mainly by humidity. *Bacteroidales* markers did not show differences between them. Persistence of universal and species-specific *Bacteroidales* markers were proved during all shelf life of tomatoes and melons contaminated artificially. We conclude *Bacteroidales* markers are able to be used for MST purpose, together or instead of FIB.



### **III. INTRODUCCIÓN**

A nivel mundial, las enfermedades diarreicas causan la muerte de 1.8 millones de niños anualmente, siendo la mayor parte de estas muertes debidas al consumo de agua o alimentos contaminados con agentes patógenos, por los que las estrategias encaminadas a reducir estas enfermedades tendrán un impacto positivo en la salud pública (WHO 2015). En México, solo la salmonelosis causó 170,400 casos en el año 2011 (Secretaría de Salud, 2012).

Los cuerpos de agua pueden contaminarse con microorganismos procedentes de las aguas residuales domiciliarias, así como de aguas de uso agropecuario y posteriormente servir como vehículo para transmitir agentes patógenos a los humanos o contaminar alimentos, produciendo brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), Schriewer et al. 2010; Field y Samadpour 2007; Arcos et al. 2005).

Los vegetales son productos alimenticios, que al consumirse principalmente crudos, pueden fácilmente transmitir agentes infecciosos a los seres humanos; dichos gérmenes suelen provenir de la materia orgánica del suelo y del agua, durante la producción primaria; o bien, de la manipulación durante la cosecha y postcosecha (Castro et al. 2016; León et al. 2009).

Debido a lo anterior, el monitoreo de la calidad microbiológica de estos productos debe ser una practica rutinaria. Dado que es practicamente imposible buscar de manera específica cada uno de los posibles microorganismos patógenos, en forma regular se buscan aquellos microorganismos que tengan características semejantes y cuya presencia pudiera indicar un riesgo de la presencia de patógenos. Estos son llamados indicadores de contaminación fecal, sin embargo, presentan el inconveniente de requerir mucho tiempo y medios de cultivo para su crecimiento; además de que solo indican contaminación fecal y no permiten identificar el origen de dicha contaminación. Aunado a ello, muchas veces no se correlacionan con la presencia de agentes patógenos, por lo que no son muy útiles en la evaluación de riesgo, ni en el diseño de estrategias de prevención de la contaminación (Harwood et al. 2014).

La tendencia actual a nivel mundial se basa en el rastreo de fuentes de contaminación fecal (MST, por las siglas en inglés, *microbial source tracking*), detectando indicadores o microorganismos especie-específicos, de fácil identificación y que puedan correlacionarse con agentes patógenos, con la finalidad de identificar el origen y poder implementar estrategias de prevención efectivas (Mieszkin et al. 2009a; Kildare et al. 2007).

Los microorganismos del orden de los *Bacteroidales* son un grupo de bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos, habitantes normales del tracto gastrointestinal de humanos y varios animales, además se ha encontrado que algunos son especie-específicos de ciertos hospederos, por los que pueden ser utilizados para realizar MST. Adicionalmente, sus poblaciones son bastante constantes en los hospederos y no se multiplican en el medio ambiente; lo que los hace distintos de los indicadores tradicionales (Layton et al. 2006).

La mayoría de las técnicas para la detección de *Bacteroidales* se basan en la identificación de marcadores especie-específicos del gen 16S rRNA que permiten diferenciar entre *Bacteroidales* de humanos, rumiantes, cerdos, perros, aves, entre otros (Dorai-Raj et al. 2011; Wuerts et al. 2011). No obstante, la realización de MST por medio de marcadores de *Bacteroidales* representa algunos retos. Uno de ellos es la evaluación del comportamiento de la técnica en modelos distintos al agua; ya que la matriz que contiene a los microorganismos puede jugar un papel importante en la detección de los marcadores. Los estudios sobre la persistencia de los *Bacteroidales* en condiciones variables como la temperatura, la exposición a la luz solar o la matriz empleada presentan discrepancias sobre el tiempo en el cual estos microorganismos pueden ser identificados y servir como indicadores de contaminación fecal (Dick et al. 2010; Walters et al. 2009), de ahí la importancia del presente trabajo.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 Impacto de las ETAs a la salud pública.

Se estima que entre el 60 y 75% de las enfermedades infecciosas en los humanos son de carácter zoonótico y son ocasionadas, generalmente, por vía fecal-oral por bacterias, virus, hongos, protozoarios y parásitos que se transmiten entre animales y humanos utilizando el contacto directo, aerosoles, elementos ambientales, alimentos o agua como vehículos. La importancia de patógenos en salud pública se ha confirmado en numerosas especies animales silvestres y domésticos, incluyendo las mascotas, rumiantes, roedores, reptiles, anfibios, cerdos aves migratorias y de granja, entre otros (Conrad et al. 2017).

Dada la complejidad de los sistemas de producción, así como de la cadena de distribución y comercialización, numerosos vegetales han sido implicados en brotes de ETAs, siendo los vegetales de texturas rugosas, como los de hojas verdes y melones, los considerados de mayor riesgo para la transmisión de patógenos como *Salmonella* spp., diversos patotipos de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Castro et al. 2016).

En Estados Unidos de América y la Unión Europea, tan sólo en diez años, se registraron 377 y 198 brotes de ETAs causadas por vegetales lo que representa entre 23 a 60 brotes anuales en el primer caso y 10 a 42 brotes en el segundo. En ambos registros, Norovirus, *Salmonella* spp. y *E. coli* fueron los agentes que causaron la mayor parte de los brotes. La diferencia encontrada entre los tres agentes fue que Norovirus se asoció preferentemente a ensaladas y produjo brotes localizados, en tanto que los brotes por *Salmonella* spp. se diseminaron a varios estados o países y se vincularon a vegetales de hojas verdes. *E. coli* por su parte, fue la segunda causa de brotes asociados a varias zonas y en donde una amplia gama de vegetales, frutas, germinados y jugos se relacionaron con los episodios (Callejón et al. 2015).

Es importante señalar que las enfermedades asociadas a este grupo de microorganismos no están limitadas a una región del mundo, ni se circunscribe a países en desarrollo o desarrollados; ya que representan una amenaza global que amerita respuestas coordinadas de los servicios de salud y de la regulación

internacional y para ello, determinar la carga y proporción de microorganismos presentes en el agua es una necesidad (Arcos et al. 2005).

#### **4.1.1 El agua y los alimentos como vehículos para la transmisión de ETAs.**

La mayoría de los brotes de enfermedades zoonóticas en humanos se han relacionado con agua o alimentos contaminados y muchos de ellos han sido relacionados con el contacto directo con animales o indirectamente por medio de elementos ambientales durante la cadena de producción de los alimentos (Conrad et al. 2017).

El agua representa uno de los más importantes vehículos de transmisión de enfermedades, niveles altos de contaminación fecal en ella se han relacionado con numerosos brotes de enfermedades de manera directa por su consumo o indirecta por la contaminación de alimentos (Gómez et al. 2016; Staley et al. 2016; Lee et al. 2010). En Canadá los estudios sugieren que el número de brotes de ETAs asociadas al agua de bebida, al agua de uso recreacional y aquella usada en el riego de cultivos ha incrementado en los últimos años, lo que resalta la importancia del monitoreo de su calidad (Jokinen et al. 2010).

Los agentes patógenos (emergentes o reemergentes) implicados en la transmisión de enfermedades incluyen a bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias, que pueden causar enfermedades que van desde una gastroenteritis simple, hasta cuadros diarreicos, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea y los vehículos pueden ser el agua o alimentos que entran en contacto con agua o materia prima contaminada o por malos hábitos higiénicos (Arcos et al. 2005).

La utilización de agua de desecho sometida o no a diversos tratamientos es una práctica común en la cadena de producción primaria de alimentos en muchos países, principalmente en vías de desarrollo o sub desarrollados (Orlofsky et al. 2016). Adicionalmente existen numerosas evidencias de que los fenómenos climáticos tales como las tormentas pueden favorecer el movimiento de aguas contaminadas contribuyendo a expandirla a otros cuerpos de agua causando deterioro ecológico, degradación de aguas de recreación e incrementando el riesgo de ETAs

por su consumo o por alimentos que en algún momento de su cadena productiva entraron en contacto con esta agua (Kapoor et al. 2015).

En algunos países que carecen de sistemas de tratamientos de aguas residuales, las aguas grises domiciliarias (aguas de desecho, excluidas las que entran en contacto directo con heces y orina) son destinadas al riego de campos de cultivo, ya que la legislación lo permite, no obstante estas prácticas pueden contaminar tanto el suelo como la vegetación con agentes patógenos presentes en las mismas, muchos de los cuales son causantes de enfermedades gastrointestinales y de la piel, representando un importante riesgo para la salud humana (Leonard et al. 2016).

#### **4.1.2 Los vegetales como vehículos para la transmisión de ETAs.**

En los últimos años, la comercialización y consumo de vegetales frescos ha incrementado de manera explosiva, ya que son reconocidos por los consumidores como una importante fuente de nutrientes, vitaminas y fibra, lo que contribuye a una dieta saludable, en particular cuando están mínimamente procesados; sin embargo, a la par de este incremento, se ha registrado mayor número de brotes de ETAs relacionados con vegetales (Castro et al. 2016). Dado que muchos de los vegetales son consumidos frescos o requieren mínimo procesamiento, la contaminación con algún patógeno puede representar un elevado riesgo que está presente durante toda la cadena productiva (Olaimat y Holley, 2012).

La posibilidad de contaminación microbiana de frutas y vegetales es elevada, ya que la superficie del vegetal suele contener elevada humedad y disponibilidad de nutrientes, lo que es compatible con el mantenimiento de la vida microbiana y en algunos casos favorece su multiplicación. Adicionalmente, la carga estática de la superficie vegetal y la textura favorecen la adhesión y establecimiento microbiano y retención de materia orgánica que permiten a los microorganismos persistir en estas condiciones y en el caso de los patógenos, utilizar el vegetal como vehículo para causar brotes de ETAs (Torres et al. 2016).

Los vegetales frescos se han relacionado con muchos brotes de importancia en la última década, siendo *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 los patógenos mayormente implicados y los vegetales de las hojas verdes, germinados, hierbas y

frutas como los tomates, son los más frecuentes vehículos (Warriner y Namvar, 2010).

México es el tercer país exportador de vegetales a nivel mundial siendo el primer exportador de vegetales a Estados Unidos de América; donde el tomate, aguacate, chiles, uvas, pepino, melón, fresa, cebolla, espárragos, limón y brócoli son los principales cultivos comercializados. No obstante, este mismo país ha reportado algunos brotes de ETAs asociadas a productos de origen mexicano (García, 2014).

Los principales microorganismos asociados a brotes de ETAs por vegetales incluyen a *Salmonella* spp. y *E. coli* O157H7; aunque también se reportan al Virus de la Hepatitis A, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp., y *Yersinia enterocolitica* (Olaimat y Holley, 2012).

En un estudio analizando el comportamiento de 15 de los 28 patógenos de mayor importancia en salud pública en Canadá, se demostró que los vegetales frescos son los principales vehículos de diseminación de estos agentes (21.8% de los mismos asociados a estos vehículos) y la primera causa de brotes parasitarios y virales, con 25.2 y 29.1%, respectivamente (Butler et al. 2016).

El tipo de irrigación al que son sometidos los cultivos, la fuente de aprovisionamiento de agua, el suelo y el tipo de fertilización, entre otros factores, pueden contribuir a incrementar la posibilidad de contaminación de los vegetales en los campos de cultivo y en muchos casos, algunas prácticas específicas como la irrigación con aguas de desecho y la aplicación de estiércol de animales como práctica de fertilización, han sido identificados como factores de riesgo para desencadenar brotes (Orlofsky et al. 2016; Torres et al. 2016).

Como parte de un estudio para analizar los brotes de ETAs asociadas a vegetales en Estados Unidos de América y la Unión Europea, se identificó que la mayoría se relacionaban con establecimientos de procesamiento de los alimentos, lo que resalta la importancia de monitorear adecuadamente la calidad microbiológica de estos productos en todos los pasos de la cadena productiva para evitar la diseminación de agentes (Callejón et al. 2015).

## **4.2 Bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB).**

Debido a que los agentes patógenos son difíciles de identificar, dada la heterogeneidad de su distribución, los bajos niveles de contaminación y la complejidad de la matriz en que se encuentran, un grupo de microorganismos son rutinariamente monitoreados con fines de evidenciar una posible contaminación ambiental o con heces humanas y/o animales y por lo tanto el riesgo de la presencia de patógenos. Este grupo de microorganismos son usualmente referidos como FIB (Castro et al. 2016; Field y Samadpour 2007; Savichtcheva y Okabe, 2006).

Según varios reportes, las características que debe tener un microorganismo para ser considerado como un buen indicador de contaminación fecal incluyen que se encuentren en altas concentraciones, que no sea patógeno para el humano y tener facilidad, accesibilidad o economía en su cuantificación; además estar relacionados o evidenciar la posibilidad de presencia de algún patógeno, tener una reducida o nula tasa de multiplicación en el medio ambiente y tasas de persistencia o decaimiento similares al de algunos patógenos (Krolik et al. 2016; Harwood et al. 2014).

### **4.2.1 Indicadores tradicionales de contaminación fecal y métodos para su enumeración.**

Las FIB son un grupo de bacterias habitantes normales del tracto gastrointestinal de seres humanos y animales, ampliamente utilizados como indicadores de calidad microbiológica de agua y alimentos (Odagiri et al. 2015; León et al. 2009).

Existe una amplia gama de microorganismos que se han propuesto como indicadores de contaminación fecal, incluyendo diversos géneros, grupos o especies bacterianos, virus e inclusive bacteriófagos. Las bacterias pertenecientes a los grupos de los coliformes totales (TC) y fecales (FC), *Enterococcus* spp. y *E. coli*, han sido los más comúnmente utilizados en la práctica (Castro et al. 2016; Odagiri et al. 2015). Para el caso de aguas, tanto recreacionales como de uso domiciliario y en la industria de los alimentos, los denominados FIB son los más utilizados para evaluar de manera rutinaria la calidad microbiológica de diversas matrices; siendo en muchas ocasiones de carácter obligatorio (Ahamed et al. 2016; Rivera y Rock 2013).

Las bacterias pertenecientes al grupo de los TC son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, pueden fermentar la lactosa a 35°C, gracias a la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, produciendo gas en un lapso de 48 horas. Ejemplo de este grupo son los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*; se consideran como buenos indicadores de contaminación fecal ya que son habitantes comunes de tracto gastrointestinal de hombre y varios animales homeotermos, permaneciendo por largos períodos de tiempo incluso en agua. Sin embargo, no son los mejores indicadores de contaminación fecal en vegetales, ya que pueden estar presentes en grandes cantidades en el suelo (Leon et al. 2009; Arcos et al. 2005).

Por su parte, los organismos pertenecientes al grupo de los FC están asociados con el tracto intestinal de animales de sangre caliente pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo a los seres humanos. Son Gram negativos capaces de fermentar la lactosa con producción de gas en un período de 48 h a una temperatura de incubación de  $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  y son termotolerantes, esta última característica ayuda a distinguirlos de los TC. Constituyen cerca del 10% de los microorganismos totales del intestino humano y de otros animales (León et al. 2009; Arcos et al. 2005; Ashbolt et al. 2001).

Dado a que cumple con la mayoría de las características propuestas para ser un buen microorganismo indicador, *E. coli* ha sido ampliamente utilizada como una buena FIB (Krolik et al. 2016; Rivera y Rock, 2013). La presencia de esta bacteria en vegetales es considerada indicativo potencial de la presencia de patógenos entéricos. Sin embargo, su identificación y cuantificación contribuye poco al conocimiento de la fuente de contaminación, debido a su presencia en heces animales y humanas, la persistencia, la susceptibilidad a los desinfectantes y el crecimiento y proliferación en el ambiente (Ravaliya et al. 2014; Rodicio y Mendoza, 2004).

Algunas especies del género *Enterococcus* spp., se encuentran casi exclusivamente en el tracto intestinal de humanos y animales, mientras que otras especies generalmente están presentes como contaminantes 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* spp. y *Streptococcus* spp. (León et al. 2009; Ashbolt et al. 2001).

Algunas especies del género *Enterococcus* spp., 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 medios selectivos y diferenciales como el agar bilis esculina, en donde se pueden identificar a miembros de los géneros *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* spp. (León et al. 2009; Ashbolt et al. 2001). Sus miembros han demostrado correlaciones más fuertes con patógenos, debido a que presentan características semejantes como la persistencia y la tasa de decaimiento. Evidencias sugieren que este grupo de microorganismos no son muy hábiles para multiplicarse en el medio ambiente, salvo en condiciones especiales. Las tasas de correlación más elevadas de estas FIB se han registrado con virus y *Clostridium perfringens*; sin embargo presentan pobre correlación con patógenos como *Salmonella* spp. (Savichtcheva y Okabe, 2006; Arcos et al. 2005).

Por más de cien años se han utilizado los mismos indicadores tradicionales para evaluar la contaminación fecal y hacer análisis de riesgo, no obstante esto se encuentra en discusión, ya que cada vez son más los estudios que reportan que no se correlacionan adecuadamente a las FIB con patógenos; además, muchos estudios epidemiológicos han fallado al relacionar el impacto a la salud pública de aguas con elevadas niveles de microorganismos indicadores, sobre todo por desconocerse el origen de la contaminación (Harwood et al. 2014).

#### **4.2.1.1 Problemática de la utilización de los indicadores tradicionales.**

Algunos estudios han demostrado la relación entre las FIB y la ocurrencia de patógenos causantes de ETAs. Sin embargo los animales pueden expulsar estos microorganismos sin la presencia de patógenos para humanos, por lo que existe incertidumbre respecto a la calidad del agua y productos frescos con elevados conteos de estas bacterias y su asociación a una fuente de contaminación (Colford et al. 2007). Por lo tanto, su utilización tiene algunas limitantes, como los son: la habilidad de los microorganismos para multiplicarse en el ambiente, no ser especie-específicos, además de que hay estudios que sugieren que la presencia de indicadores

no necesariamente evidencía la presencia de contaminación fecal ni patógenos y viceversa (Harwood et al. 2014; Schriewer et al. 2010).

Las evidencias actuales sugieren que el paradigma de las FIB es imperfecto, ya que altos niveles de estos indicadores no siempre se correlacionan de manera adecuada con patógenos (principalmente virus y protozoos) y no permiten identificar una fuente específica de contaminación, por lo que no sirven como herramientas para la toma de decisiones. Por lo anterior, se considera que solo pueden ser considerados indicadores de contaminación fecal en condiciones específicas en dependencia del tiempo y el medio ambiente (Orlofsky et al. 2016; Staley et al. 2016; Anderson et al. 2005).

Adicionalmente, se ha evidenciado que la relación/correlación de un patógeno con las FIB es altamente aleatoria y suele ser sitio o tiempo específica (Bradshaw et al. 2016; Castro et al. 2016), incluso se ha establecido que algunas cepas de *E. coli* de origen animal tienen la posibilidad de multiplicarse en el ambiente, además de la posibilidad de entrar en estado viable pero no cultivable, causando resultados falsos positivos o negativos (Symonds et al. 2017; Krolik et al. 2016; Desmarais et al, 2002). Esta pérdida de correlación entre el grupo de los coliformes y los microorganismos patógenos puede ser parcialmente explicada por las distintas tasas de persistencia que estos microorganismos presentan, ante el efecto de las variables ambientales y que al encontrarse en bajos conteos, en el caso de los patógenos, puede dificultarse su recuperación en el laboratorio (Haller et al. 2009; Savichtcheva y Okabe, 2006; Anderson et al. 2005).

