

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo A. C.**

**CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES E IDENTIFICACIÓN DE  
*Salmonella* spp. POR PCR EN TOMATES DE EMPAQUES  
AGRÍCOLAS Y SUPERMERCADOS.**

POR

**LUCIO DE JESÚS HERNÁNDEZ DÍAZ**

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD CULIACÁN DEL CIAD  
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS  
AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y  
SUBTROPICALES**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

CULIACÁN, SINALOA

DICIEMBRE DEL 2004

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A. C.

CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp.  
POR PCR EN TOMATES DE EMPAQUES AGRÍCOLAS Y  
SUPERMERCADOS.

POR

LUCIO DE JESÚS HERNÁNDEZ DÍAZ

CULIACÁN, SINALOA

DICIEMBRE DEL 2004

## APROBACIÓN

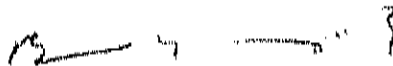
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Lucio de Jesús Hernández Díaz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Manejo Poscosecha de Frutas y Hortalizas.



---

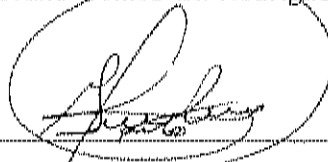
Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz

Director de Tesis



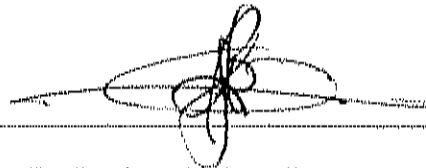
---

Dr. Bruno Gornés Gil Rodríguez Salas



---

MC. Pablo Gortáres Moroyoquí



---

Dr. Benigno Valdéz Torres

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

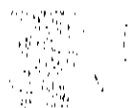
Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.

---

Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General



## DEDICATORIAS

Primeramente a dios, por darme el don de la vida y disfrutar todas las cosas buenas que nos ofrece, además de aprender de las cosas malas.

A mi esposa e hijo, por el apoyo brindado, por el impulso a seguir con mis metas y por todos los momentos felices que pasamos.

A mis padres agradezco mucho el que siempre me hayan encausado por el buen camino, además de el apoyo incondicional que de ellos recibí.

A todos mis hermanos, por todo el apoyo que ellos me brindaron y enseñarme que para conseguir algo hay que sacrificar otras cosas importantes.

A mis suegros, porque sin duda también forman parte de esta fase de mi vida porque fueron de gran ayuda para la realización y culminación de mis estudios.

A todos mis sobrinos, por brindarme su alegría en momentos difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado en la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., sobre todo a la unidad Culiacán, por las facilidades brindadas en la utilización de sus instalaciones. Gracias al Dr. Jorge Humberto Siller Cepeda, por el apoyo y entusiasmo brindado.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por contar con las palabras precisas y motivarme a seguir adelante, sobre todo su disponibilidad y confianza que siempre me brindo.

A mi comité de tesis, Dr. Bruno Gomes Gil Rodríguez Salas, Dr. Benigno Valdéz Torres y MC. Pablo Gortáez Moroyoqui. Gracias por su dirección, por el entusiasmo y disposición con que contribuyeron en mi formación.

A mis profesores de Maestría, Dr. Jorge Humberto Siller Cepeda, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, Dra. María Dolores Muy Rangel, MC. Armando Carrillo, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Raymundo García, por transmitirme sus valiosos conocimientos.

Por la ayuda brindada, agradezco a Ing. Werner Rubio, QFB, Célida Martínez, QFB, Paola Meza, personal del laboratorio de Microbiología.

A mis amigos Noelia Castro, Marcela Soto, Maribel Jiménez, Gloria Elena, Guadalupe Valero, María Elena, Elizabeth, Dalia Magaña, Víctor Arana, Javier López, Gabriel Cázarez, Raymundo Pérez, Dionisio, Andrés y Osvaldo, por brindarme su amistad, aligerando los momentos difíciles.

A todo el personal del CIAD, Culiacán. Por brindarme por lo menos una sonrisa.