Varios reportes han señalado que la correlación entre las FIB y la contaminación fecal solo es alta cuando los niveles de contaminación fecal son elevados, por lo que si los niveles de contaminación son bajos, la posibilidad de obtener un falso negativo se incrementa (Staley et al. 2016; Kapoor et al. 2015). Adicionalmente, las técnicas convencionales de cuantificación de *E. coli* y otras FIB no permiten diferenciar entre cepas de diferentes orígenes, por lo que no se pueden vincular con una fuente específica (Krolik et al. 2016; Mattioli et al. 2016). El punto anterior ha resaltado la importancia de la identificación de la fuente de contaminación, ya que si se toma como ejemplo las enfermedades causadas por

virus, organismos que son altamente especie-específicos, al encontrarse una matriz (agua o alimento) contaminado con heces de origen humano, se corre mayor riesgo de presentarse un brote de un agente viral, en comparación con la contaminación fecal proveniente de otra fuente (Harwood et al. 2014; Field y Samadpour 2007).

Utilizando herramientas de modelación para evaluar el posible impacto del uso de aguas recreacionales en la salud pública, se ha demostrado que el riesgo es más elevado cuando las aguas están contaminadas con heces humanas o bovinas, en comparación con otras fuentes; debido a la probabilidad de encontrar patógenos que puedan afectar a los seres humanos, a las dosis infectivas y a la densidad en la que estos microorganismos se pueden encontrar, así como a su persistencia (Soller et al. 2010).

De la misma manera, otros estudios sugieren que la presencia de elevados conteos de FIB no necesariamente se relacionan con contaminación fecal reciente, ya que se podría deber a un fenómeno de resuspensión de los microorganismos presentes en los sedimentos y que provienen de contaminaciones pasadas, junto con el efecto selectivo que las condiciones medioambientales ejercen sobre las cepas de los diversos microorganismos (Haller et al. 2009; Butler et al. 2016; Fries et al. 2006; Anderson et al. 2005). También se ha reportado para el caso de los microorganismos que pertenecen al grupo de los coliformes, algunos son fermentadores lentos o nulos de la lactosa, como es el caso de *Salmonella* spp. o *Shigella* spp. y debido a que las pruebas para determinar coliformes basan su principio en la fermentación de este carbohidrato, conduciendo con esto a resultados falsos negativos, ya que subestiman la presencia de estos microorganismos (Savichtcheva y Okabe, 2006).

De igual forma, se ha demostrado que la matriz que acompaña a los microorganismos tiene un fuerte impacto en la posibilidad de recuperarlos por lo métodos de cultivo convencionales. Para el caso de la mayoría de las FIB, se estima que de aquellas que se encuentran en agua, sólo se logra hacer crecer en medios de cultivo artificiales entre el 0.1 y 1% de las células bacterianas presentes, en comparación con el número de células viables detectadas por técnicas como la citometría de flujo (Baumgartner et al. 2015).

También está documentado el efecto de la matriz en que se encuentran los microorganismos puede condicionar su persistencia y eventual multiplicación. En experimentos trabajando con agua de río con y sin sedimento y con sedimento esterilizado; la adición de sedimentos tuvo un efecto en la persistencia y multiplicación de *Enterococcus* spp. y de *E. coli*, por lo que se observó que el sedimento puede jugar un papel tanto de reservorio como de aporte de nutrientes para la multiplicación de las FIB, cuestionando su utilización como microorganismos indicadores en este tipo de matrices (Badgley et al. 2011; Haller et al. 2009; Fries et al. 2006; Desmarais et al. 2002).

Los factores ambientales también pueden tener un impacto en la persistencia y multiplicación de las FIB en la muestra, ya que como señala Tiefenthaler y colaboradores (2009), la temperatura en muestras de agua fue el factor que mayor efecto tuvo en la persistencia-multiplicación de los indicadores, ya que durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua sobrepasaba los 10°C, las cuentas bacterianas se incrementaron sobre los límites permitidos; demostrando una correlación positiva para el caso de las bacterias del grupo de los TC y una correlación leve pero aún significativa para el caso de *E. coli* y *Enterococcus* spp.

#### **4.3 El rastreo de fuentes de contaminación fecal (MST).**

De los brotes de ETAs asociadas a vegetales frescos o listos para su consumo (RTE, por sus siglas en inglés), una amplia gama de patógenos y de fuentes de contaminación (humanos, ambiente, animales) han sido relacionados. Por lo tanto, resulta de gran importancia conocer el origen de la contaminación, con la finalidad de implementar estrategias de prevención y/o control adecuadas (Castro et al. 2016; Rivera y Rock 2013). Es en este último punto en el que las técnicas de MST recobran importancia, ya que contribuyen a la identificación de la fuente específica de contaminación (Krolik et al. 2016; Odagiri et al. 2015).

La importancia de las técnicas de MST en la cadena productiva de los vegetales radica en que la mayoría de los brotes de ETAs en los que se ha vinculado a algún vegetal como vehículo, la fuente de contaminación suele ser el suelo, el agua o el ambiente del área de producción agrícola y el origen de la contaminación suelen

ser heces de humanos o de diversos animales que están en contacto de manera directa o indirecta con los cultivos (Olaimat y Holley 2012).

Un ejemplo de un sistema de MST, así como de su alcance, es el implementado por Okabe y colaboradores (2007), donde partieron del diseño de oligonucleótidos específicos para microorganismos del orden *Bacteroides-Prevotella* especie-específicos para humano, bovino y cerdo, demostrando que cada marcador específico se encontraba particularmente elevado en muestras de agua de río provenientes de zonas cercanas a granjas de cerdos, granjas lecheras y descargas de aguas residuales, además pudieron identificar valores elevados de los mismos marcadores en zonas río abajo. Con ello se demostró la aplicabilidad de esta técnica y su probable contribución a la gestión de las acciones tendientes a la mitigación del impacto en la contaminación de estas áreas. Además demostraron una pobre correlación con FIB; las cuales que se encontraron en valores constantes en todos los puntos muestreados, sin poderse relacionar con una fuente de contaminación específica, ni con niveles de contaminación (Okabe et al. 2007).

Recientemente se reportó una clona de *E. coli* que demostró ser humano específica, tratándose de los miembros de grupo B2 subgrupo VIII serotipo O81, la cual se logró relacionar por técnicas moleculares con humanos habitantes de África, Europa y América del sur; por lo que se propone como un microorganismo a estudiar con fines de MST (Clermont et al. 2008).

#### **4.3.1 Métodos empleados para MST.**

Existe una amplia gama de técnicas que permiten la identificación de fuentes de contaminación fecal, aunque de manera general se pueden dividir en: las dependientes de librería, las independientes de librería. Entre ellas se describen las que utilizan algún microorganismo o marcador del mismo y las que emplean algún compuesto químico como analito, estas últimas son referidas como CST (Staley et al. 2016; Rivera y Rock 2013).

Los métodos dependientes de una librería basan su principio en un enfoque común, que es la creación de una base de datos de fenotípica, y/o genotípica de un grupo más o menos homogéneo de microorganismos; con base en una característica

o grupo de características en particular, creando subcategorías de los microorganismos que son relacionadas con una fuente u origen común. Cabe señalar, que la variación de estas subcategorías puede verse influenciada por variables ambientales, evolutivas y geográficas; por lo tanto, cuanto más grande sea la base de datos, menor sesgo se esperará. Ejemplos de métodos de MTS dependientes de librería son: filotipos, patrones de resistencia a los antimicrobianos y electroforesis de campos pulsados, entre otros. En todos los casos se utiliza como microorganismo blanco algún miembro de las FIB como *E. coli* o *Enterococcus* spp. (Wong et al. 2012; Anderson et al. 2005).

Los métodos independientes de librería consisten, principalmente, en la identificación de un microorganismo que pueda relacionarse específicamente con un origen de contaminación, dada su especificidad de hospedero, siempre y cuando cumplan con las características deseables para cualquier microorganismo indicador. Varias especies de *Bacteroides/Prevotella*, *Bifidobacteria*, *Clostridium*, *Enterococcus*, y Arqueas metanogénicas, entre otras se han relacionado con la microbiota de algunos hospederos, lo que ha hecho resaltar su importancia como posibles blancos para MST (Wong et al. 2012; Ballesté et al. 2010).

Recientemente se ha hecho popular la utilización de virus como microorganismos para MST, todo ello con el objetivo de vincular la contaminación con una fuente, dada la relativa especificidad o tropismo que los virus presentan hacia un tipo específico de células. Algunos de los virus propuestos incluyen a Adenovirus humano, Poliomavirus humano, Norovirus del genotipo 1, Pepper Mild mottle virus, Rotavirus, Colifagos F+, entre otros. La problemática radica en que la mayoría de los virus propuestos son de origen humano, algunos de ellos son patógenos para los humanos y algunos poseen moléculas de RNA como genoma, por lo que requieren de RT-PCR para ser identificados. Adicionalmente los bajos niveles en los que se encuentran amerita de pruebas con una elevada sensibilidad para poder identificarlos (Symonds et al. 2017; McQuaig et al. 2012; Wong et al. 2012; McQuaig et al. 2009).

#### 4.3.2 Uso de *Bacteroidales* como herramienta para MST.

De la amplia gama de microorganismos propuestos como herramienta para MST, los *Bacteroidales* se distinguen por ser anaerobios estrictos y adaptarse preferentemente a un hospedero específico, adicionalmente son microorganismos muy abundantes en la heces, representando entre el 26 y 36% de la microbiota intestinal, en niveles de  $10^9$ - $10^{11}$  UFC/g de heces y no son patógenos (Gómez et al. 2016; Lee et al. 2010; Mieszkin et al. 2010). Las características anteriores se han utilizado para proponerlos como indicadores alternativos de contaminación fecal y en comparación con las FIB, presentan especificidad de hospedero, lo que permite MST y dada su anaerobiosis, no pueden multiplicarse en el ambiente, por lo que se asume que se mantienen en proporciones más estables que los indicadores tradicionales, ya que sólo toleran estrés oxigénico por un período menor a seis días a temperaturas elevadas y aunque el recuento *in vitro* de células viables es prácticamente imposible, se presume que sus ácidos nucleicos pueden permanecer por períodos prolongados (Ahamed et al. 2016; Gómez et al. 2016; Odagiri et al. 2015).

La utilización de aguas domiciliarias libres de heces (aguas grises) es una práctica común en países con sistemas deficientes de tratamiento de aguas residuales, ya que se asume que al estar libres de heces fecales representan un reducido riesgo de transmitir patógenos. No obstante, utilizando un marcador para *Bacteroidales* específicos de humano, se logró demostrar que este tipo de aguas contenían altos niveles de FIB y microorganismos patógenos como *Cryptosporidium* spp., *Clostridium* spp. y *Giardia* spp., además de ser positivas al marcador de *Bacteroidales* humanos, lo que se relacionó con contaminación fecal de origen humano en algún punto del sistema (Leonard et al. 2016).

Otro estudio reportó que altos niveles de marcadores para *Bacteroidales* se encontraron positivamente correlacionados con patógenos (*E. coli* productoras de Shigatoxinas, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp.) en sedimento de río; no obstante, no encontraron correlación entre dichos marcadores y los patógenos en el agua. En el mismo estudio, se demostró que los marcadores específicos para rumiantes se encontraban presentes en las aguas residuales de actividades

agropecuarias y no en las zonas forestales y urbanas; lo que reforzó la hipótesis de la utilización de estos microorganismos para MST (Bradshaw et al. 2016).

Dada la dificultad de su cultivo, las técnicas de MST que utilizan marcadores específicos para *Bacteroidales* se basan en amplificación de un fragmento del DNA bacteriano correspondiente al gen 16s rRNA, mediante PCR o qPCR (según el análisis sea cualitativo o cuantitativo (Kapoor et al. 2015; Korajkic et al. 2014; Okabe et al. 2007). De manera general se asume que las técnicas de PCR son más sensibles y específicas que las técnicas convencionales de aislamiento de indicadores o las de enumeración como la de número más probable (MPN), ya que los resultados se pueden obtener en 3 a 4 h (Rivera y Rock 2013; Dick y Fiel. 2004).

El principio para el diseño de los oligonucleótidos del gen 16S rRNA comienza con análisis *in silico* y comparación de las secuencias obtenidas con las reportadas en diversas bases de datos (Dorai-Raj et al. 2011; Mieszkin et al. 2009b). Se localizan regiones hipervariables contenidas entre regiones conservadas, y se utilizan como blanco para diseñar los oligonucleótidos. Posteriormente, después de su validación en condiciones de laboratorio, se determina su sensibilidad, especificidad y precisión. Cabe señalar que muchos de estos oligonucleótidos se han diseñado para cepas huésped-específico que se consideran “no cultivables en laboratorio” (Gómez et al. 2016; Savichtcheva y Okabe 2006).

Comparando la prevalencia de marcadores universales para *Bacteroidales* y específicos para humanos, Krolík y colaboradores (2016) encontraron una alta frecuencia del marcador para humanos en fuentes de agua donde se descargaban desechos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, no se encontró elevado el marcador para bovinos al analizar agua de pozos profundos de áreas con alta densidad de ganado, aunque el marcador para humanos permanecía en niveles bajos y el marcador general registraba valores elevados; concluyendo que el agua que abastecía dichos pozos, se contaminaba con heces no humanas o bovinas, desde su fuente de origen.

La ausencia del marcador para *B. thetaiotamicron* en muestras de agua de ríos del sur de California hizo sospechar que la contaminación fecal detectada por presencia de FIB fuera por fuentes distintas a humanos (Tiefenthaler y



colaboradores, 2009). También se reportó que un marcador humano para *Bacteroidales* se encontraba elevado en aguas de zonas cercanas a descargas de plantas de tratamiento de aguas domiciliarias y que a la par, en la misma zona, se encontraban elevados conteos de *E. coli*, lo que era consistente para considerar contaminación fecal de origen humano. El mismo estudio reportó incremento del marcador para rumiantes en zonas cercanas a áreas ganaderas (Staley et al. 2016). Con dos pares de oligonucleótidos diseñados por Mieszkin y colaboradores (2009b) se logró identificar con 98-100% de sensibilidad y 100% de especificidad altos niveles de marcadores específicos para cerdos en aguas de un río cercano a una zona porcícola en Francia.

También se ha reportado una fuerte asociación de un marcador de *Bacteroidales* de origen humano en aguas contaminadas con descargas de plantas de procesamiento de efluentes urbanos en Australia, reportando una correlación positiva entre este marcador y las FIB. La presencia de este marcador fue detectable en concentraciones en los que otros microorganismos reportados como MST (virus de polioma y adenovirus humanos) no fueron detectados (Ahmed et al. 2016). Otro estudio utilizando marcadores para *Bacteroidales* humanos, FIB y marcadores para virus y Arqueas demostró que el primer marcador resultó ser el más frecuentemente detectado en aguas contaminadas con aguas de descarga, incluso cuando los otros indicadores no pudieron ser identificados (McQuaig et al. 2012).

Un estudio que intentó correlacionar los marcadores generales y específicos de *Bacteroidales* con la presencia de agentes patógenos en agua de río y heces de animales demostró que el marcador general tenía una fuerte correlación positiva con *E. coli* O157:H7 y diversos serotipos de *Salmonella enterica*; pero no con *Campylobacter* spp. ni con los TC. En el mismo estudio, altos niveles de marcadores específicos para cerdos se encontraron en las muestras de agua positivas para serotipos de *Salmonella* que son comúnmente aisladas de los cerdos (*S. Mbandaka* y *S. Typhimurium*); de la misma forma, las muestras de agua que resultaron positivas para *E. coli* O157:H7 y *C. jejuni* registraron valores elevados del marcador de *Bacteroidales* para rumiantes, que son reservorios usuales de estos patógenos. También se logró demostrar que muchas de las muestras de las que se aisló

*Salmonella* y *Campylobacter* tenían presente el marcador para *Bacteroidales* humanos, por lo que se presume que la contaminación con heces humanas pueda estar jugando un papel importante en la presencia de dichos patógenos en el agua (Jokinen et al. 2010).

Harwood y colaboradores (2014) presentaron evidencias que correlacionan positivamente, la presencia o niveles elevados de algunos marcadores específicos para humanos o rumiantes con agentes patógenos como *Campylobacter* spp., *E. coli* patogénicas, *Salmonella* spp. *Cryptosporidium* spp. y principalmente enterovirus (Adenovirus, Enterovirus y Norovirus de los grupos I y II). Este comportamiento refuerza su aplicación como indicadores alternativos.

El único reporte de la presencia de los marcadores para *Bacteroidales* en una matriz diferente al agua se realizó en una colaboración binacional entre Estados Unidos de América y México, y se logró detectar marcadores universales, de humano y de rumiante en lavados de las manos del personal encargado del cultivo de melones, tomates y chiles, así como en los vegetales y en el agua de riego, lo que representó una importante hallazgo del uso potencial de los *Bacteroidales* como MST en la cadena de producción de los mismos, con fines de detectar contaminación fecal y realizar análisis de riesgo tendiente a asegurar la inocuidad de dichos productos (García 2014; Ravaliya et al. 2014).

#### **4.3.2.1 Persistencia de marcadores para *Bacteroidales*.**

Como parte del proceso de validación de una nueva propuesta de marcador para MST es importante la evaluación de la persistencia de tales marcadores ya que de manera adicional a la determinación de la sensibilidad y la especificidad, el poder utilizar los marcadores por un largo tiempo es una atributo deseable para ser considerado como un buen indicador alternativo (Liang et al. 2017; Mieszkin et al. 2009a). La mayoría de las investigaciones realizadas sobre la tasa de decaimiento de los diversos marcadores para *Bacteroidales* se han realizado utilizando parámetros medioambientales como la exposición a luz solar, la temperatura, la salinidad y la depredación por protozoarios; utilizando como matriz el agua; encontrándose diversos comportamientos al respecto y variando de acuerdo a la matriz empleada

(agua dulce o salada) y con ello el efecto de la variable ambiental a estudiar en la tasa de persistencia de los marcadores para *Bacteroidales* y de los indicadores tradicionales (Bae y Wuertz 2015; Bae y Wuertz 2012; Green et al. 2011). Otros estudios sugieren que en muestras de agua, durante el verano y en presencia de temperaturas altas, los marcadores para *Bacteroidales* tienden a persistir por menor tiempo, producto de las condiciones ambientales y principalmente del crecimiento de microorganismos predadores de las bacterias, por lo que incluso el DNA suele desaparecer de las muestras (Savichtcheva y Okabe 2006).

Utilizando marcadores generales para *Bacteroidales* y específicos para humanos, se demostró que ambos persisten en niveles más constantes que otros indicadores de contaminación fecal (*E. coli* y *Enterococcus* spp.) a condiciones drásticas como en las fosas de recolección primaria de las aguas domiciliarias; cuyo ambiente es caracterizado por recibir una amplia gama de factores como detergentes y desinfectantes, mezclas de agua y orina, etc que pueden afectar la persistencia de muchos microorganismos. (Wanjugi, et al. 2016).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la salinidad del agua, la cantidad de radiación UV recibida, el tiempo y la microbiota asociada a agua marina, Mattioli y colaboradores (2016), demostraron que la microbiota asociada fue el único factor que afectó la disminución de la posibilidad de identificar tres distintos marcadores de *Bacteroidales* humanos en las muestras. Este fenómeno se debe a la conducta predatoria por algunas bacterias y protozoos presentes en la matriz ya que un efecto similar se había demostrado en agua dulce por Korajkic y colaboradores (2014).

Estudios recientes señalan que los marcadores para *Bacteroidales* de origen humano y bovino parecen tener diferentes tasas de abundancia y persistencia a distintas condiciones ambientales. Lo anterior marca una oportunidad de investigación sobre qué tan persistentes son los distintos marcadores y poder evaluar la pertinencia de su utilización con fines de MST y la eventual utilización de múltiples marcadores en el mismo estudio (Lamendella et al, 2013; Dorai-Raj et al. 2011).

#### **4.3.2.2 Retos para la utilización de *Bacteroidales* en MST.**

El primer punto a aclarar a este respecto es la validación de la técnica en las condiciones de la zona en la que se pretende llevar a cabo, ya que se sugieren variaciones espaciales en las poblaciones de *Bacteroidales* asociados a algunos hospederos y con ello de la sensibilidad y/o especificidad de los marcadores. Por lo anterior, antes de utilizarse un marcador es indispensable su validación en la región geográfica a implementarse (Ahamed et al. 2016; Ballesté et al. 2010; Lee et al. 2010). Incluso algunos estudios han demostrado que el diseño de oligonucleótidos específicos para una especie pueda no tener el comportamiento esperado en términos de sensibilidad y especificidad, por lo que se requiere diseñar nuevos oligonucleótidos que permitan aumentar la eficiencia en el proceso de MST, tomando en cuenta que en muchos de los casos se trabaja con bases de datos producto de amplicones secuenciados y obtenidos con primers universales dado que muchas cepas de *Bacteroidales* no han logrado ser cultivadas (Mieszkin et al. 2010).

Como ejemplo de lo anterior, en un estudio realizado en India, solo uno de los seis marcadores específicos para *Bacteroidales* humanos demostró tener buen comportamiento, ya que la mayoría registró baja sensibilidad y algunos presentaron reacciones cruzadas con muestras de perros o aves. Además, solo uno de los marcadores específicos para rumiantes demostró adecuada sensibilidad y el único marcador para caninos demostró 90% de sensibilidad sin embargo se obtuvieron falsos positivos con otros animales, no así con muestras de heces humanas (Odagiri et al. 2015).

En un estudio utilizando muestras de diversas regiones del mundo, se evidenció cierta variabilidad en muestras de heces de cerdos frescas y en almacenamiento, en comparación con lagunas de sedimentación o suelos impactados por la porcicultura; demostrando que el ambiente puede jugar un rol importante en estructura y abundancia de las poblaciones de *Bacteroidales* presentes, independientemente de que el origen de la contaminación fecal fuera el mismo en todos los casos. Por lo anterior, los autores sugieren que se deberían de utilizar diferentes marcadores de la misma especie, para poder identificar correctamente la fuente de contaminación (Lamendella et al. 2013).

Recientemente se ha cuestionado el hecho de que al amplificar el DNA de una muestra, se estaría obteniendo señal, tanto de células vivas como de células muertas y de fragmentos de DNA “desnudos” presentes en la matriz y que permanezcan estables después del proceso de lisis bacteriana. La problemática de este hecho es que no se puede, con las técnicas convencionales, distinguir entre contaminación reciente o pasada. Para ello se han propuesto técnicas como la utilización de un agente intercalante del DNA (monoazida de propidio) que inhibe la amplificación del DNA en células muertas; pero dada la naturaleza de este compuesto, su utilización es un tanto limitada y cuestionable (Bae y Wuertz 2015). Por otro lado la RT-PCR ha demostrado ser más sensible incluso que la técnica convencional y se puede relacionar con la presencia de células vivas y por ende de una contaminación reciente (Kapoor et al. 2015).

Los estudios epidemiológicos no han logrado relacionar la presencia de uno o varios de los marcadores para *Bacteroidales* con un brote de enfermedad específico; señalando que la falta de sensibilidad encontrada para algunos de los marcadores probados o la cantidad de datos obtenidos limita la obtención de interpretaciones concluyentes; ya que incluso para algunas FIB las correlaciones entre la presencia de altos niveles de microorganismos con las enfermedades han sido leves (Harwood et al. 2014; McQuaig et al. 2009).

La recomendación actual es utilizar más de una técnica de MST para poder incrementar la sensibilidad y especificidad del proceso y como se ha demostrado en algunos países de la Unión Europea, la utilización de algunos de los marcadores para *Bacteroidales* especie-específicos, en combinación con otras técnicas tales como la detección del DNA mitocondrial del hospedero o el rastreo de otros microorganismos como *Bifidobacterias* y los mismos indicadores tradicionales (TC, FC, *Enterococcus* spp. y *E. coli*), entre otros; contribuyen a realizar un estudio que identifique correctamente las fuentes de contaminación fecal (Bradshaw et al. 2016; Ballesté et al. 2010; Field y Samadpour 2007; Savichtcheva y Okabe 2006).

## V. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos encaminados a la reducción de la incidencia de las ETAs, éstas continúan siendo un importante problema de salud pública. El incremento en el consumo de vegetales aunado con las condiciones prevalecientes durante su producción, ha hecho que cada vez más se relacionen con brotes de ETAs.

Las estrategias empleadas actualmente para evaluar la calidad microbiológica de los alimentos se basan, principalmente, en la identificación de microorganismos indicadores de contaminación, no obstante su utilización ha sido cuestionada, debido a que muchos estudios sugieren que no se correlacionan adecuadamente con la presencia de patógenos, impiden realizar de MST, además, de la posibilidad de incrementar o disminuir su cantidad durante la exposición a condiciones ambientales (temperatura, humedad y tiempo).

La determinación de marcadores de microorganismos del orden *Bacteroidales* ha demostrado ser una buena herramienta para la realización del MST, en razón de ser microorganismos relacionados con un hospedero específico, permanecer en números más o menos constantes en el ambiente, debido a la imposibilidad de multiplicarse en la presencia de oxígeno y de tener una buena correlación con los niveles de contaminación fecal y con microorganismos patógenos.

Por otra parte, la mayoría de los estudios para determinar la presencia del gen 16S rRNA de *Bacteroidales* se han realizado en muestras de agua, por lo que es importante evaluar el comportamiento de estos marcadores en diferentes matrices sólidas. Por lo que en el presente trabajo se analizó la factibilidad de detectar a las FIB en 2 vegetales con diferentes texturas (una lisa, tomate y otra rugosa, melón), y se analizó la detección de marcadores de *Bacteroidales* especie-específicos durante el almacenamiento bajo dos condiciones de temperatura y humedad, con la finalidad de estimar el tiempo que estos pueden ser utilizados para la realización de MST en vegetales.

## **VI. HIPÓTESIS**

Los marcadores especie-específicos del gen 16S rRNA de microorganismos del orden *Bacteroidales* pueden ser utilizados como indicadores de fuente de contaminación fecal durante toda la vida de anaquel de tomates y melones contaminados artificialmente.

## VII. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general.

Evaluar la persistencia de marcadores especie-específicos del gen 16S rRNA de microorganismos de orden *Bacteroidales* e indicadores tradicionales de contaminación fecal en tomate y melón contaminados artificialmente y almacenados bajo dos condiciones de temperatura y humedad.

### 7.2 Objetivos específicos.

- 1) Aislar cepas de *Bacteroidales* especie-específicas de humano, bovino, porcino y canino.
- 2) Evaluar la persistencia del marcador universal y especie-específico para *Bacteroidales* y las FIB en superficies artificiales lisas (filtros) y rugosas (corchos) contaminadas con heces fecales y almacenadas bajo distintas condiciones de temperatura y humedad.
- 3) Comparar la persistencia de los marcadores 16S rRNA especie-específico para humano, cerdo, perro, bovino y universal y las FIB, en tomates y melones contaminados con heces fecales y almacenados bajo dos condiciones de temperatura y humedad.



## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Conservación y manejo de cepas.

Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC® 25922™ donada por la Dra. Lynne McLandsborough, del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, *Enterococcus faecalis* ATCC® 19433™ obtenida comercialmente y *Bacteroides thetaiotamicron* ATCC® 29148™, donada por la Dra. LeeAnn Jaykus de la Universidad de Carolina del Norte, EUA.

Las dos primeras se manejaron en cepario a corto plazo en tubos con agar inclinado infusión cerebro corazón a 4°C, del cual se tomó una asada y se inoculó en 5ml de caldo infusión cerebro-corazón (cICC) para su incubación a 37°C en aerobiosis durante toda la noche; posteriormente una alícuota de 50µl se transfirió a 5ml de cICC y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar la absorbancia ( $A_{600}$ ) de 0.64 y 0.42 para de *E. coli* y *E. faecalis* respectivamente (aproximadamente  $10^9$  y  $10^6$  UFC/ml, respectivamente) que correspondía a la fase exponencial de crecimiento. Para determinar a que concentración correspondía cada Absorbancia, se realizaron diluciones decimales seriadas y alícuotas fueron plaqueadas en agar RAPID'E. coli 2 (REC2, BIORAD) para *E. coli* y agar *Streptococcus* KF (SKF, ACUMEDIA) suplementado con 1% de cloruro de Trifelintetrazolium, para *E. faecalis*.

La cepa de *B. thetaiotamicron* se obtuvo tomando una alícuota (50µl) del cultivo de reserva en caldo Carne Cocida (cCC, OXOID) e inoculandola en medio cCC fresco e incubado por 72 h a 37°C en aerobiosis. La cepa se ajustó a una  $A_{595}$  de 0.9 de absorbancia, lo que correspondía a  $10^9$  UFC/ml, aproximadamente (EPA 2010).

### 8.2 Obtención de controles positivos.

Para el caso de los *Bacterioidales*, se trabajó con cepas de *E. coli* DH5α transformadas en el LABGEM de la FCB-UANL con el vector del TOPO® TA Cloning® (INVITROGEN, 2014) los cuales contenían insertos positivos para cada una de las secuencias del gen 16S rRNA de *Bacterioidales* específicos de especie (marcador universal, humano, bovino, cerdo y perro).

Para la obtención de heces control con DNA específicos de huésped, 0.5 g de heces de las diferentes especies y la cepa *B. thetaiotamicron* obtenida de la centrifugación (10,000 rpm) de 5ml del cultivo se sometieron independientemente a la extracción del DNA mediante el kit ISOLATE Fecal DNA (BIOLINE) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (EPA 2010; Mieszkin et al. 2009b).

### **8.2.1 Extracción de DNA plasmídico.**

Para la obtención del DNA plasmídico se utilizaron las cepas transformadas. Se tomó una asada de cada cultivo y se inocularon en 5 ml de caldo Luria-Bertani suplementado de kanamicina (50 µg/ml). Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* DH5α que no contenía plásmido. Los cultivos se incubaron a 37°C por 20 h en aerobiosis y al cabo de este tiempo el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

El precipitado obtenido fue sometido al procedimiento del MiniPrep (Sambrook y Russell 2001), para lo cual, se resuspendió el paquete celular con 100 µl de una solución de lisis alcalina I (en relación 1:1:1; solución de glucosa 50mM, solución de Tris-Cl pH 8 25mM y solución de ácido etilendiaminotetraacético 0.5M), se agitó vigorosamente en vórtex 20 s y se almacenó en hielo el tiempo requerido para adicionar 200 µl de la solución de lisis alcalina II (mezcla preparada a temperatura ambiente y al momento de ser utilizada, en relación 1:1; solución de hidróxido de sodio 10N y duodecil laurisulfato de sodio 20% p/v) mezclándose 10 veces por inversión, para adicionar 150 µl de la solución de lisis alcalina III (acetato de potasio 5M), homogenizando de nuevo por inversión 10 veces el tubo, el cual se dejó reposar 5 min en hielo. Posteriormente, el lisado bacteriano obtenido se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C colectando el sobrenadante que fue transferido a un tubo eppendorf nuevo de 1.5ml. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó por la adición de doble volumen de alcohol etílico al 96% a temperatura ambiente y homogenizando en vórtex por 30 s, la muestra se dejó reposar por 2 min y se centrifugó como previamente se indicó. El sobrenadante se eliminó con micropipetea y el exceso se dejó evaporar a temperatura ambiente, para finalmente, el DNA precipitado lavarse mediante la adición de 1 ml de alcohol etílico

al 70%, repitiendo los pasos descritos para la precipitación, centrifugación y descarte del sobrenadante una vez más. El DNA obtenido se disolvió en 30 µl de agua MiliQ estéril y se verificó la concentración final en el NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoSCIENTIFIC).

### 8.2.2 PCR punto final.

Todos productos obtenidos (plásmidos y DNA), fueron sometidos a confirmación por PCR punto final, para lo cual cada 50 µl de reacción compuesta de 1x de Buffer de reacción MyTaq™ DNA Polymerase (BIOLINE), 0.4 µM de cada oligonucleótido, 5U de MyTaq™ DNA Polymerase, 2-4 µl de DNA templado y agua MilliQ estéril. Para la amplificación en el termociclador PCR Express (Thermo HYBAID, HBPX110) se realizó 1 ciclo de 95°C/2min seguido de 35 ciclos a 95°C/2min (temperatura de alineamiento)/30s, 72°C/2 min y por último 1 ciclo de amplificación de 72°C/2min. Los oligonucleótidos utilizados, las temperaturas de alineamiento, hospederos y tamaño de los amplicones esperados se describen en la tabla 1.

**Tabla 1. Descripción de los oligonucleótidos empleados en los ensayos del presente trabajo.**

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Hospedero	Alineamiento (°C)	Producto (pb)	Referencia
AllBac296f AllBac4122 *AllBac375Bhqf	GAGAGGAAGGTCCCCAC CGCTACTGGCTGGTTACG FAM-CCATTGACCAATATTCCTCAC TGCTGCCT-BHQ	Todos (AB)	**53	106	Layton et al. 2006
BvulgF1 BFDrev *BFDfAM	CATCATGAGTCCRCATGTTCA CGTAGGAGTTGGACCGTGT FAM-CTGAGAGGAAGGTCCCCACA TTGGA-BHQ	Humano (VB)	**53	166	Haugland et al. 2010; Converse et al. 2009
BoBac367f BoBac467r *BoBac402Bhqf	GAAG <sup>G/A</sup> CTGAACCAGCCAAGTA GCTTATTCATACGGTACATAACAAG FAM-TGAAGGATGAAGGTTCTAT GGATTGTAAACTT-BHQ	Bovino (BB)	***54	109	Layton et al. 2006
Pig-1-Bac32Fm Pig-1-Bac108R *Pig-1-Bac44P  <sup>Δ</sup> Pig-2-Bac41F <sup>Δ</sup> Pig-2-Bac163Rm	AACGCTAGCTACAGGCTTAAC) CGGGCTATTCCTGACTATGGG) FAM-ATCGAAGCTTGCTTTGATAGA TGGCG-BHQ GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT ACCTCATAACGGTATTAATCCGC	Cerdo (PB)	60	116	Mieszkin et al. 2009b
BacCan-545f1 BacUni-690r1	GGAGCGCAGACGGGTTTT CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA	Perro (BC)	***58	145	Kildare et al. 2007

\*La sondas se utilizarán para los ensayos de qPCR.

\*\*Temperatura obtenida de otra referencia distinta a la original, con resultados probados en el presente trabajo.

\*\*\*Temperaturas distintas a la referencia original; sin embargo determinadas en el presente trabajo como las que demostraron mejor comportamiento con base a un gradiente de 53-60°C.

<sup>Δ</sup>Para este marcador se utilizaron ambos pares de oligonucleótidos sin embargo debido a que en la qPCR no se obtuvo señal de la sonda se decidió utilizar Pig-2-Bac y Syber Green para realizar las curva estándar y la cuantificación.

Los productos obtenidos de la PCR punto final fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.2-0.5 µg/ml), revelados y fotografiados en el transiluminador GEL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM (Kodak). Se compararon la presencia de bandas de los controles positivos (cepa o DNA de heces) contra los plásmidos extraídos de las cepas transformadas. Los resultados positivos se consideraron controles positivos para los próximos ensayos.

### **8.3 Aislamiento de cepas de *Bacteroidales*.**

Se trabajó con muestras de heces de distintos hospederos, mismas que se obtuvieron de cinco individuos adultos, sin evidencia de enfermedad, ni historial de recibir tratamiento médico alguno. Las heces de humanos y perros fueron donadas por individuos residentes del área Metropolitana de Monterrey, en tanto que las de bovinos, cerdos, cabras, borregos, conejos y aves se colectaron en la unidad pecuaria de la Facultad de Agronomía de la UANL, con sede en el Municipio de Marín, Nuevo León. Todas las heces se colectaron en bolsas estériles individuales y se transportaron al laboratorio en refrigeración, para su procesamiento.

En el laboratorio se realizaron diluciones (1:10) con solución salina fisiológica estéril al 0.85% p/v (SSF) y se homogenizaron completamente por agitación manual. Una asada del coctel de heces se estrió sobre cajas petri con agar Brucella con hemina y vitamina K1 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con 5% de sangre, Vancomicina (0.0075g/l) y Kanamicina (0.1g/l) y se incubaron en anaerobiosis (GasPack™ EZ Anaerobe Pouch System) a 37°C por 24-48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se identificaron como colonias sospechosas las pequeñas a medianas, redondas y de color blanco a beige (Bacic y Smith 2008; Atlas 2004, Mangels y Douglas 1989). Se empleó como control positivo del crecimiento la cepa *B. thetaiotamicron*.

Una sola colonia sospechosa de cada cultivo se transfirió a 5 ml de cCC y 5 ml de medio fluido Tioglicolato (Bioxon), ambos fueron incubados a 37°C por 24 h, descartándose las cepas que presentaron crecimiento en la superficie del cultivo ya

que los *Bacteroidales* son anaerobios estrictos. Los tubos de cCC inoculados con cepas aisladas fueron considerados cultivos de reserva (EPA, 2010).

Los cultivos en cCC sirvieron para realizar la extracción de DNA con el kit ISOLATE fecal DNA (BIOLINE) y el material extraído fue sometido a PCR punto final bajo las condiciones descritas con anterioridad en los puntos 8.2.2 y con los oligonucleótidos de la tabla 1; seleccionando únicamente las colonias que presentaran amplificación con los oligonucleótidos generales y el específico del hospedero. Para todos los marcadores se utilizó el plásmido extraído en el primer ensayo como control positivo, en tanto que para BC el control positivo fue DNA extraído directamente de las heces de perro, ya que con el plásmido previo no se observó resultado positivo al tamaño de amplicón esperado (EPA 2010; Bacic y Smith 2008).

#### **8.4 Curvas de cuantificación por qPCR.**

Se ajustaron las concentraciones de todos los plásmidos obtenidos para lograr adicionar 1000 ng a cada reacción, siendo ésta la concentración más alta y a partir de esta se realizaron 6 diluciones decimales seriadas en agua MiliQ estéril. El número de equivalentes genómicos en cada reacción se calculó por medio de la aplicación de una fórmula matemática (Staroscik 2004). La qPCR se realizó en el equipo PikoReal 96 (ThermoSCIENTIFIC, TCR0096) en la que cada 20 µl de reacción contenía: 1x de SensiFAST™ Probe Hi-ROX, 400 nM de cada oligonucleótido, 100 nM de sonda y la concentración correspondiente de plásmido como templado y completando el volumen de reacción con agua MilliQ. Únicamente para la curva del marcador PB se utilizó SensiFAST™ SYBR, el resto de las concentraciones y condiciones fueron las mismas en todos los ensayos. Las condiciones para la qPCR así como los oligonucleótidos se describieron en la Tabla 1. Para cada plásmido se realizaron tres repeticiones independientes con sus respectivos duplicados, utilizando como control positivo el plásmido concentrado y como control negativo agua MilliQ estéril. Se calcularon las medias aritméticas de cada dilución y se obtuvo la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$  en cada caso (Odagiri et al 2015; Ravaliya et al. 2014; Mieszkin et al. 2010; Kildare et al 2007).