## CONTENIDO

vii

	Página
INDICE DE CUADROS .....	xiv
INDICE DE FIGURAS .....	xv
RESUMEN .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	7
HIPÓTESIS .....	8
METAS .....	9
REVISIÓN DE LITERATURA .....	10
Generalidades .....	10

Buenas prácticas agrícolas .....	11
Inocuidad alimentaria .....	13
Inocuidad de frutas y hortalizas .....	14
Puntos básicos para la inocuidad de frutas y hortalizas .....	16
El tomate .....	18
Importancia económica .....	18
Familia de las enterobacterias .....	20
Enterobacterias .....	20
Características metabólicas de enterobacterias .....	20
Utilización de hidratos de carbono .....	21
Fermentación de carbohidratos y producción de ácido sulfhídrico .....	22





Reducción de nitritos .....	23
Actividad de citocromooxidasa .....	23
Microorganismos indicadores .....	23
Coliformes totales .....	25
Coliformes fecales .....	25
<i>Escherichia coli</i> .....	26
Incidencia de bacterias patógenas .....	28
<i>Salmonella</i> spp .....	29
Reacción en cadena de la polimerasa .....	35
Definición .....	35
Estructura del DNA .....	39

La proposición de Watson y Crick .....	40
Importancia de la proposición de Watson y Crick .....	41
Estudio con PCR .....	43
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>44</b>
Puntos de muestreo .....	44
Muestras .....	44
Preparación de los medios de cultivo y de enriquecimiento .....	46
Agar ECC .....	46
Rappaport-Vassiliadis .....	46
Agar Rambach .....	47
Preparación, enriquecimiento e identificación de la muestra .....	47

Identificación de <i>E. coli</i> y coliformes totales en empaques agrícolas.....	48
Identificación de <i>E. coli</i> y coliformes totales en supermercados .....	49
Identificación de <i>Salmonella</i> spp en empaques agrícolas y supermercados .....	49
Confirmación de <i>Salmonella</i> spp por PCR .....	52
Extracción del DNA .....	52
Electroforesis de comprobación .....	53
Amplificación por PCR .....	53
Electroforesis final .....	54
Fotografía .....	55
Diseño estadístico .....	55

Análisis estadístico .....	55
Análisis descriptivo .....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
Análisis de varianza .....	57
Efectos principales para coliformes totales .....	57
Efectos de interacción para coliformes totales .....	62
Resultados de <i>E. coli</i> .....	65
Resultados de <i>Salmonella</i> spp .....	68
Resultados de la comprobación por PCR .....	73
CONCLUSIONES .....	75
SUGERENCIAS .....	76

LITERATURA CITADA ..... 77

ANEXOS ..... 87

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea .....	27
2. Medios de cultivo y de enriquecimiento para las distintas técnicas de laboratorio utilizadas para los diferentes microorganismos .....	51
3. ANOVA de coliformes totales .....	59
4. Resultado de coliformes totales, expresados en $\log_{10}$ (UFC/mL) .....	63
5. Resultado de <i>E. coli</i> , presencia-ausencia .....	66
6. Incidencia de muestras positivas para <i>Salmonella</i> en supermercados .....	69
7. Incidencia de muestras positivas para <i>Salmonella</i> en empaques agrícolas..	72

**LISTA DE FIGURAS**

Figura	Página
1. Esquema que muestra los tres pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	37
2. Esquema que muestra la amplificación exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	38
3. Efectos principales; coliformes totales en supermercados y empaques agrícolas .....	60
4. Efectos principales; coliformes totales en los distintos niveles de calidad (baja, media y alta calidad) .....	61
5. Efecto de la interacción empresa-nivel de calidad para coliformes totales.	62
6. Resultado de la amplificación en el gel de agarosa .....	74