### **8.5 Preparación de inóculos de contaminación.**

Se partió de heces estériles (121°C por 30 min e irradiadas por 4 ciclos de 10 min bajo luz UV a 380 nm, Ahn et al. 2013) de los distintos hospederos diluidas 1:10 en SSF que se inocularon con cultivos bacterianos en fase exponencial de *E. coli* y *E. faecalis* ( $10^8$ - $10^9$  y  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml respectivamente), tal como se describió en el punto 8.1 de este apartado. Las cepas de *Bacteroidales* se crecieron en cCC por 72 h y el sobrenadante fue lavado y centrifugado a 6000 rpm 3 veces a temperatura ambiente en solución buffer de fosfatos con un pH 7.2 (PBS) estéril y se ajustó a una  $A_{595nm}$  de 0.9 ( $10^9$ - $10^{11}$  UFC/ml) de acuerdo a la fórmula propuesta por la EPA (2010). Las concentraciones bacterianas fueron seleccionadas tratando de simular las densidades reales presentes en las heces (McQuanig et al., 2012; Mieszkin et al., 2010).

Como control negativo en lugar de los cultivos bacterianos, a las heces de los distintos hospederos se les adicionó SSF estéril en las mismas proporciones ya descritas.

### **8.6 Persistencia de FIB y marcador AB en superficies artificiales.**

Se utilizaron dos texturas diferentes, emulando la rugosidad de la cáscara del melón y del tomate, que posteriormente se describirán. Para simular una superficie lisa se utilizó un filtro (F) de membrana (Millipore de 0.45  $\mu$ m de poro por 47 mm de diámetro), mientras que para la superficie rugosa se utilizaron cirulos (2 mm de espesor y 47 mm de diámetro) de corcho (C). Ambas superficies se colocaron sobre esponjas estériles hidratadas con 5ml de SSF, para evitar su desecación temprana.

Las unidades fueron contaminadas por duplicado por la técnica de puntos añadiendo 10 alícuotas de 10  $\mu$ l cada una de las diferentes heces fecales previamente contaminadas de humano (H) y de perro (D), independientemente (Dubois et al. 2007). Solo en este experimento, la cepa *B. thetaiotamicron* fue utilizada para contaminar ambas superficies.

Las muestras contaminadas y controles negativos se almacenaron en la cámara bioclimática (Thermo Scientific, 3911) bajo las siguientes condiciones: T1; 25°C/95% HR, T2; 10°C/60% HR, T3; 10°C/95% HR y T4; 25°C/65% HR. Los

tratamientos T3 y T4 correspondieron a las condiciones de almacenamiento de los vegetales y condiciones ambientales promedio del área Metropolitana de Monterrey, respectivamente.

A los 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días se realizaron lavados de una unidad de cada tratamiento, colocando la misma en una bolsa Whirl-Pack (Nasco) de 4 oz añadiendo 10 ml de SSF estéril y homogenizando la muestra con agitación y masaje manual durante un minuto. De allí se tomó una alícuota y se realizaron diluciones decimales seriadas que fueron sembradas por extensión sobre placas con agar REC2 para *E. coli* y SKF para *E. faecalis*. Ambas se incubaron a 37°C por 24h y se contaron las colonias en sus agares respectivos (*E. coli* moradas y *E. faecalis* rojas) tomando en cuenta los criterios de la NOM-113-SSA1-1994.

#### **8.6.1 Obtención de DNA a partir de lavados de unidades contaminadas.**

Al mismo tiempo, para la identificación del marcador AB, de los lavados de las superficies contaminadas, se filtraron (PALL Corporation) 5 ml a través de una membrana de 0.45 µm de poro. La extracción del DNA se realizó por medio de kit ISOLATE Fecal DNA, previamente descrito. Los productos se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización. La qPCR se realizó con base en las condiciones y oligonucleótidos ya descritos y se utilizó la ecuación de la recta encontrada para el marcador, para estimar el número de GEC y dividirlo entre 6.5 a fin de estimar el logUFC/ml de células de *Bacteroidales* recuperadas en los lavados (Hernández 2017; Ravaliya et al. 2014; EPA 2010).

#### **8.7 Persistencia de FIB y mezcla de *Bacteroidales* de distintos hospederos en superficies artificiales.**

Para esta determinación, se siguió el procedimiento previamente con la diferencia de que los corchos y los filtros se contaminaron con heces de los distintos hospederos (en proporción 1:1:1) contaminadas con las FIB y la cepa de *Bacteroidales* específica de cada hospedero: humano, cerdo y bovino (*B. thetaiotamicron*, Cepa 15<sup>pig</sup>, Cepa 28<sup>bov</sup> respectivamente). Las condiciones de almacenamiento fueron 10°C/95% HR (T3) y 25°C/65% HR (T4) y se siguió el

procedimiento descrito para enumeración de las FIB y los marcadores AB, VB, BB y PB. En este caso, los lavados se realizaron los días 0, 13, 19 y 25 en las mismas condiciones descritas en el punto 8.6.1.

### **8.8 Persistencia de FIB y mezcla de *Bacteroidales* de distintos hospederos en melones y tomates contaminados artificialmente.**

Los vegetales se adquirieron en un mercado de abastos del área Metropolitana de Monterrey y se seleccionaron por la integridad de la cáscara y con características de grados de madurez como se describe a continuación: tomates (*Lycopersicon esculentum*) variedad Saladette, con grado de madurez 1-2 (verde sazón a pinto inicial) (SAGARPA 2010; Cerda y Montero 2002) y melones (*Cucumis melo*) variedad Cantaloupe, se seleccionaron con grado de madurez 1-3, con una coloración verde opaco a oscuro y surcos bien definidos (León 2007). Con los grados de madurez seleccionados se esperaba que tuvieran una vida en anaquel de entre 20 y 25 días en condiciones de refrigeración (T3) y 10-15 días bajo condiciones de medio ambiente (T4), según lo reportado por la literatura y constatado en los ensayos preliminares.

#### **8.8.1 Protocolo de descontaminación de vegetales.**

El primer paso fue el protocolo para descontaminación de los vegetales, el cual se realizó por medio de la adaptación del reportado por Hernández (2017) y Heredia et al. (2015), donde los vegetales se sometieron a un lavado con detergente comercial (SALVO) y agua potable, frotándolos gentilmente con una esponja, para eliminar el exeso de materia orgánica superficial sin dañar la integridad de la cáscara y dejando reposar la espuma por espacio de un minuto, se enjuagaron con agua potable, se secaron con toallas de papel desechables y se asperjó toda la superficie con alcohol etílico al 70%. Los vegetales se dispusieron en bolsas estériles (1 melón o 3 tomates por bolsa, Whirlpak, Nasco de 18 oz) y se adicionaron 500 ml de agua destilada estéril y 1 ml de detergente para postcosecha (Likofen B10), agitando por un minuto y cepillando gentilmente la superficie (especialmente en la zona del pedúnculo), procurando no lesionar la superficie vegetal. Posteriormente se secaron



con papel desechable y se asperjó etanol al 70%. En una nueva bolsa se adicionó, masajeó y dejó reposar el vegetal con 500 ml de etanol al 96% por 1 y 5min para el caso de tomates y melones respectivamente. Transcurrido el tiempo se retiró el líquido y se adicionaron 500 ml de hipoclorito de sodio al 2.5% v/v, agitando y dejando reposar por el mismo tiempo. Se descartó el último contenido y se realizaron 3 repeticiones de enjuague y masaje con 500 ml de agua destilada estéril, se retiraron los vegetales de la bolsa, se secaron con papel desechable y se asperjaron nuevamente con etanol al 70%. Se realizó la aplicación de ozono por medio de la inmersión de los vegetales en un baño de agua destilada estéril por espacio de 2 h para los tomates y 4 h en el caso de los melones, tiempo durante el cual el ozonificador permaneció continuamente operando. La irradiación con luz UV (380nm) fue el último paso y se realizó sobre charolas estériles y colocando las lámparas sobre la superficie de los vegetales. Los tomates se irradiaron por 6 períodos de 30 min, moviendo los vegetales cada vez para asegurar cubrir el 100% de su superficie y los melones 6 h por la superficie del pedúnculo y 6 h por el lado contrario.

### **8.8.2 Contaminación de vegetales.**

Por cada tratamiento se contaminaron 4 unidades vegetales (1 unidad vegetal correspondió a 1 melón o 3 tomates) y se conservó una unidad como control negativo. Los inóculos para contaminación se prepararon con las mismas especificaciones del punto 8.5 y en las mismas proporciones descritas para el punto 8.7 (contaminación en coctel) y la contaminación de las superficies se realizó por la técnica de los puntos con 100 µl por tomate y 300 µl por melón, dispersos en tres puntos (Dubois et al. 2007). Los controles negativos se contaminaron con la mezcla de heces adicionada con SSF estéril.

Los vegetales contaminados se almacenaron en la cámara bioclimática bajo las condiciones descritas para T3 y T4. Los lavados para la enumeración de FIB y los marcadores de *Bacteroidales* se realizaron en una bolsa Whirl-Pack con 300 ml de SSF estéril, masajeado las unidades vegetales por un minuto. Los tiempos de tratamiento fueron: 0, 10 y 20 días para T3 y para el caso de T4 los días 0, 5 y 10.

Solo para este experimento se decidió medir la variable TC sembrando en placas REC2 e incubándose a 37°C por 24 h, para finalmente enumerar las colonias color azul o verde (TC) y las violeta (*E. coli*). Se realizó la extracción del DNA tal como se especificó anteriormente filtrando 150 ml de cada lavado.

Se realizaron tres repeticiones independientes para el procesamiento estadístico de los resultados.

### **8.9 Análisis estadístico.**

Se realizó la prueba de ANOVA simple para establecer las varianzas en las cuentas de FIB en los experimentos con filros y corchos y se determinaron los estadísticos descriptivos para cada caso. Para el caso de las FIB en las superficies vegetales y dado el comportamiento que demostraron, los valores utilizados fueron los logUFC/ml recuperados en los lavados para cada vegetal y a cada tiempo de almacenamiento.

En los experimentos con los marcadores para *Bacteroidales* y toda vez que no se observó una tendencia o patrón en los logUFC estimados, se procedió a realizar la comparación de las medias en los diferentes tiempos de almacenamiento.

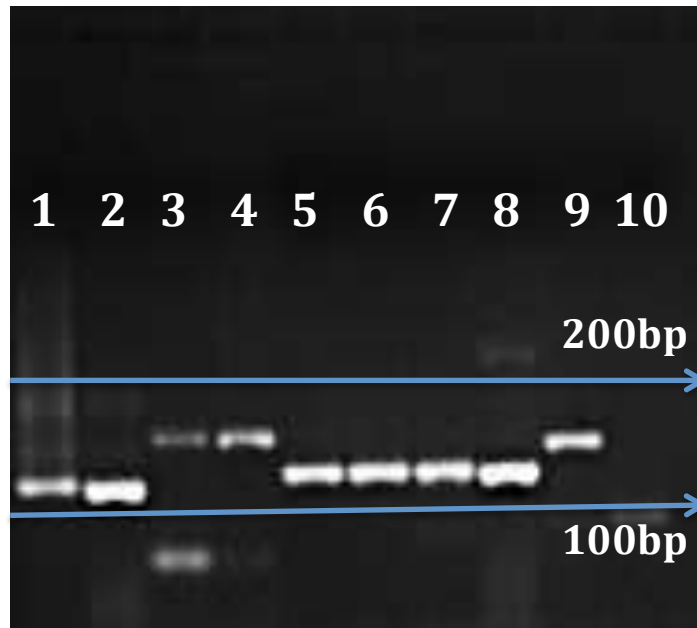
En todos los casos, los cálculos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 21.

## IX. RESULTADOS

### 9.1 Obtención de controles positivos.

La importancia de la obtención de estos productos radicó en que fueron indispensables para la construcción de las curvas estándar para cada marcador, así como servir de controles positivos para el resto de los experimentos.

Las cepas que contenían las secuencias de diferentes hospederos se confirmaron, obteniendo DNA de *B. thetaiotamicron*, heces de humano, heces de bovino, heces de cerdo y heces de perro (Fig. 1).



**Figura 1. Gel de agarosa al 1% con los productos obtenidos de la PCR de controles positivos de DNA extraído de heces de los distintos hospederos y plásmidos obtenidos de cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con insertos positivos para *Bacteroidales*.**

Carrill y 2 AB (106pb), 3 y 4 VB (166pb), 5 y 6 BB (109pb), 7 y 8 PB (116pb), 9 y 10 a BC (145pb).

No se obtuvo banda positiva con el inserto de BC; sin embargo, del control positivo sí se obtuvo el amplicón esperado, por lo que se presume que se pueda haber perdido la secuencia durante el proceso de transformación, por lo que se decidió seguir utilizando el DNA extraído de heces como control positivo para BC. Para el caso del marcador PB se utilizaron los dos pares de oligonucleótidos descritos en la tabla 1 y para ambos se obtuvo el mismo comportamiento.

## 9.2 Aislamiento de cepas de *Bacteroidales*.

Se aislaron 35 cepas con características morfológicas sugestivas de *Bacteroides* spp. El origen de las cepas fue de humano (5), canino (13), ave (2), conejo (3), ovino (2), caprino (1) y bovino (4). Las cepas se identificaron con un número consecutivo y las iniciales de la especie de origen (Tabla 2).

**Tabla 2. Crecimiento de *Bacteroidales* aislados de diversos hospederos en cCC y fTG así como su identificación mediante PCR.**

ID	cCC	fTG	AB	VB	BB	PB	BC	Observaciones
1 <sup>HUM</sup>	+	+	+	+	-	+	-	D
2 <sup>HUM</sup>	+	+	+	+	+	-	-	D
3 <sup>DOG</sup>	+	+	+	+	-	-	-	Continúa.
4 <sup>DOG</sup>	+	Aerobiosis	NR	NR	NR	NR	NR	D
5 <sup>DOG</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
6 <sup>DOG</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
7 <sup>DOG</sup>	+	+	+	+	+	-	-	D
8 <sup>DOG</sup>	+	Aerobiosis	NR	NR	NR	NR	NR	D
9 <sup>DOG</sup>	+	Aerobiosis	NR	NR	NR	NR	NR	D
10 <sup>DOG</sup>	+	Aerobiosis	NR	NR	NR	NR	NR	D
11 <sup>HUM</sup>	+	+	+	+	-	+	+	D
12 <sup>HUM</sup>	+	+	-	NR	NR	NR	NR	D
13 <sup>HUM</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
14 <sup>PIG</sup>	+	+	+	-	-	+	-	Continúa
15 <sup>PIG</sup>	+	+	+	-	-	+	-	Continúa
16 <sup>PIG</sup>	+	+	+	+	+	-	-	D
17 <sup>PIG</sup>	+	+	+	+	+	-	-	D
18 <sup>PIG</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
19 <sup>BIR</sup>	+	+	+	+	+	-	-	D
20 <sup>BIR</sup>	+	+	+	+	+	+	-	D
21 <sup>RAB</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
22 <sup>RAB</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
23 <sup>RAB</sup>	+	+	+	+	-	+	-	D
24 <sup>LAM</sup>	+	+	+	-	+	+	-	D
25 <sup>LAM</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
26 <sup>GOA</sup>	+	+	+	-	+	-	-	Continúa
27 <sup>COW</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
28 <sup>COW</sup>	+	+	+	-	+	-	-	Continúa
29 <sup>COW</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
30 <sup>COW</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
31 <sup>DOG</sup>	+	+	+	+	-	+	-	D
32 <sup>DOG</sup>	+	+	+	+	-	+	-	D
33 <sup>DOG</sup>	+	+	+	+	-	+	-	D
34 <sup>DOG</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
35 <sup>DOG</sup>	+	+	+	-	-	-	-	D
<i>B. thetaiotamicron</i>	+	+	+	+	-	-	-	Continúa

ID. Identificación de la cepa, cCC. Crecimiento en caldo Carne cocida. fTG. Crecimiento en fluido tioglicolato, AB. AllBac, VB. VulgBac, BB. BoBac, PB. PigBac, BC. BacCan, <sup>HUM</sup>. Humano, <sup>DOG</sup>. Canino, <sup>PIG</sup>. Porcino, <sup>BIR</sup>. Aviar, <sup>RAB</sup>. Conejo, <sup>LAM</sup>. Ovino, <sup>GOA</sup>. Caprino, <sup>COW</sup>. Bovino, D. Cepa descartada por no cumplir con los criterios requeridos. + positivo, - negativo. NR: no realizado

De las 35 cepas aisladas, 4 se descartaron por presentar crecimiento en la zona de aerobiosis del FTG (4, 8, 9 y 10<sup>DOG</sup>). Otra se descartó por no amplificar con los oligonucleótidos para AB (12<sup>HUM</sup>). De las cepas restantes, sólo 12 presentaron banda positiva para AB y 13 amplificaron con más de un par de oligonucleótidos específicos. La cepa de *B. thetaiotamicron* (identificada como cepa de origen humano) y utilizada como control positivo sólo amplificó con los oligonucleótidos AB y VB (Fig. 2a). Las 5 cepas aisladas que cumplieron con los requisitos planteados fueron la 3<sup>DOG</sup> que fue positiva para AB y VB (Fig. 2b), las cepas 14<sup>PIG</sup> y 15<sup>PIG</sup> que amplificaron con AB y PB (Fig. 2c y 2d) y las cepas 26<sup>GOA</sup> y 28<sup>COW</sup> que amplificaron con AB y BB (Fig. 2e y 2f). No obstante, la cepa 26<sup>GOA</sup> se contaminó. No se obtuvieron cepas positivas para BC, aún cuando el control positivo de heces de perro dió bandas compatibles en todo momento.

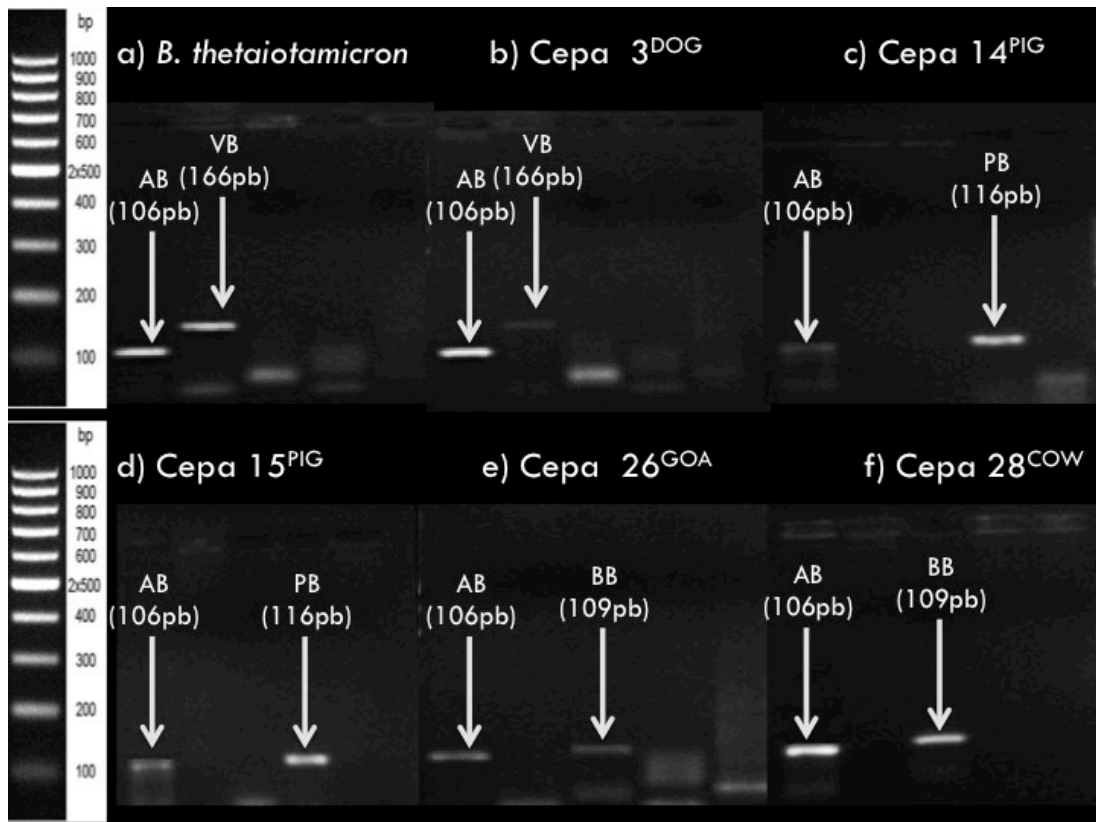


Figura 2. Amplicones obtenidos para las distintas cepa de *Bacteroides* obtenidas, con los oligonucleótidos empleados en el presente estudio.

Se decidió continuar los experimentos con las cepas *B. thetaiotamicron*, 15<sup>PIG</sup> y 28<sup>COW</sup>, dado que fueron las que se lograron aislar del hospedero de interés,

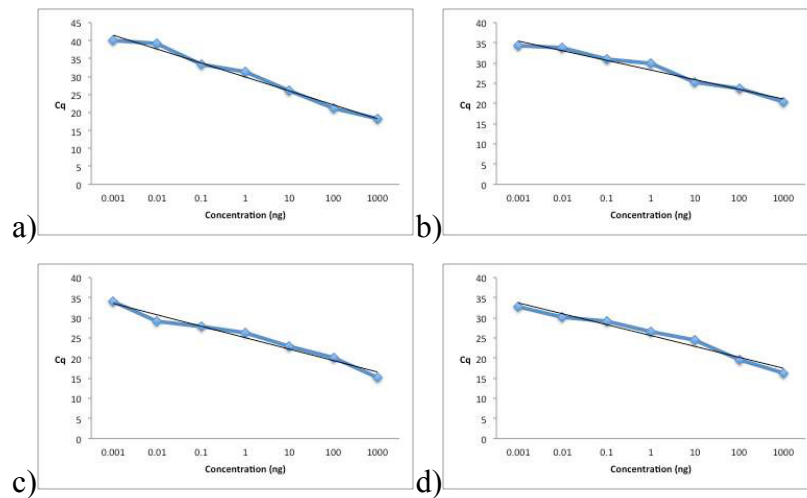
presentando además un comportamiento idóneo frente a los oligonucleótidos universal y específico, produjeron amplicones sin bandas inespecíficas y con crecimiento abundante en cCC; lo cual era requerido para tener las densidades requeridas para los ensayos posteriores.

### 9.3 Curvas de cuantificación por qPCR

Los valores obtenidos de las curvas de cuantificación de los plásmidos para los distintos marcadores empleados en el trabajo se encuentran expresados en la tabla 3, en tanto que las gráficas obtenidas se pueden visualizar en la figura 3.

**Tabla 3. Valores obtenidos de las curvas de calibración de los diferentes marcadores para Bacteroidales especie específicos, mediante qPCR.**

Marcador/hospedero	R <sup>2</sup>	Ecuación obtenida
AB universal	0.98229	$y=-3.8767x+45.378$
VB humano	0.96904	$y=-2.3881x+37.824$
BB bovino	0.96832	$y=-2.8404x+36.418$
PB porcino	0.96499	$y=-2.3881x+37.824$



**Figura 3. Gráficas obtenidas de las curvas estándar para la cuantificación de los marcador universal AB (a), humano VB (b), bovino BB (c) y porcino PB (d).**

Cabe señalar que en estos experimentos utilizó *Syber Green* ya que no se obtenía señal de la sonda, aún en los controles positivos de plásmido concentrado;

por lo que el resto de los experimentos en lo que se utilizó la qPCR se realizaron con estas condiciones.

El límite de detección obtenido para los marcadores AB, BB y PB fue de 26 UFC (equivalente a 172 GEC). En tanto que para el marcador VB fue de 58 GEC lo que correspondió a 9 células (Staroscik 2004).

#### **9.4 Persistencia de FIB y marcador AB en las superficies artificiales.**

Los resultados de la persistencia de ambas FIB en las diferentes condiciones de almacenamiento y considerando ambas superficies mostraron una reducción de 1.87-4.02 logUFC/ml para *E. coli*, bajo condiciones de 95% HR, entanto que la misma bacteria no pudo ser recuperada entre los días 5 y 25 de los experimentos con baja humedad. Para el caso de *E. faecalis*, las reducciones fueron de 0.05-2.31 y 1.65-4.23 logUFC/ml en condiciones de humedad alta y baja, respectivamente. Las tendencias demostradas por ambas bacterias bajo las distintas condiciones de almacenamiento de filtros y corchos, así como las reducciones en los logCFU recuperados se detallan en las figuras 4A-D y la tabla 4.

Al realizar la prueba de ANOVA simple, se demostró que todos los factores (temperatura de almacenamiento, textura utilizada y tipo de heces) tenían un efecto significativo en la reducción de ambas FIB; sin embargo, de acuerdo a los resultados, la humedad ejerció la mayor influencia (Fig. 5). Por lo tanto, se seleccionaron los tratamientos T3 y T4 para realizar las repeticiones requeridas para su análisis.

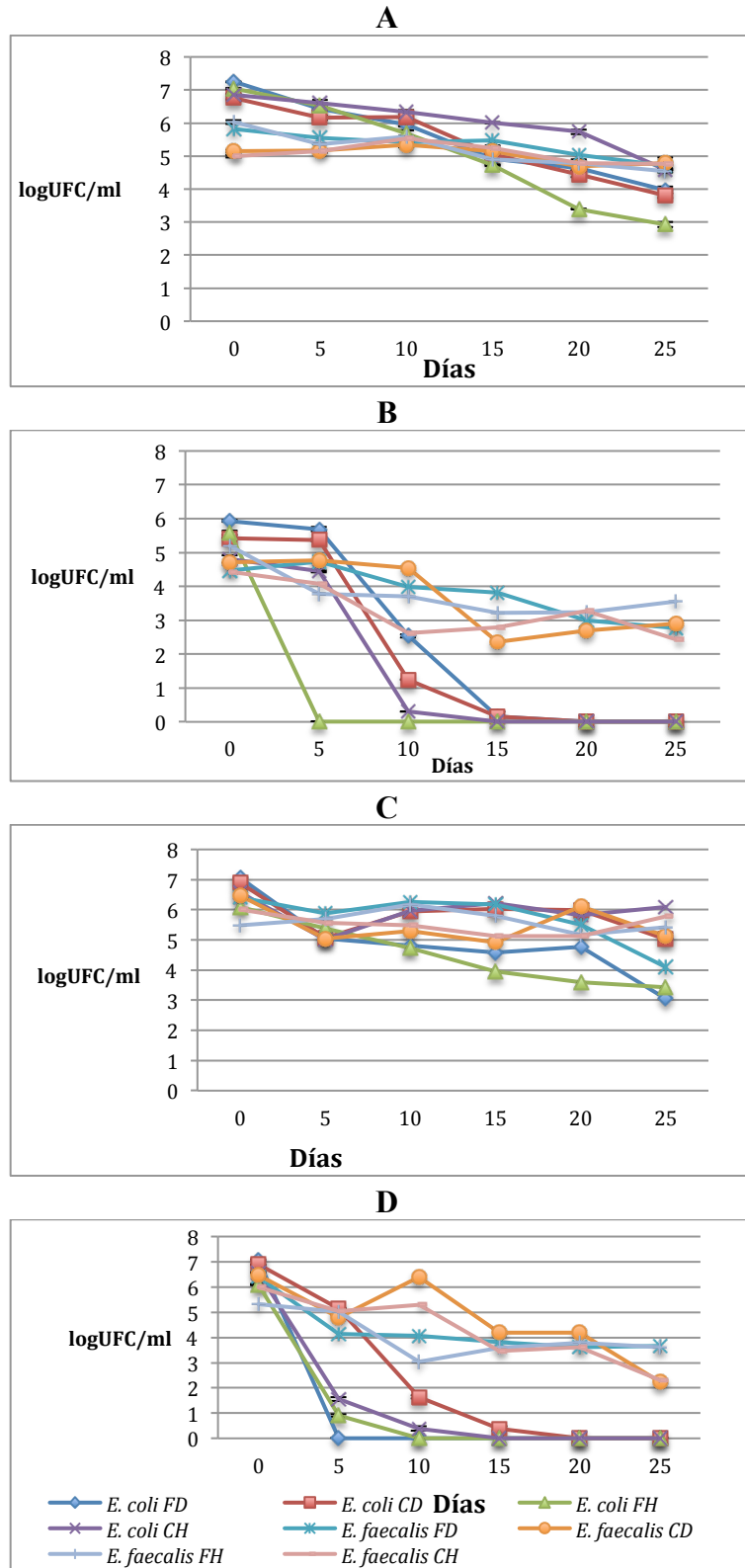
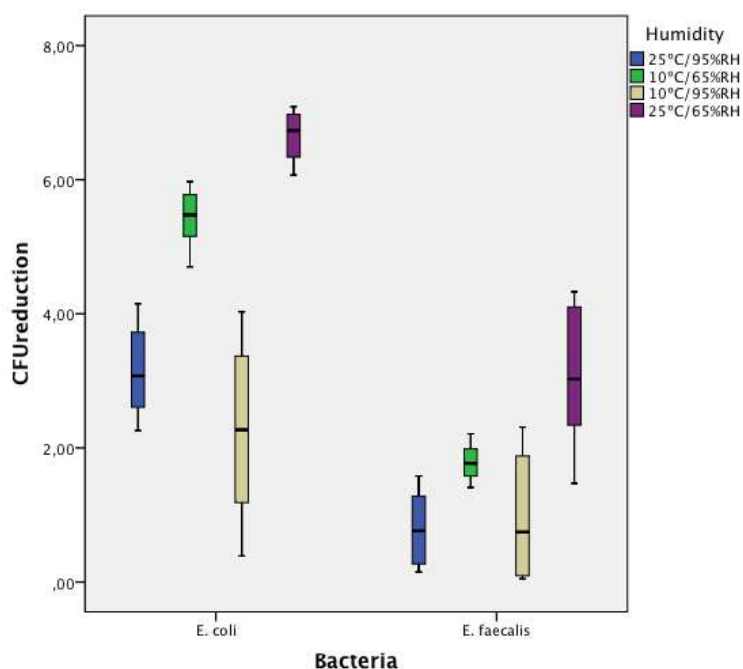


Figura 4. Persistencia de FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días a 25°C y 95% HR (A), 10°C y 65% HR (B), 10°C y 95% HR (C) y 25°C y 65% HR (D).



**Tabla 4. Reducciones de *E. coli* y *E. faecalis* en filtros y corchos contaminados con heces de humano o perro y almacenados por 25 días bajo cuatro condiciones controladas.**

FIB	Superficie	Origen de las heces	Reducción (log UFC/ml)			
			25°C/95%HR	10°C/65%HR	10°C/95%HR	25°C/65%HR
<i>E. coli</i>	filtro	perro	3.28	5.93	4.02	7.07
	corcho		2.96	5.59	1.87	6.89
	filtro	humano	4.11	5.59	2.67	6.10
	corcho		2.27	4.80	0.48	6.57
<i>E. faecalis</i>	filtro	perro	1.10	1.69	2.31	2.74
	corcho		0.37	1.81	1.33	4.23
	filtro	humano	1.48	1.65	0.05	1.71
	corcho		0.23	1.99	0.21	3.69



**Figura 5. Representación de los logUFC de reducción de las FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días bajo cuatro combinaciones de humedad y temperatura.**

Los valores de las GEC del marcador AB para las condiciones de almacenamiento T1 y T2 (tabla 5) registraron un promedio general de  $2.63 \pm 0.84$ . En este caso el marcador fue detectado en todos los lavados, sin importar la textura de la superficie analizada, el tipo de heces o las condiciones de almacenamiento.

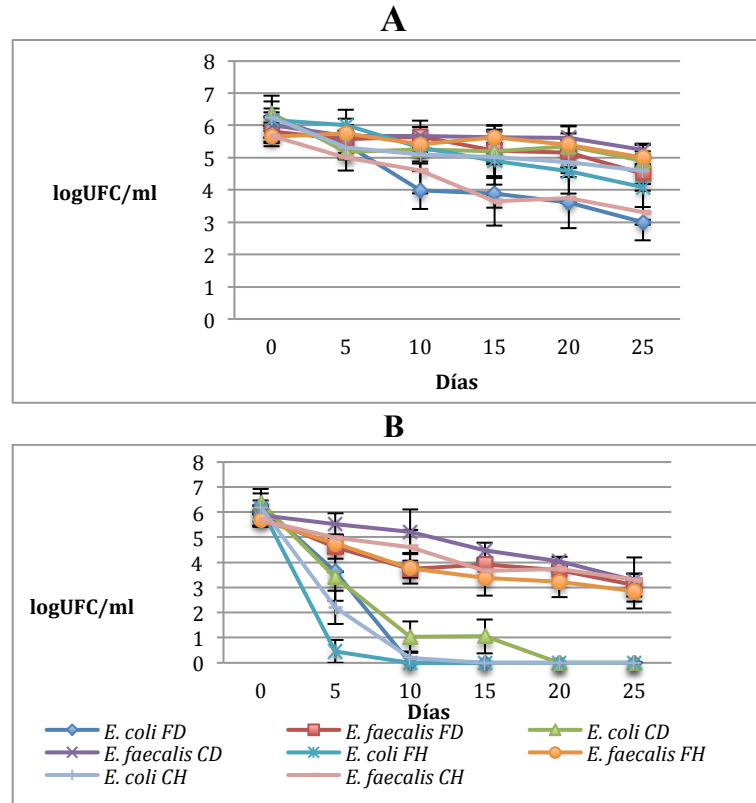
**Tabla 5. Valores medios estimados (logUFC/ml) de *B. thetaiotamicron* que persistieron en filtros y corchos contaminados con heces de humano o de perro y almacenados bajo dos condiciones controladas durante 25 días.**

<i>B. thetaiotamicron</i> (logUFC/ml)		
Día	25°C/95% HR	10°C/65% HR
0	3.46 ±0.19	2.85±0.31
5	3.24±0.44	3.26±0.92
10	2.27±0.79	2.80±0.29
15	2.25±0.57	2.82±0.41
20	2.11±0.40	1.68±0.72
25	1.93±0.57	2.85±0.73

Los resultados de la persistencia de ambas FIB en las dos condiciones de almacenamiento y considerando ambas superficies mostraron una reducción de 1.50-3.28 logUFC/ml para *E. coli*, bajo condiciones de 95% HR, entanto que la misma bacteria no pudo ser recuperada entre los días 10 y 25 de los experimentos con baja humedad. Para el caso de *E. faecalis*, las reducciones fueron de 0.57-1.75 y 2.37-2.82 logUFC/ml en condiciones de humedad alta y baja, respectivamente. Las tendencias demostradas por ambas bacterias bajo las dos condiciones de almacenamiento de filtros y corchos, así como las reducciones en los logCFU recuperados se detallan en la figura 6 A y B y la tabla 6.

**Tabla 6. Reducciones de *E. coli* y *E. faecalis* recuperados de filtros y corchos contaminados con heces de humano y perro, almacenados por 25 días bajo dos condiciones controladas.**

FIB	Superficie	Origen de las heces	Reducción (logUFC/ ml)	
			10°C/95% HR	25°C/65% HR
<i>E. coli</i>	Filtro	perro	3.28±0.74	6.27±0.65
	Corcho		1.57±0.53	6.37±0.38
	Filtro	humano	2.07±0.40	6.16±0.08
	Corcho		1.50±0.62	6.17±0.28
<i>E. faecalis</i>	Filtro	perro	1.75±0.30	2.73±0.32
	Corcho		0.79±0.49	2.61±0.38
	Filtro	humano	0.85±0.37	2.82±0.54
	Corcho		0.57±0.30	2.37±0.37



**Figura 6. Persistencia de FIB en filtros (F) y corchos (C) contaminados artificialmente con heces de humano (H) o perro (D) y almacenados por 25 días a 10°C y 95% de humedad relativa (A) y 25°C y 65% de humedad reativa (B).**

Cuando se analizó la tendencia de las FIB a lo largo de los tratamientos, se demostró ( $P \leq 0.01$ ) que todas las variables evaluadas (superficies, tipo de heces y especie bacteriana) influenciaron la concentración de las bacterias, sin embargo la humedad fue, nuevamente, el factor que demostró el valor de F más elevado (629.11), siendo el doble de lo obtenido por el tipo de bacteria, que fue la variable con el segundo mayor efecto en la persistencia.

El marcador AB fue detectado en el 100% de los lavados de los corchos y filtros contaminados, los valores individuales para cada tratamiento y variable, así como las desviaciones estándar se pueden observar en la tabla 7. La media general para T3 fue 4.56 logUFC/ml ( $\pm 0.29$ ) y para T4 4.47 logUFC/ml ( $\pm 0.44$ ).

El análisis estadístico mostró que ningún factor tuvo efecto sobre la posibilidad de recuperar el marcador y la prueba Tukey para la comparación de medias demostró que todos los valores pertenecían a un mismo subconjunto.

**Tabla 7. Valores medios estimados de logUFC/ml de *B. thetaiotamicron* recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con heces de humano y de perro y almacenados bajo dos condiciones controladas.**

Tiempo (días)	Superficie	Origen de las heces	10°C/95% HR	25°C/65% HR
0	Filtro	Humano	4.52±0.16	4.52±0.16
5			3.60±0.36	3.15±0.52
10			4.78±0.23	2.47±0.21
15			4.04±0.31	4.74±0.09
20			4.12±0.08	4.33±1.06
25			3.81±0.28	3.96±0.19
0			Corcho	Humano
5	3.41±0.30	3.59±0.40		
10	3.07±0.34	3.71±0.42		
15	4.43±0.60	4.36±0.05		
20	5.08±0.49	3.53±0.52		
25	4.10±0.27	4.24±0.15		
0	Filtro	Perro		
5			4.42±0.00	3.38±0.37
10			3.89±0.00	3.57±0.06
15			3.96±0.02	4.98±0.34
20			4.53±0.15	3.82±0.47
25			4.33±0.29	4.08±0.36
0			Corcho	Perro
5	4.22±0.37	3.09±0.30		
10	4.41±0.11	4.20±0.04		
15	4.26±0.33	4.00±0.27		
20	4.26±0.30	4.42±0.72		
25	3.51±0.30	4.19±0.05		

### 9.5 Persistencia de FIB y mezcla de *Bacteroidales* en superficies artificiales.

Las FIB al someterse a 10°C y 95% de humedad relativa (T3) se mantubieron estables hasta el día 19 y posteriormente disminuyeron al día 25 registrando valores de 1.20-2.24 logUFC/ml para *E. coli* y 0.52-2.24 logUFC/ml para *E. faecalis*; en tanto que en el tratamiento a 25°C y 65% de humedad relativa (T4) las reducciones fueron de 1.68-5.78 y 1.95-2.09 logUFC/ml para *E. coli* y *E. faecalis*, respectivamente (Fig. 7A y B, Tabla 8). El análisis estadístico indicó asociación altamente significativa para todas las variables evaluadas ( $P \leq 0.01$  y  $F=92.25$ ) y

nuevamente la humedad fue el factor que mayor efecto tuvo en la persistencia de ambas FIB.