## RESUMEN

El tomate es la hortaliza de mayor consumo en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente, y con ello el riesgo de infecciones gastro-intestinales debido a la presencia de bacterias patógenas en fruto de tomate, es por ello que uno de los principales retos es identificar y disminuir o inclusive eliminar a los microorganismos que se encuentra como contaminantes del mismo, sobre todo aquellos que implican un riesgo a la salud pública, como lo es *Salmonella* spp y conformes. Este grupo bacteriano incluyen patógenos oportunistas que incluyen bacterias oportunistas (*Klebsiella pneumoniae*) y profesionales (*E. coli*). En los últimos años *Salmonella enterica* se ha relacionado con brotes debido al consumo de frutas y verduras. El principal objetivo de esta investigación fue cuantificar la presencia de coliformes totales e identificar las especies de *E. coli* y a miembros del genero *Salmonella* en tomate de empaques agrícolas y de supermercados de la ciudad de Culiacán, Sinaloa. La investigación se realizó dividiendo en tres niveles de calidad (alto, medio y bajo) tanto a supermercados como empaques agrícolas. Tomando como referencia el Manual de Buenas Prácticas Agrícolas, elaborado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. para el caso de empaques agrícolas; y para supermercados se basó en la infraestructura de lugar, limpieza, diseño arquitectónico, acomodo del fruto, higiene y vestimenta de sus trabajadores. Se llevaron a cabo 8 muestreos a cada nivel de empresa (Empaque agrícola y supermercado) resultando un total de 48 muestreos. Se seleccionaron 3 o 4 tomates por muestra con



peso total aproximado de 300 g. Se enjuagaron en 300 mL de agua purificada estéril, agitándose por dos minutos, se empleo la técnica de filtración por membrana para empaques agrícolas y extensión en placa en muestras de supermercados, para la cuantificación de coliformes totales y presencia de *E. coli*. Se utilizó un medio de cultivo cromogénico (Ecc), los medios de cultivo fueron incubados a 37°C por 24h, el día siguiente se determino de manera cuantitativa los resultados de coliformes totales y se determino la presencia de *E. coli*; para la determinación de *Salmonella* spp, se centrifugaron 250 mL de agua de enjuague por 25 min. a 4000 X g, para lograr la sedimentación bacteriana. Se tomaron 10 mL del sobrenadante y se adicionaron 100 mL de medio de enriquecimiento (Rappaport-vassiliadis). El cual se incubo a 37°C por 24h, el siguiente día se realizaron diluciones para luego emplear la técnica de extensión en placa en el medio de cultivo cromogénico (Rambach), se incubó de nuevo a las mismas condiciones y los resultados positivos para *Salmonella* spp, se confirmaron por medio de PCR. Ocho probables resultados positivos fueron obtenidos para *Salmonella* spp. Utilizando el medio cromogénico, los cuales fueron confirmados mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, obteniéndose un resultado positivo de las muestras obtenidas de supermercados. Para *E. coli* se obtuvieron 2 resultados positivos en empaques agrícolas y 5 resultados positivos en supermercados. Coliformes totales fueron detectados y cuantificados mayormente en supermercados con una media log de 3.94 UFC/mL, que en empaques agrícolas que apporto una media log de 1.70 UFC/mL, esto debido al mal manejo del fruto en el supermercado por lo que se puede concluir que las altas cantidades de coliformes totales y la presencia de *E. coli* encontradas hacen

posible la presencia de bacterias patógenas ya que los coliformes incluyen bacterias oportunistas como lo es *Klebsiella pneumoniae* y que el resultado de la presencia de *Salmonella* en una muestra de supermercado, es suficiente para poder considerarla como un contaminante de la superficie de tomate,

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el comercio mundial de alimentos frescos (importaciones y exportaciones sumadas) superó los 500 millones de dólares anuales (Bancomext, 2004). En los últimos cuatro años, la agricultura de exportación se ha concentrado en 14 productos agrícolas, el principal producto de exportación actual es el tomate con una participación del 16% en promedio anual (Bancomext, 2004).

La posición geográfica de México favorece el flujo comercial de sus productos agrícolas al exterior, la perecibilidad del producto, vida de anaquel y cumplimiento estricto del tiempo en la exportación se conjugan para impulsar la plataforma agro-exportadora mexicana (Bancomext, 2004).