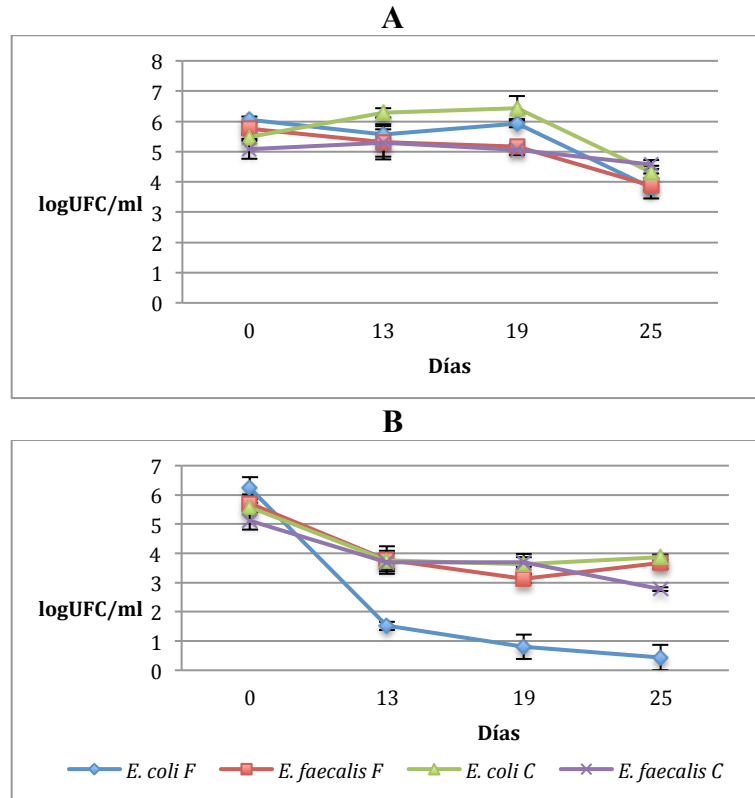


Figura 7. Reducciones de *E. coli* y *E. faecalis* recuperados de filtros y corchos contaminados con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo, almacenados por 25 días bajo dos condiciones ambientales controladas.

Tabla 8. Reducciones de *E. coli* y *E. faecalis* recuperados de filtros y corchos contaminados con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo, almacenados por 25 días bajo dos condiciones ambientales controladas.

FIB	Superficie	Reducción (logUFC/ml)	
		10°C/95%HR	25°C/65%HR
<i>E. coli</i>	Filtros	2.24±0.15	5.78±0.83
	Corcho	1.20±0.34	1.68±0.21
<i>E. faecalis</i>	Filtros	1.89±0.25	1.95±0.23
	Corcho	0.52±0.21	2.09±0.06

Los marcadores universal y especie-específicos de *Bacteroidales* persistieron durante los 25 días de tratamiento en ambas superficies, los valores medios de logUFC/ml estimados con base en los Cq obtenidos para cada uno de ellos, así como sus desviaciones estándar se presentan en la tabla 9. Cabe señalar que se presentaron

valores de desviación estándar de hasta 2 logUFC/ml; lo cual se discutirá más adelante en el trabajo.

**Tabla 9. Recuentos de *Bacteroidales* (logUFC/ml) universal y especie-específicos, recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con heces, después de su almacenamiento por 25 días bajo dos condiciones ambientales.**

Condición de almacenamiento	Superficie	Día	Marcador de <i>Bacteroidales</i>			
			Universal	Humano	Bovino	Porcino
10°C/95% HR	Filtro	0	5.21±0.17	3.85±1.23	1.02±0.49	2.43±0.20
		13	5.68±0.36	4.06±2.07	1.35±0.49	2.39±0.26
		19	4.87±0.43	4.33±0.74	1.94±0.83	2.69±0.30
		25	4.68±0.41	4.88±0.20	2.03±0.82	2.25±0.28
	Corcho	0	4.67±0.21	4.74±0.83	1.25±0.23	2.53±0.53
		13	4.67±0.21	4.46±0.31	1.20±0.28	2.59±0.09
		19	4.61±0.15	2.29±0.71	1.14±0.59	1.69±0.06
		25	4.91±0.25	4.54±0.44	1.23±0.23	2.38±0.14
25°C/65% HR	Filtro	0	4.79±0.19	4.94±0.58	1.22±0.29	2.03±0.24
		13	4.56±0.19	3.60±1.29	2.73±0.21	2.37±0.13
		19	4.52±0.23	3.85±1.73	1.69±1.06	2.28±0.01
		25	4.79±0.23	3.88±1.65	1.97±1.18	3.04±0.10
	Corcho	0	5.08±0.06	3.79±0.99	0.88±0.65	2.33±0.25
		13	4.85±0.12	4.12±0.59	1.25±0.15	2.52±0.01
		19	4.99±0.28	3.39±1.17	1.24±0.38	2.39±0.14
		25	4.61±0.26	4.21±0.49	1.96±0.84	2.35±0.28

La prueba de Tukey utilizada demostró que los promedios de cada una de las variables analizadas perteneció a un subconjunto independiente (Tabla 10A); sin embargo, al considerar las medias para cada día de tratamiento, se observó que todas corresponden a un mismo subconjunto (Tabla 10B) por lo que es lógico que no se presentaran diferencias significativas entre ellos. El análisis de ANOVA aplicado señaló que el único factor con asociación significativa ( $P \leq 0.05$ ) para las cuentas microbianas estimadas fue el propio marcador analizado.

**Tabla 10. Prueba de Tukey para la comparación de valores medios estimados (logCFU/ml) de *Bacteroidales* recuperados de lavados de filtros y corchos contaminados con un heces, después de su almacenamiento por 25 días bajo dos condiciones ambientales.**

<b>A</b>					<b>B</b>			
<b>Marcador</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto</b>				<b>Días</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>			
Bovino	48	1.5079				19	48	3.0146
Porcino	48		2.3367			0	48	3.1881
Humano	48			4.0579		13	48	3.2048
Universal	48				4.8183	25	48	3.3133

### **9.6 Persistencia de FIB y mezcla de *Bacteroidales* en melones y tomates contamiandos artificialmente.**

Cuando se analizó la presistencia de FIB en las muestras vegetales se obtuvo crecimiento ( $P \leq 0.01$ ) en vez de reducciones, por lo que el análisis realizado fue la comparación entre las medias de los distintos tiempos para cada tratamiento y no las reducciones de logUFC/ml como en el resto de los experimentos (Fig. 8A y B). En estos ensayos el tipo de vegetal, fue el que influyó de manera más importante en las cargas microbianas recuperadas.

Los marcadores universal y especie-específicos, de *Bacteroidales* persistieron durante todo el tiempo de almacenamiento en ambos vegetales (Tabla 11). el tipo de marcador fue el que mas influyó en la persistencia ( $P \leq 0.01$ ).

Como en el ensayo previo, la prueba de Tukey demostró que las medias de los logUFC/ml de cada uno de los *Bacteroidales* pertenecieron a distintos subconjuntos (Tabla 12 A); pero al comparar entre los distintos días de almacenamiento; todos pertenecieron al mismo subconjunto (Tabla 12B).

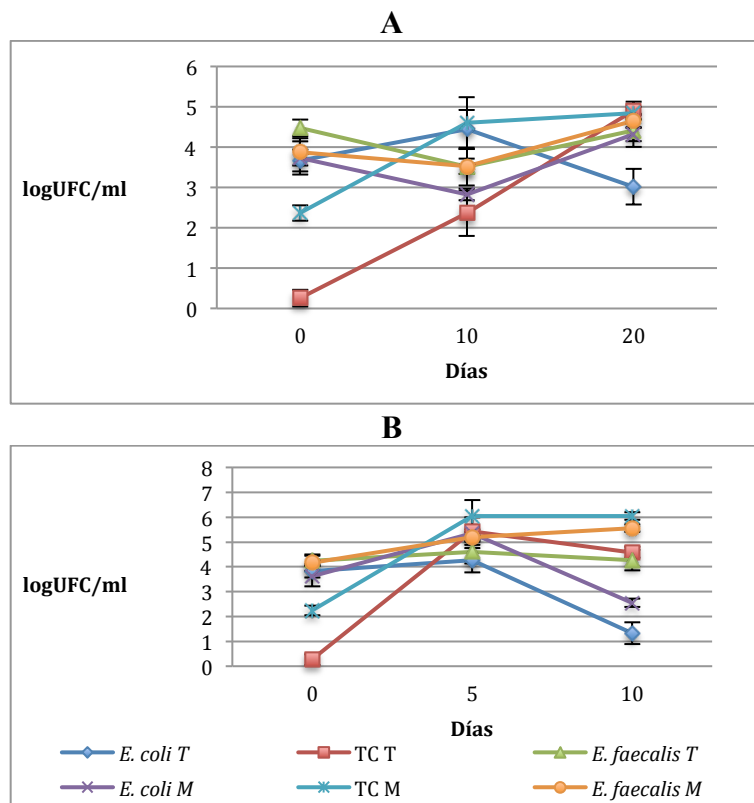


Figura 8. Viabilidad de *E. coli*, coliformes totales (TC) y *E. faecalis* en tomates (T) y melones (M) contaminados artificialmente con un coctel de heces de humano, bovino y cerdo y almacenados por 20 días a 10°C y 95% de humedad relativa (A) y 10 días a 25°C y 65% de humedad relativa (B).

Tabla 11. Recuentos de *Bacteroidales* (logUFC/ml) universal y especie-específicos, recuperados de lavados de tomates y melones contaminados con heces, después de su almacenamiento por 10 y 20 días bajo dos condiciones ambientales.

Condición de almacenamiento	Fruto	Día	Marcador de <i>Bacteroidales</i>			
			Universal	Humano	Bovino	Porcino
10°C/95% HR	Tomate	0	2.58±0.35	3.63±1.69	1.75±1.06	2.82±0.18
		10	2.25±0.44	2.67±0.97	1.35±0.15	2.68±0.36
		20	2.38±0.40	2.58±1.97	1.69±1.18	2.61±0.01
	Melón	0	2.37±0.25	2.20±1.31	1.45±1.20	2.71±0.16
		10	2.78±0.02	3.34±1.65	1.60±0.99	2.59±0.08
		20	1.19±0.39	3.47±1.51	2.51±1.12	2.55±0.09
25°C/65% HR	Tomate	0	4.01±0.18	3.86±1.56	2.21±1.12	2.15±0.68
		5	2.30±0.48	3.43±2.64	1.90±1.34	2.73±0.10
		10	2.34±0.11	4.22±2.42	1.57±1.59	2.17±0.68
	Melón	0	2.39±0.52	3.93±0.90	1.68±0.83	2.72±0.28
		5	1.58±0.28	3.00±1.52	1.51±0.60	2.44±0.21
		10	2.94±0.28	2.81±1.80	1.65±1.21	2.46±0.25



**Tabla 12. Prueba de Tukey para la comparación de valores medios estimados (logCFU/ml) de *Bacteroidales* recuperados de lavados de tomates y melones contaminados con un heces, después de su almacenamiento por 10 y 20 días bajo dos condiciones ambientales.**

<b>A</b>					<b>B</b>		
<b>Marcador</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto</b>			<b>Días</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto</b>
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			<b>1</b>
Porcino	36	1.20.69			10	48	2.0698
Bovino	36	1.7397	1.7397		20	24	2.0763
Universal	36		2.4239	3.2636	5	24	2.1654
Humano	36				0	48	2.2850

## X. DISCUSIÓN

Se sabe que el microbioma intestinal de los humanos y de muchos animales se caracteriza por el establecimiento de múltiples relaciones mutualistas en donde tanto los microorganismos como el hospedero resultan beneficiados. La porción distal del tracto gastrointestinal puede ser considerada una cámara biorreactora que alberga una amplia cantidad y diversidad de organismos comprendidos en los tres dominios de la vida. Del dominio *Bacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* y *Firmicutes* cada uno representa cerca del 30% de los microorganismos totales, en tanto que las Proteobacterias suelen estar presentes mas no son dominantes (Bäckhed et al. 2005). Por lo tanto, los *Bacteroides* han sido propuestos como buenos indicadores de contaminación fecal, ya que al estar presentes en niveles más elevados, en comparación con las FIB, debe resultar más fácil su identificación.

El objetivo de obtener cepas de *Bacteroides* que amplifiquen con los marcadores universal y especie-específico, fue reducir el efecto que otras variables como diversidad y abundancia microbiana pudieran ejercer al evaluar la persistencia de los marcadores (Lamendella et al. 2013; Dorai-Raj et al. 2011).

Al considerar que el grupo de los *Bacteroidales* como uno de los microorganismos más abundantes de las heces, se esperaría que al utilizarse como indicadores de contaminación sea muy eficaz; no obstante algunos reportes han señalado como limitantes de estas técnicas la baja especificidad de hospedero observada en algunos ensayos, ello debido a la transmisión horizontal de genes entre hospederos que coexisten en regiones muy cercanas (Odagiri et al. 2015; Mieszkin et al. 2010). Por lo tanto, al utilizar una cepa específica, que guarda relación con un hospedero en particular, se reducen las variables que puedan producir un efecto en la persistencia de los marcadores debido a la sensibilidad y especificidad de la prueba u otros elementos que al utilizar heces de diversos hospederos, pudieran conducir a resultados falsos positivos o negativos.

Las regiones hipervariables del gen 16S rRNA que se utilizaron en este trabajo presentaron diversidad entre especies bacterianas, por lo que la utilización de estas secuencias con fines de rastreo de patógenos, tal como se ha propuesto anteriormente (Harwood et al. 2014; Chakravorty et al. 2007).

Aunado a lo anterior, dada su relativa facilidad de identificación y el comportamiento que han mostrado en numerosos estudios, los *Bacteroides* han sido considerados buenos indicadores de contaminación fecal, por su alta sensibilidad y especificidad y por permitir rastrear una fuente específica (Tambalo et al. 2012; Ahmed et al. 2009), estableciendo una sensibilidad 100 veces mayor en comparación con la determinación de FIB (Fremaux et al. 2009; Field y Samadpour, 2007).

El marcador universal para *Bacteroidales* utilizado en el presente estudio, ha sido previamente utilizado. Se demostró *in silico* que los iniciadores presentan gran homología con los genomas de *Bacteroidales* aisladas de diversas fuentes, lo que en términos prácticos debe resultar en una buena capacidad de identificar la secuencia blanco (Layton y colaboradores 2006). En otro trabajo, también este marcador fue el más sensible de todos, logrando detectar 2.3logGEC (Ravaliya et al. 2014).

Como se pudo observar en los resultados del presente trabajo, solo una baja proporción de cepas (5/35) mostraron el comportamiento típico de *Bacteroidales* especie-específico (Mienszkin y colaboradores 2010), sin embargo, como se ha reportado previamente no siempre los oligonucleótidos muestran el comportamiento esperado en términos de sensibilidad y especificidad, por lo que se requiere diseñar nuevos oligonucleótidos para aumentar la eficiencia en el proceso.

Por lo anterior se puede especular que el hecho de obtener 12 cepas que fueron positivas únicamente para el marcador AB, en tanto que 13 amplificaron a más de un marcador específico, pueda ser debido a una probable baja especificidad de los marcadores bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el estudio tal como ha sucedido en otros trabajos (Lamendella et al. 2013; Dorai-Raj et al. 2011).

Aunque se ha postulado que las poblaciones de microorganismos en el intestino humano se suelen mantener estables, se sabe que algunos factores como la dieta pueden alterar el equilibrio poblacional, favoreciendo que dominen ciertos grupos microbianos, en detrimento de otros; lo que puede generar la variabilidad que se ha registrado al tratar de identificar marcadores para *Bacteroidales* específicos para algunas especies (Bäckhed et al. 2005).

En un estudio solo uno de seis marcadores específicos para *Bacteroidales* humanos mostró buen comportamiento, ya que el resto registraron baja sensibilidad,

e incluso algunos presentaron reacciones cruzadas con muestras de perro o ave, así como los marcadores específicos para rumiantes si mostraron una sensibilidad adecuada para utilizarse en ensayos de MST (Odagiri et al. 2015).

En este trabajo fue posible identificar 5 cepas con el comportamiento deseado frente a los marcadores probados. La cepa *B. thetaiotamicron* mostró amplicones tanto para el marcador general como para humano. Esta bacteria es un habitante común del colon distal humano que está adaptado a digerir polisacáridos indigestibles para el hospedero, y es comúnmente aislado de heces de pacientes sanos ya que se elimina con facilidad en la heces por carecer de estructuras que le permitan adherirse a la mucosa intestinal permaneciendo unido a las pequeñas moléculas de polisacáridos en la luz intestinal (Bäckhed et al. 2005). Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados, se consideró una cepa de origen humano, *B. vulgatus* (Haugland et al. 2010; Converse et al. 2009), y la habilidad de estos iniciadores para identificar a esta cepa ya se ha comprobado.

El hecho de encontrar en el presente estudio una cepa de origen canino (3<sup>CAN</sup>) que fue positiva para los oligos de humanos puede ser debido a la inespecificidad de los oligonucleótidos usados o al efecto de la transmisión de microorganismos entre diversos hospederos estrechamente relacionados; lo cual puede ser debido al tomar en cuenta que las muestras de perro fueron obtenidas de animales domésticos; en contacto directo con humanos. Tanto la baja sensibilidad como la transmisión entre especies ya ha sido documentada con anterioridad (Odagiri et al. 2015; Lamendella et al. 2013; Mieszkin et al. 2010).

Aunque algunos autores han reportado niveles variables de sensibilidad para los diversos marcadores de *Bacteroidales* específicos para humanos, el HF183 ha sido el más estudiado, mostrando en algunos casos especificidad reducida y amplificación cruzada con muestras de heces de perros, gatos y otros animales (Kildare et al. 2007, Okabe et al. 2007 y Layton et al. 2006). Lo anterior resalta la importancia de la validación de los oligonucleótidos a utilizar en cada estudio (Harwood et al. 2014; McLain et al. 2009). Otra opción propuesta ha sido utilizar los oligonucleótidos diseñados para amplificar un gen constitutivo (*gyrB*) de *B. fragilis* que es una cepa altamente adaptada al humano con lo que podrían evitarse los falsos

positivos y comportarse como un buen indicador en MST, sin embargo presenta baja sensibilidad (110 UFC); pero, tomando en cuenta que la abundancia de esta especie en heces humanas puede ascender a  $10^6$ - $10^8$ , se presume pueda compensarse la baja sensibilidad (Lee y Lee 2010). Se ha establecido que existen una correlación positiva de la presencia de *Bacteroidales* de origen humano con presencia de *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp en muestras de agua (Walters et al. 2007). De ahí la importancia de la identificación de estos marcadores.

Los marcadores específicos para *Bacteroidales* de cerdos han demostrado buen comportamiento en MST, debido a su sensibilidad, especificidad, la ausencia de falsos positivos, así como a la correlación con serotipos de *Salmonella* spp en muestras de agua (Jokinen et al. 2010; Mieszkin et al. 2009a). Los oligonucleótidos Pig1 Bac y Pig 2 Bac empleados en este trabajo han mostrado 100% de sensibilidad y 98-100% de especificidad en muestras de heces; incluso se ha demostrado que el segundo marcador fue más sensible a concentraciones bajas identificando 62.5% de las muestras problema contra 25% registrado por Pig 1 Bac. (Mieszkin et al. 2009b).

En otro estudio, trabajando con los mismos marcadores, se detectó 13-17% de su presencia en muestras de agua (Heaney et al. 2015), al analizarse por PCR punto final, sin embargo, es probable que este número se incrementara si se hubiera utilizado qPCR (Mieszkin et al. 2009b).

Las dos cepas de *Bacteroides* de origen porcino que se aislaron en este trabajo (14<sup>PIG</sup> y 15<sup>PIG</sup>) son ejemplo de la especificidad de especie, por lo que pueden ser considerados buenos indicadores de contaminación fecal y refuerzan su utilización en MST (Harwood et al. 2014; Chakravorty et al. 2007; Bäckhed et al. 2005).