Sinaloa es el productor más importante de hortalizas en el país a pesar de la crisis económica de los últimos años. Es el principal exportador de estos productos a los E.U.A. y es uno de los principales proveedores de hortalizas a otros estados de la República (Gaxiola, 1998), siendo el tomate la hortaliza más representativa del estado. El Banco de Comercio Exterior (Bancomext) tiene registrada 74 empresas productoras de tomate en Sinaloa y es el Valle de Culiacán el que aporta el mayor porcentaje de producción y exportación (Gaxiola, 1998).

El consumo per cápita del tomate se ha incrementado en más del 23% en los últimos años sobre todo en E.U.A., representando un incremento en el volumen de tomate fresco de más de 2 millones de toneladas (Moore, 1999), la demanda de esta hortaliza ha propiciado que la actividad hortícola se modernice invirtiendo en la más alta

tecnología e innovando en la comercialización del producto logrando que esta actividad se convierta en una de las mas productivas del estado y del país (CAADES, 2000).

Una gran variedad de factores contribuye a la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades a los humanos. Algunos de los factores que pudieran considerarse de riesgo en la calidad microbiológica de los productos frescos incluyen: el uso de agua de riego contaminada con heces fecales de humanos y animales; procesos inadecuados en los campos de cultivo; prácticas deficientes de desinfección; condiciones inapropiadas durante empaque; higiene deficiente de los trabajadores; y el mal manejo durante almacenamiento y transporte del producto, además de mal manejo del fruto en los supermercados. Aunado a esto, una vez que ocurre la contaminación, muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en frutas y hortalizas frescas (Castro del Campo, 2002). Algunos microorganismos son también capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso de multiplicarse en el producto durante almacenamiento (Chaidez, 2002).

Los microorganismos indicadores de la condición sanitaria mas comúnmente utilizado son los coliformes. Generalmente se reconoce que la presencia de coliformes indica una condición sanitaria pobre (Hirotsani *et al.*, 2002), siendo *Escherichia coli*, miembro del grupo coliforme, el indicador por excelencia ya que coloniza el intestino del hombre en pocas horas después del nacimiento, se reconoce como flora normal y a diferencia de otros coliformes que pueden tener su origen no fecal, el origen de *E. coli* es fecal (Rodríguez, 2002); microorganismos que pertenecen a este grupo de indicadores

pueden alojarse en frutas y hortalizas frescas en la pre-cosecha o durante la post-cosecha (Vijayakumar and Wolf-Hall, 2002). Es posible que la presencia de estos microorganismos indicadores señalen contaminación fecal y el riesgo de la presencia de patógenos oportunistas como *Klebsiella pneumoniae* (Hirotsani *et al.*, 2002), y patógenos como lo es *Salmonella enterica*, causante de la salmonelosis que se presenta por la ingesta de alimentos que contienen un número crítico de células de esta bacteria (Nogva and Lillehaug, 1999) que es uno de los patógenos mas importantes en enfermedades humanas por el consumo de alimentos (del Cerro *et al.*, 2003). del total de los casos de infección causados por esta bacteria, mas del 95% es por el consumo de alimentos (Stepanović *et al.*, 2003). Esta bacteria es la principal causa de gastroenteritis en los Estados Unidos (Gawande and Bhagwat, 2002), con aproximadamente 1.5 millones de casos con 15.000 hospitalizaciones y 500 muertes anualmente (Mead *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000).

Los alimentos de origen animal, como pollos, huevos, carne y productos lácteos, son reconocidos históricamente como vehículos de especies del genero *Salmonella* (Guo *et al.*, 2001). Frutas y hortalizas eran raramente reportadas como vehículos de transmisión de *Salmonella* spp. (Wei *et al.*, 1995). Sin embargo, en años recientes, los brotes de infecciones asociados con frutas y hortalizas crudas y/o mínimamente procesadas han ocurrido con mayor frecuencia (De Roever, 1998). Esto debido a que el consumo de las mismas se ha incrementado en los últimos años (Bhagwat, 2004). por lo que actualmente las infecciones han sido recurrentes (Harris *et al.*, 2001). *Salmonella*

spp. ha estado involucrada en brotes por el consumo de tomate, melones, sandía, berro de mostaza y frijol (Beuchat, 1996; Schuenzel and Harrison, 2002).