La importancia de obtener marcadores específicos para bovinos o rumiantes, radica en que estos son importantes reservorios de patógenos como *C. parvum*, *E. coli* O157:H7 y con ambos se ha correlacionado con un aumento de entre 10 y 37 veces la posibilidad de encontrar patógenos, por lo que además de servir como indicador de MST, también se puede emplear para realizar análisis de riesgo (Walters et al. 2007). Se ha reportado que la presencia del marcador específico para *Bacteroidales* de rumiantes (CF128) mostró 12 veces más la probabilidad de que la

muestra de agua tuviera a *Salmonella* spp (Fremaux et al. 2009). De tal suerte que en conjunto con las heces de humano, las bovinas se consideran las de mayor importancia en términos de análisis de riesgo (Jokinen et al. 2010).

Los oligonucleótidos para el marcador de *Bacteroidales* bovinos (que se utilizaron en este estudio) mostraron >95% de similitud con una cepa de *Bacteroides* no cultivables obtenida de heces de bovinos; sin embargo también se ha reportado una elevada homología con cepas cultivables y no cultivables de diversos orígenes tales como venados u otros animales con similares hábitos alimenticios o condiciones (Harwood et al. 2014), por lo que no es raro haber obtenido cepas que presentaran reacción cruzada con este marcador (Layton et al. 2006). En este trabajo se aislaron 2 cepas de rumiantes (26<sup>GOA</sup> y 28<sup>COW</sup>) que dieron reacción positiva con los oligonucleótidos utilizados. Estos resultados cruzados pudieran deberse a la transmisión de cepas de *Bacteroidales* entre especies que coexisten en un mismo hábitat, o bien que la dieta y otras condiciones jueguen un papel en la adaptación de las cepas a dichos hospederos. En tal caso, muchos de estos marcadores más que ser reconocidos como marcadores para bovinos, podrían ser referidos como marcadores para rumiantes o herbívoros (Tambao et al. 2012; Kildare et al. 2007; Layton et al. 2006).

A pesar de que los marcadores para *Bacteroidales* específicos de perro no han sido ampliamente evaluados, los iniciadores utilizados en este estudio han sido evaluados previamente (Silkie y Nelson, 2009), reportando incluso que fue el menos específico de los que , con reacciones cruzadas de mas del 50% de los casos (17 de 30) en muestras de heces de gansos, de equinos y de aguas residuales y con sensibilidad del 63 y especificidad del 57% (Kildare et al. 2007), por lo que su aplicación para fines de MST puede ser cuestionable. El comportamiento observado pudiera deberse a que los oligonucleótidos seleccionados han mostrado homología de hasta 100% con secuencias de cepas de origen humano.

A pesar de lo anterior, se decidió incluirlos en el estudio sin embargo, las muestras analizadas no dieron resultados positivos. Este resultado no es sorprendente, ya que con anterioridad se ha señalado el hecho de que muchas de las

cepas de *Bacteroides* son consideradas incultivables (Harwood et al. 2014; Jofre et al. 2014; Mienszkin et al. 2010; Kildare et al. 2007 Bäckhed et al. 2005).

Cuando se realizaron los ensayos de detección de *Bacteroidales* por qPCR, los valores de  $R^2$  obtenidos en las curvas de estandarización en el presente estudio para cada uno de los marcadores, son similares a los reportados por Kildare y colaboradores (2007), quienes señalan que valores superiores a 0.95 son compatibles con una buena linealidad en la prueba; por lo que al conseguirse valores de 0.96 a 0.98 se puede asumir que se presentará un buen comportamiento en la amplificación de los templados sometidos a qPCR.

En el presente estudio se obtuvieron límites de detección equivalentes a  $2.5 \times 10^5$  a  $2.8 \times 10^5$  logGEC por reacción, lo que equivale a valores estimados de 9 y 26 UFC, lo cual coincide con los reportado por Green y colaboradores (2011) quienes obtuvieron  $10^1$ - $10^2$  logGEC para diversos marcadores universales de *Bacteroidales*. Sin embargo, otros autores han mostrado límites de sensibilidad mucho mas elevados, de  $5.6 \times 10^4$  GEC/100ml (Dick et al. 2010). Se ha reportado que los límites de detección pueden variar dependiendo del tipo de muestra de la que provenía el DNA (Mieszkin et al. 2009b). Ravaliya y colaboradores (2014) reportaron límites de detección 2.3 y 2.9 logGEC/100ml para *Bacteroidales* totales y de humanos, que fue mas bajo para el marcador de humanos y similar para *Bacteroidales* totales que lo obtenido en el presente estudio. El único reporte de LOD y LOQ que no coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es el desarrollado por Kildare y colaboradores (2007); pero su metodología es distinta a la aplicada en los experimentos de este estudio.

Una de las ventajas de la utilización de FIB en la detección de contaminación fecal es la relativa sencillez de su aislamiento y cuantificación, además de que las tasas de supervivencia en ambiente y durante el transporte, así como su correlación con agentes patógenos están relativamente estudiadas; sin embargo como desventaja se encuentra que no permiten identificar fuentes específicas de contaminación, por la capacidad de estos microorganismos de habitar varios hospederos y permanecer y multiplicarse en el medio ambiente (Harwood et al. 2014; Schriewer et al. 2010; Colford et al. 2007; Field y Samadpour, 2007).

Los resultados obtenidos cuando se contaminaron los filtros y corchos sugieren que las FIB siguen una tendencia a disminuir conforme a tiempo. No obstante, varios autores han señalado que ese efecto puede ser debido en parte a la muerte celular o bien por la capacidad de las células de entrar en estado viable pero no cultivable, lo que puede conducir a reportar resultados falsos negativos, de ser éste el único indicador evaluado (Symonds et al. 2017; Krolik et al. 2016; Desmarais et al, 2002). Éste efecto puede ser tan importante ya que se ha reportado que en algunos casos las variables ambientales pueden inducir una recuperación menor al 1% por métodos cultivables lo cual tendría como efecto la subestimación de los valores reales de contaminación señalada por las FIB (Baumgartner et al. 2015).

El efecto de las variables evaluadas en el presente estudio en la persistencia de las FIB ya ha sido documentado por otros estudios como el de Tiefenthaler y colaboradores (2009), quienes encontraron que la temperatura de la muestra de agua, influyó en la persistencia de los indicadores tradicionales tales como *E. coli* y *E. faecalis*. Adicionalmente los indicadores tradicionales de contaminación fecal presentan un dinamismo muy variado y por ende, tasas de persistencia variables, incluso entre condiciones ambientales muy similares (Wanjugi et al. 2016).

La persistencia y tolerancia de las cepas de *Enterococcus* spp., se ha documentado, estableciendo que posee habilidad de formar biopelículas en superficies bióticas o abióticas, lo que a su vez le permite soportar condiciones adversas en el medio y persistir por períodos prolongados superiores a 28 días en condiciones de desecación, radiación UV, variaciones en la temperatura, entre otros (Balzer et al. 2010).

Además de las características ya mencionadas sobre las FIB, es deseable que el microorganismo a monitorear no tenga la capacidad de crecer y multiplicarse en el medio ambiente, ya que de esta forma se puede obtener resultados falsos positivos producto de la multiplicación de los microorganismos (Field y Samadpour 2007). En el presente trabajo se encontró que *Enterococcus* spp. presentó tasas de decaimiento más lentas que *E. coli*, lo cual concuerda con lo reportado previamente (Savichtcheva y Okabe, 2006; Arcos et al. 2005).



En los experimentos realizados sobre las superficies vegetales, los FIB estudiados registraron un comportamiento aleatorio y una clara tendencia a crecer. El crecimiento de los microorganismos en la superficie de vegetales ha sido reportado (Haller et al. 2009; Butler et al. 2016). Este comportamiento de las FIB se puede deber al elevado contenido de humedad en la superficie y la disponibilidad de nutrientes y materia orgánica. Adicionalmente, la carga estática de la superficie suele tener un papel favorecedor en la proliferación microbiana, además de su persistencia (Torres et al. 2016).

Un comportamiento similar se ha reportado en agua y sedimentos de río esterilizados y contaminados artificialmente, en estos casos la materia orgánica presente en las muestras sirvió tanto de sustrato para la multiplicación microbiana, como de reservorio para la persistencia (Badgley et al. 2011).

Por todo lo anterior se considera que la enumeración de indicadores tradicionales no debe ser utilizada como único indicador de contaminación fecal (Symonds et al. 2017; Krolik et al. 2016). Adicionalmente, las FIB no sirven como indicadores para MST, por lo que no se pueden utilizar para realizar análisis de riesgo, ni para la implementación de estrategias específicamente dirigidas al control de una fuente específica de contaminación (Krolik et al. 2016; Mattioli et al. 2016; Orlofsky et al. 2016; Staley et al. 2016).

Los brotes de ETAs asociados a vegetales frescos o productos listos para su consumo han sido provocados por una amplia gama de patógenos y en donde existen diversas fuentes de contaminación (humanos, ambientales y/o animales), por lo que resulta muy importante conocer el origen de la contaminación, con la finalidad de implementar estrategias de prevención y/o control efectivas. Para este fin, los microorganismos del orden de los *Bacteroidales* han sido propuestos y estudiados, demostrando ser una de las herramientas más promisorias para tal fin (Krolik et al. 2016; Odagiri et al. 2015; Castro et al. 2016; Rivera y Rock 2013).

Dada su naturaleza anaerobia, se sabe que la mayoría de los *Bacteroidales* no sobreviven en el ambiente, aunque se han identificado algunas cepas de *B. fragilis* que pueden incluso multiplicarse a concentraciones bajas de oxígeno; sin embargo,

DNA puede persistir en el ambiente en niveles detectables por varios días e incluso semanas (Gómez et al. 2016; Odagiri et al. 2015; Saunders et al. 2009).

Cada vez son más los reportes que señalan que los marcadores para *Bacteroidales* específicos de especie son un buen indicador para MST y en general han mostrado cumplir con la mayoría de las características deseables para ser reconocidos como un buen indicador de contaminación fecal. Además, algunos *Bacteroidales* muestra correlación con las FIB, persistiendo por períodos de tiempo más prolongados y a menor concentración (Ahmed et al. 2016; McQuaig et al. 2012). Adicionalmente las técnicas de biología molecular son más sensibles y específicas que las técnicas convencionales de aislamiento y enumeración de FIB; además de ser menos laboriosas y reducir el tiempo de procesamiento de muestras, permitiendo obtener resultados confiables en tiempos tan cortos como 3-4 h; lo que posibilita la toma de decisiones y acciones correctivas inmediatas (Rivera y Rock 2013; Dick y Fiel 2004).

El comportamiento de *B. thetaiotamicron* comparado con el comportamiento de las FIB, fue semejante al previamente reportado por Wanjugu y colaboradores (2016); siendo más constantes que los indicadores tradicionales. No obstante, también se ha reportado variabilidad en el número de copias genómicas determinadas en diferentes muestras, tal como se encontró en el presente trabajo, sugiriendo que hacen falta más estudios del comportamiento y dinamismo que presentan los marcadores durante su exposición a diversos factores o variables (Stapleton et al. 2009), tales como la falta de correlación con las FIB, variaciones temporales en el número de copias genómicas y la proporción de los marcadores especie-específicos (Wanjugu et al. 2016; Jokinen et al. 2010; Fremaux et al. 2009).

El presente trabajo se realizó en condiciones más controladas que las utilizadas en reportes previos y pudiera ser se haya reducido el efecto del dinamismo de un sistema abierto y la depredación por bacterias y protozoarios acompañantes (Mattioli et al. 2016; Korajkic et al. 2014), que han sido propuestos como factores que influyen en la tasa de decaimiento de los marcadores para *Bacteroidales* (Torres et al. 2016; Rivera y Rock 2013; Savichtcheva y Okabe 2006).

En un estudio en condiciones controladas como el presente trabajo, empleando agua inoculada artificialmente con *B. vulgatus* se demostró que la recuperación de las células en cultivo solo se pudo realizar en las 24 h posteriores a la inoculación; sin embargo, se logró demostrar que las células aún permanecían intactas durante los primeros 20 días del experimento y la concentración del gen RNA 16S también se mantuvo estable y posteriormente empezó a decrecer de manera uniforme en el caso del agua convencional, en tanto que en agua estéril permaneció hasta por 200 días (Saunders et al. 2009). Esta observación permitió explicar la persistencia del marcador universal durante los 25 días en los ensayos preliminares y de los marcadores (general y especie-específico) utilizados en los ensayos de contaminación de filtros, corchos y vegetales.

Existen un reportes en donde se ha señalado un decaimiento acelerado de los marcadores de *Bacteroidales*; sin embargo, en ese reporte se analizaron heces en almacenamiento que pudiera estar influenciada por las poblaciones microbianas existentes y por las técnicas basadas a la detección de DNA de células vivas o RNA (Bae y Wuertz 2015; Rogers et al. 2011).

Con la técnica utilizada en el presente trabajo solo fue posible identificar el número de copias genómicas sin poder diferenciar entre DNA libre en las muestras, proveniente de células muertas o DNA intacto de células metabólicamente activas. Sin embargo, para minimizar este aspecto se ha reportado que la adición de monoazida de propidio, permite diferenciar el DNA “desnudo” del obtenido de células intactas. Además señalaron que el decaimiento de *Bacteroidales* (universal, de humano, de bovino y de perro), es más acelerado cuando se toma en cuenta de solamente al DNA de células intactas y parece afectarse por factores como la temperatura, la salinidad de la muestra y otras variables ambientales estudiadas (Bae y Wuertz 2015, 2009).

Existen reportes en donde se realiza precipitación y recuperación de los ácidos nucleicos directamentes de muestras de heces o agua tratada, o mediante sistemas de filtración para concentrar la muestra (Sokolova et al. 2012; Walters y Field 2009, Ravaliya et al. 2014; Layton et al. 2006 y el presente estudio). Sin embargo, mediante esta filtración el DNA tanto del interior celular como el libre, se

pudiera quedar atrapados en la membrana, lo que podría contribuir a la variabilidad en las copias genómicas determinadas (Bae y Wertz 2015), tal como se observó en este trabajo.

Se ha establecido que un incremento en la temperatura puede disminuir en la persistencia de los marcadores universal, humano y porcino (Heaney et al. 2015; Savichtcheva y Okabe 2006) y que su persistencia en sistemas controlados parece ser más constante y seguir una tendencia a decaer de forma más lenta (Green et al. 2011) tal como se observó en el presente trabajo y lo reportado por otros autores (Gourmelon et al. 2010; Solecki et al. 2011).

Liu y colaboradores (2017) y Mika y colaboradores (2017) obtuvieron resultados similares a los encontrados en el presente trabajo, sugiriendo que marcadores para *Bacteroidales* pueden ser utilizados como una herramienta para evaluar contaminación fecal en aguas frescas y de contaminación pasada; sirviendo incluso como indicadores de contaminación fecal en condiciones en que las FIB puedan ser poco concluyentes; como es el caso de matrices con contaminación añeja.

Queda claro que en el presente trabajo se seleccionaron cepas con un comportamiento idóneo (que amplifiquen únicamente con los marcadores universal y específico), con la finalidad de eliminar las diversas variables que pudieran tener un efecto en los resultados obtenidos; pero ello a su vez puede limitar algunas conclusiones al respecto, toda vez que los resultados solo reflejan la persistencia de una cepa de cada tipo. Sin embargo, dada la variabilidad de las cepas y el diferente comportamiento de cada uno de los marcadores específicos, es preciso hacer evaluaciones integrales que reflejen el comportamiento tanto en variabilidad del marcador en cada hospedero, como al efecto de las condiciones ambientales y el efecto en la persistencia de cada uno de los marcadores general y específicos (Lamendella et al. 2013; Dorai-Raj et al. 2011). Además, resultaría importante validar otros oligonucleótidos con la finalidad de determinar tanto la sensibilidad, como la especificidad de los mismos y seleccionar los idóneos para las condiciones a emplearlos. Adicionalmente verificar el comportamiento en persistencia que los marcadores obtenidos de las cepas en el presente trabajo (Liang et al. 2017; Mieszkin et al. 2009a).

## XI. CONCLUSIONES

- 1) Se aislaron cinco cepas que amplificaron únicamente con el marcador AllBac y el específico de especie: para el marcador humano 3<sup>DOG</sup>; para el marcador de bovino, 26<sup>GOA</sup> y la 28<sup>COW</sup> y para el marcador de porcino, 14<sup>PIG</sup> y 15<sup>PIG</sup>.
- 2) Los límites de detección obtenidos para al utilizar los marcadores de *Bacteroidales* fueron de 9 UFC para el marcador humano y 26 UFC para el resto de los marcadores.
- 3) El marcador universal de *Bacteroidales* persistió durante 25 días de almacenamiento de los filtros y corchos, en niveles equivalentes a  $4.04 \pm 0.53$  logUFC/ml.
- 4) La textura de la superficie, condiciones de almacenamiento y tipo de heces influyeron en la persistencia de la FIB; no así para los *Bacteroidales*.
- 5) La humedad de almacenamiento fue la condición que influyó más en el decaimiento de las FIB.
- 6) El tipo de vegetal fue el factor que mayor influencia ejerció en la recuperación de las FIB; sin afectar la persistencia de los *Bacteroidales*.
- 7) Los marcadores universal y específicos evaluados persistieron en valores similares sin efecto aparente del resto de las variables evaluadas.
- 8) Los marcadores universal y específicos para *Bacteroidales* persistieron en todas las superficies analizadas de manera más constante que las FIB.

## XII. PERSPECTIVAS

A pesar de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante señalar que las nuevas técnicas de rastreadores de la fuente de contaminación deben continuar bajo evaluación y seleccionar las mejores con base en su comportamiento en la práctica para poder implementar programas que permitan diseñar estrategias integrales y dirigidas para disminuir el impacto de la contaminación fecal en el agua, en los alimentos y en la salud pública.

No obstante; los resultados obtenidos ratifican a los *Bacteroidales* como una buena herramienta para realizar MST y acorde a lo propuesto por varios grupos de investigación, es probable que se requieran incluir más técnicas para poder discriminar correctamente entre las diversas fuentes de contaminación, con el fin de hacer análisis más precisos.

De igual forma es probable que se requiera la validación y/o diseño de nuevos oligonucleótidos con un mejor comportamiento; así como probar la persistencia de los marcadores en diversas matrices para poder traspolar su aplicación a diversos modelos de alimentos; tal como se verificó en el presente trabajo.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed W, Sidhu JPS, Smith K, Beale DJ, Gyawali P, Tose S. 2016. Distributions of Fecal Markers in Wastewater from Different Climatic Zones from Human Fecal Pollution Tracking in Australian Surface Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 82:1316-1323.

Ahmed W, Goonetilleke A, Powell D, Gardner T. 2009. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroidales* PCR markers for sewage pollution tracking. *Water Research*. 43:4872-4877.

Ahn Y, Stuckey R, Sung K, Rafii F, Cerniglia C. 2013. Influence of Sterilized Human Fecal Extract on the Sensitivity of *Salmonella enterica* ATCC 1376 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 to Enrofloxacin. *Antibiotics*. 2:485-499.

Arcos PMdP, Avila deNSL, Estupiñán TSM, Gómez PAC. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA-Publicación Científica*. 3:69-79.

Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. 2001. World Health Organization. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Indicators of microbial quality water. Chapter 13. IW Publishing, London, United Kingdom.

Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. 2005. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3041-3048.

Atlas RM. 2004. *Handbook of Microbiological Media*. 3ed. CRC Press. P.257.

Bacic MK, Smith CJ. 2008. Laboratory Maintenance and Cultivation of *Bacteroides* Species. *Current Protocols in Microbiology*. DOI: [10.1002/9780471729259.mc13c01s9](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc13c01s9).

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*. 307:1915-1920.

Badgley BD, Thomas FI, Harwood VJ. 2011. Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environmental Microbiology*. 13:932-942.

Bae S, Wuertz S. 2015. Decay of host-associated *Bacteroidales* cells and DNA in continuous-flow freshwater and seawater microcosms of identical experimental design and temperature as measured by PMA-qPCR and qPCR. *Water Research* 70:205-213.

Bae S, Wuertz S. 2012. Survival of Host-Associated *Bacteroidales* Cells and Their Relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* enterica Serovar *Typhimurium*, and Adenovirus in Freshwater Microcosms as Measured by Propidium Monoazide-Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 78:922-932.

Bae S, Wuertz S. 2009. Rapid decay of host-specific fecal *Bacteroidales* cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. 2009. *Water Research*. 43:4850-4859.

Ballesté E, Bonjoch X, Balanche LA, Blanch AR. 2010. Molecular Indicators Used in the Development of Predictive Models for Microbial Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1789-1795.

Balzer M, Witt N, Flemming HC, Wingerder J. 2010. Fecal indicator bacteria in river biofilm. *Water Science and Technology*. 61.5:1105-1111.

Baumgartner A, Diston D, Niederhauser I, Felleisen R. 2015. Using flow cytometry and *Bacteroidales* 16S rRNA marker to study the hygienic quality of source water. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. DOI: 10.1007/s00003-015-1007-z

Bradshaw JK, Snyder BJ, Oladeinde A, Spidle D, Berrang ME, Meinersmann RJ, Oakley B, Sidle RC, Sullivan K, Molina M. 2016. Characterizing relationships among fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and associated waterborne pathogen occurrence in stream water and sediments in a mixed land use watershed. *Water Research*. DOI: 10.1016/j.watres.2016.05.014.

Butler AJ, Pintar KDM, Thomas MK. 2016. Estimating the Relative Role of Various Subcategories of Food, Water, and Animal Contact Transmission of 28 Enteric Diseases in Canada. *Foodborne Pathogens and Disease* 13:57-64.

Callejón RM, Rodríguez NMI, Ubeda C, Hornedo OR, Garcia PM, Troncoso AM. 2015. Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United



States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease* 12:32-38.

Castro II, Gil MI, Allende A. 2016. Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT-Food Science and Technology*. DOI; <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.073>.

Cerda AMM, Montero CME. 2002. Manual de manejo poscosecha de tomate. Ministerio de Agricultura y Ganadería/Escuela de Ingeniería Agrícola, Universidad de Costa Rica. <On line> Disponible en: [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec-poscosecha-tomate.html](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-poscosecha-tomate.html)

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Allad D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 39:330-339.

Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenailon O, Denamur E. 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology* 10(4):1000-1006.

Colford JM, Wade TJ, Schiff KC. 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology* 18: 27-35.

Conrad CC, Stanford K, Narvaez BC, Callaway T, McAllister T. 2017. Farm Fairs and Petting Zoos: A review of Animal Contact as a Source of Zoonotic Enteric Disease. *Foodborne Pathogens and Disease* 14:59-73.

Converse RR, Blackwood AD, Kirs M, Griffith JF, Noble RT. 2009. Rapid qPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp. as a tool for assessing fecal contamination in recreational waters. *Water Research*. 43:4828-4837.

Desmarais TR, Solo GHM, Palmer CJ. 2002. Influence of soil on Fecal Indicator Organisms in a Tidally Influenced Subtropical Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1165-1172.

Dick LK, Field KG. 2004. Rapid Estimation of Numbers of Fecal *Bacteroidetes* by Use of a Quantitative PCR Assay for 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5695-5697.

Dick LK, Stelzer EA, Bertke EE, Fong DL, Stoeckel DM. 2010. Relative decay of *Bacteroidales* Microbial Source Tracking markers and cultivated *Escherichia coli* in freshwater microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:3255-3262.

Dorai-Raj S, O'Grady J, Cormican M, Colleran E. 2011. Identification of host-specific *Bacteroidales* 16S rDNA sequences from human sewage and ruminant feces. *Journal of Basic Microbiology*. 51:1-8.

Dubois E, Hennechart C, Merle G, Burger C, Hmila N, Ruelle S, Perelle S, Ferré V. 2007. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: Characterization of the method performances. *International Journal of Food Microbiology*. 117:141-149.

EPA United States Environmental Protection Agency. 2010. Method B: *Bacteroidales* in Water by TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay. <On line> Disponible en: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method\\_b\\_2010.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_b_2010.pdf).

Fiel KG, Samadpour M. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*. 41:3517-3538.

Fremaux B, Gritzfeld J, Boa T, Yost CK. 2009. Evaluation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a pairie watershed. *Water Research*. 43:4838-4849.

Fries JS, Characklis GW, Noble RT. 2006. Attachment of Fecal Indicator Bacteria to Particles in the Neuse River Estuary, N.C. *Journal of Environmental Engineering*. 132:138-1345.

García AJS. 2014. Análisis del Gene ARNr 16S para Rastrear Fuentes de Contaminación Microbiana en Vegetales. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* 18(1):4-6.

Gómez DM, Casanovas MA, Muniesa M, Blanch ER. 2016. Development of new host-specific *Bacteroides* qPCRs for the identification of fecal contamination sources in water. *Microbiology Open* 5:83-94.

Gourmelon M, Caprais MP, Mieszkin S, Marti R, Wéry N, Jardé E, Derrien M, Jadas HA, Communal PY, Jaffrezic A, Pourcher AM. 2010. Development of microbial and chemical MST tool to identify the origin of the fecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Research*. 44:4812-4824.

Green HC, Shanks OC, Sivaganesan M, Haugland RA, Field KG. 2011. Differential decay of human fecal *Bacteroides* in marine and freshwater. *Environmental Microbiology* 13(12):3235-3249.

Haller L, Amedegnato E, Poté J, Wildi W. 2009. Influence of Freshwater Sediment Characteristics on Persistence of Fecal Indicator Bacteria. *Water, Air and Soil Pollution*. 203:217-227.

Haugland RA, Varma M, Sivaganesan M, Kelty C, Peed L, Shanks OC. 2010. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and fecal waste by qPCR. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:348-357.

Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic . 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiology Reviews*. 38:1-40.

Heaney CD, Myers K, Wing S, Hall D, Baron D, Stewart JR. 2015. Source tracking swine fecal waste in surface water proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Science of the Total Environment*. 511:676-683.

Heredia N, Solís SL, Venegas F, Bartz FE, Fabiszewski de AA, Jaykus LA, León JS, García S. 2015. Validation of a Novel Rinse and Filtration Method for Efficient Processing of Fresh Produce Samples for Microbiological Indicator Enumeration. *Journal of Food Protection*. 78(3):525-530.

Hernández LG. 2017. Uso de *Bacteroidales* como rastreador de fuente de contaminación fecal en fresa y tomate contaminados artificialmente. Tesis de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

INVITROGEN. 2014. TOPO®TA Cloning® Kit for Sequencing. User Guide. <On line> Disponible en:

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)

Jofre J, Blanch AR, Lucena F, Muniesa M. 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Research*. 55:1-11.

Jokinen, Schreier H, Mauro W, Taboada E, Isaac RJL, Topp E, Edge T, Thomas JE, Gannon VPJ. 2010. The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *Journal of Water and Health* 8:374:386.

Kapoor V, Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Wendell D, Santo Domingo JW. 2015. Distribution of Human-Specific *Bacteroidales* and Fecal Indicator Bacteria in an Urban Watershed Impacted by Sewage Pollution, Determined Using RNA- and DNA-Based Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 81:91-99.

Kildare BJ, Leutenegger CM, McSwain BS, Banbic DG, Rajal VB, Wuertz S. 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Research* 41:3701-3715.

Korajkic A, McMinn BR, Shanks OC, Sivaganesan M, Fout GS, Ashbolt NJ. 2014. Biotic Interactions and Sunlight Affect Persistence of Fecal Indicator Bacteria and Microbial Source Tracking Genetic Markers in the Upper Mississippi River. *Applied and Environmental Microbiology* 80:3952-3961.

Krolik J, Maier A, Thompson S, Majury A. 2016. Microbial source tracking of private well water samples across at-risk regions in southern Ontario and analysis of traditional fecal indicator bacteria assay including culture and qPCR. *Journal of Water and Health* 14:1047-1058.

Lamendella R, Li, KC, Oerther D Santo Domingo JW. 2013. Molecular Diversity of *Bacteroidales* in Fecal and Environmental Samples and Swine-Associated Subpopulations. *Applied and Environmental Microbiology* 79:816-824.

Layton A, McKey L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Sayler G. 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays

for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6):4214-4224.

Lee CS, Lee J. 2010. Evaluation of new *gyrB*-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human-specific fecal contamination. *Journal of Microbiological Methods*. 82:311-318.

Lee DY, Weir SC, Lee H, Trevors JT. 2010. Quantitative identification of fecal water pollution sources by TapMan real-time PCR assays using *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88:1373-1883.

León GF. 2007. Guía práctica de manejo de melón cantaloupe cultivado en suelo, bajo condiciones de invernadero en el Campus de la UAQ en Amazcala. Tesis de especialidad en Ingeniería de Invernaderos. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro.

León SJ, Lee AJ, Moe CL. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: *Microbiologically safe foods*. Heredia N, Wesley I and García S (eds). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States.

Leonard M, Gilpin B, Robson B, Wall K. 2016. Field study of the composition of greywater and comparison of microbiological indicator of water quality in on-site systems. *Environmental Monitoring and Assessment* 188:475. DOI: 10.1007/s10661-016-5442-9.

Liang L, Goh SG, Gin KYH. 2017. Decay kinetics of microbial source tracking (MST) markers and human adenovirus under the effects of sunlight and salinity. *Science of the Total Environment* 574:165-175.

Liu R, Yeung LT, Ho PH, Lau SC. 2017. Tracking the relative concentration between *Bacteroidales* DNA markers and culturable *Escherichia coli* in fecally polluted subtropical seawater: potential use in differentiating fresh and aged pollution. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(3):252-259.

Mangels JI, Douglas BP. 1989. Comparison of Four Commercial *Brucella* Agar Media for Growth of Anaerobic Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(10):2268-2271.

McLain JET, Ryu H, Kabiri-Badr L, Rock CM, Abbaszadegan M. 2009. Lack of specificity for PCR assays targeting human *Bacteroides* 16S rRNA gene: cross-amplification with fish feces. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters. 299:38-43.

McQuaig S, Griffith J, Harwood VJ. 2012. Association of Fecal Indicator Bacteria with Human Viruses and Microbial Source Tracking Markers at Coastal Beaches Impacted by Nonpoint Source Pollution. Applied and Environmental Microbiology 78:6423-6432.

McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. 2009. Quantification of Human Polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan Quantitative PCR and Comparison to Other Water Quality Indicators in Water and Fecal Samples. Applied and Environmental Microbiology 75:3379-3388.

Mieszkin S, Yala JF, Joubrel R, Gourmelon M. 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology. 108:974-984.

Mieszkin S, Furet JP, Corthie G, Pommepeuy M, Le Saux JC, Bougeard M, Hervio HD, Gourmelo M. 2009a. Discrimination between human, pig and ruminante faecal contaminations in river catchment by real-time PCR using host-specific markers. ICMSS09-Nantes, France. Junio del 2009. <On line> Disponible en: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00021/13259/10306.pdf>

Mieszkin S, Furet JP, Corthier G, Goumelon M. 2009b. Estimation of Pig Fecal Contamination in a River Catchment by Real-Time PCR Using Two Pig-Specific *Bacteroidales* 16S rRNA Genetic Markers. Applied and Environmental Microbiology 75:3045-3054.

Mika KB, Chavarria KA, Imamura G, Tang C, Torres R, Jay JA. 2017. Sources and Persistence of Fecal Indicator Bacteria and *Bacteroidales* in Sand as Measured by Culture-Based and Culture-Independent Methods: a Case Study at Santa Monica Pier, California. Water, Air, and Soil Pollution. DOI: [10.1007/s11270-017-3291-y](https://doi.org/10.1007/s11270-017-3291-y).

NOM-113-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. <On line> Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>.

Odagiri M, Schriewer A, Hanley K, Wuertz S, Misra PR, Panigrahi P, Jenkins MW. 2015. Validation of *Bacteroidales* quantitative PCR assays targeting human and animals fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Science of the Total Environment* 502:462-470.

Okabe S, Okayama N, Savichtcheva O, Ito T. 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:890-901.

Olaimat AN, Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology* 32:1-19.

Orlofsky E, Bernstein N, Sacks M, Vonshak A, Benami M, Kundu A, Maki M, Smith W, Wuertz S, Shapiro K, Gillor O. 2016. Comparable levels of microbial contamination in soil and on tomato crops after drip irrigation with treated wastewater or potable water. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 215:140-150.

Ravaliya K, Gentry-Shields J, Santos G, Heredia N, Fabiszewski AdA, Faith EB, Leon JS, Jaykusa LA. 2014. Use of *Bacteroidales* Microbial Source Tracking To Monitor Fecal Contamination in Fresh Produce Production. *Applied and Environmental Microbiology* 80(2):612-617.

Rivera B y Rock C. 2013. Seguimiento de Origen Microbiano: Caracterización de Ciencias e Identificación de Origen. College of Agriculture and Life Sciences. The University of Arizona Cooperative Extension. 85721. AZ1547S, Julio de 2013.

Rodicio MR, Mendoza MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22:238-245.

Rogers SW, Donnelly M, Peed L, Kelty CA, Mondal S, Zhong Z, Shanks OC. 2011. Decay of Bacterial Pathogens, Fecal Indicators, and Real-Time

Quantitative PCR Genetic Markers in Manure-Amended Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(14):4839-4848.

SAGARPA. 2010. Monografía de cultivos: Jitomate. Secretaría de Fomento a los Agronegocios. <On line> Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América.

Saunders AM, Kristiansen A, Lund MB, Revsbech NP, Schramm A. 2009. Detection and persistence of Fecal *Bacteroidales* as water quality indicators in unchlorinated drinking water. *Systematic and Applied Microbiology*. 32:363-370.

Savichtcheva O, Okabe S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40:2463-2476.

Schriewer A, Miller WA, Byrne BA, Miller MA, Oates S, Conrad PA, Hardin D, Yang HH, Chouicha N, Melli A, Jessup D, Dominik C, Wuertz S. 2010. Presence of *Bacteroidales* as a Predictor of Pathogens in Surface Waters of the Central California Coast. *Applied and Environmental Microbiology* 76:5802-5814.

Secretaría de Salud. 2012. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad diarreica aguda mediante la estrategia de Núcleos Trazadores. Dirección General de Epidemiología. Septiembre 2012.

Silkie S, Nelson KL. 2009. Concentración of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Research*. 43:4860-4871.

Sokolova E, Aström, Pettersson TJR, Bergstedt O, Hermansson M. 2012. Decay of *Bacteroidales* Genetic Markers in Relation to Traditional Fecal Indicators for Water Quality Modeling of Drinking Water Sources. *Environmental Science and Technology*. 46:892-900.



Solecki O, Jeanneau L, Jardé E, Gourmelon M, Marin C, Pourcher AM. 2011. Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to fecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Research*. 45:4623-4633.

Soller JA, Schoen ME, Bartrand T, Ravenscroft JE, Ashbolt NJ. 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of fecal contamination. *Water Research* 44:4674-4691.

Stapleton CM, Kay D, Wyer MD, Davies C, Watkins J, Kay C, McDonald AT, Porter J, Gawler A. 2009. Evaluating the operational utility of a *Bacteroidales* quantitative PCR-based MST approach in determining the source of fecal indicator organisms at a UK bathing water. *Water Research*. 43:4888-4899.

Symonds EM, Young S, Verbyla ME, McQuaig USM, Ross E, Jiménez JA, Harwood VJ, Breitbart M. 2017. Microbial source tracking in shellfish harvesting waters in Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Water Research* 111:177-184.

Staley ZR, Grabuski J, Sverko E, Edge TA. 2016. Comparison of microbial and chemical source tracking markers to identify fecal contamination sources in the Humber River and associated storm outfalls. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI: [10.1128/AEM.01675-16](https://doi.org/10.1128/AEM.01675-16).

Staroscik A. 2004. Calculator for determining the number of copies of a template. <On line> Disponible en: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

Tambalo DD, Fremaux B, Boa T, Yost CK. 2012. Persistence of host-associated *Bacteroidales* gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Research*. 46:2891-2904.

Tiefenthaler LL, Stein ED, Lyon GS. 2009. Fecal indicator bacteria (FIB) levels during dry weather from Southern California reference streams. *Environmental Monitoring Assessment*. 155:477-492.

Torres AV, Manjarrez DCB, Acosta MCH, Guerrero PVM, Parra QRA, Noriega OLO, Avila QGD. 2016. Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización

Bacteriana?. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4>.

Walter SP, Fiel KJ. 2009. Survival and persistence of human and ruminant-specific faecal *Bacteroidales* in freshwater microcosms. Environmental Microbiology. 11(6):1410-1421.

Walters SP, Yamahara KM, Boehm AB. 2009. Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: implications for their use in assessing risk in recreational waters. Water Research. 43:4929-4939.

Walters SP, Gannon VPJ, Field KG. 2007. Detection of *Bacteroidales* Fecal Indicators and the Zoonotic Pathogens *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Campylobacter* in River Water.

Wanjugi P, Sivaganesan M, Korajkic A, Kelty CA, McMinn B, Ulrich R, Harwood VJ, Shanks OC. 2016. Differential decomposition of bacterial and viral fecal indicators in common human pollution types. Water Research 105:591-601.

Warriner K, Namvar A. 2010. The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. Current Opinion in Biotechnology 21:131-136.

WHO World Health Organization. 2015. Estadísticas sanitarias mundiales 2014, una mina de información sobre salud pública mundial. <On line> Disponible en:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO\\_HIS\\_HSI\\_14.1\\_spa.pdf?](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO_HIS_HSI_14.1_spa.pdf?)

Wong K, Fong TT, Bubby K, Molina M. 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. Environmental International 45:151-164.

Wuerts S, Wang D, Reischer GH, Farnleitner AH. 2011. Library-Independent Bacterial Source Tracking Methods. In: Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ (eds). Springer Science and Business Media, p.p 87-89.

#### **XIV. RESUMEN BIOGRÁFICO**

Gilberto Ordaz Cervera

Candidato al Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: PERSISTENCIA DE MARCADORES PARA *Bacteroidales* COMO  
MICROORGANISMOS INDICADORES DE TRAZABILIDAD EN  
TOMATE Y MELÓN CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE

Campo de estudio: Inocuidad alimentaria.

Datos personales: Nacido en la Ciudad de Mérida, Yucatán el 26 de noviembre de 1984, hijo de los señores Gilberto Ordaz Martínez (t) y María Dolores Cervera Delgado.

Educación: Egresado del Centro de Estudios Tecnológicos de Mar N. 17, obteniendo el título de Técnico de Acuicultura y el reconocimiento de mejor promedio de la especialidad. Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista y reconocimiento al tercer mejor promedio de la licenciatura.

Testimonio de desempeño sobresaliente en el Examen General de Egreso de la Licenciatura (CENEVAL).

Experiencia profesional: Prestador de servicios en el programa “Evaluación de la pesquería de tiburón que se explota en la zona de Progreso, Yucatán”. Prestador de servicios en el proyecto “Evaluación de la calidad microbiológica de la carne de pollo que se expende en mercados y supermercados de la Ciudad de Mérida, Yucatán”. Técnico Académico y Profesor de tiempo completo de la FMVZ-UADY del años 2008 al 2015.