El consumo de tomates frescos fué epidemiológicamente asociado a 176 casos de infección por *Salmonella javiana* en Illinois, Michigan, Minnesota y Wisconsin en 1990. En 1993, se identificaron los tomates como vehículo de la infección del brote multiestado ocasionado por *Salmonella enterica* serotipo Montevideo (CDC, 1993; Guo *et al.*, 2000). Zhuang *et al.*, (1995) describieron las condiciones que influyen en la sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella enterica* serotipo Montevideo en la superficie de tomates. El crecimiento rápido ocurrió en tomates maduros cortados (pH  $4.1 \pm 0.1$ ) a temperatura ambiente. *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, *Salmonella enterica* serotipo Infantis, y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium se han reportado que pueden desarrollarse en tomates frescos (pH 3.99 a 4.37) a 22 y 30°C (Asplund and Nurmi, 1991; Guo *et al.*, 2000).

Por lo tanto, es importante que durante las operaciones de campo y empaque se deban de seguir ciertos lineamientos, normas y controles que aseguren que el crecimiento de la flora normal del producto esta controlado, y que existe un programa preventivo de contaminación por microorganismos patógenos. Debemos tener presente que toda persona involucrada en la industria de frutas y hortalizas deberán de mantener altos estándares de higiene personal. Además no debemos de olvidar que para este tipo de productos, altamente perecederos, la higiene se deberá mantener durante todo el trayecto desde su cosecha hasta su consumo (Siller *et al.*, 2002).

El mantener la higiene y las buenas prácticas de sanidad en la industria de frutas y vegetales, es responsabilidad de todos los que están envueltos en su proceso: desde el que cultiva hasta el que lo pone a disposición del consumidor final. Todos deben entender la necesidad de las Buenas Prácticas de Higiene y deben ser entrenados en cómo implementarlas, ya que muchas de las malas prácticas, se deben a la ignorancia.

El aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. continúan siendo un problema importante tanto en la microbiología clínica y aplicada (Hoorfar *et al.*, 1999), como en la microbiología de los alimentos. Los métodos convencionales generalmente requieren de 72 a 96 h. Estos consisten en un pre-enriquecimiento para la recuperación de *Salmonella* spp, enriquecimiento selectivo que permite el crecimiento de especies del genero *Salmonella* y reduce la presencia de otras especies bacterianas, aislamiento usando agar selectivo, y confirmación por serología y pruebas bioquímicas (Tan and Shelef, 1999). Uno de los métodos más prometedores para la detección de *Salmonella* spp. se basa en la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, por sus siglas en inglés) que combina la simplicidad con una alta especificidad y sensibilidad para la detección de bacterias patógenas en alimentos (Kimura *et al.*, 1999). Hoorfar *et al.*, (1999), trabajaron con controles presuntivos y negativos de *Salmonella* spp, para determinar la especificidad y sensibilidad del PCR. Oliveira *et al.*, (2002) determinaron la especificidad y sensibilidad de PCR combinado con Rappaport-Vassiliadis (RV) para la detección de *Salmonella* spp. PCR-RV es un método sensible y disminuye el tiempo para la identificación de *Salmonella* spp. (Oliveira *et al.*, 2003). Wang *et al.*, (1997), desarrollaron un protocolo universal para la detección de 13 patógenos en alimentos por

PCR, Guo *et al.*, (2000), lograron la detección de *Salmonella* Montevideo por PCR, en tomates inóculados, con la utilización de oligos derivados de *hlyA*.

Por todo lo antes mencionado y debido a la falta de estudios científicos que determinen la contaminación por microorganismos indicadores y sobre todo la presencia de *Salmonella* spp. en tomates de empaques agrícolas y supermercados, representa un problema a la salud pública. Es por ello que en el presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *Salmonella* spp. *Escherichia coli* y cuantificación de coliformes totales, en la superficie de tomate proveniente de empaques agrícolas y supermercados utilizando para *Escherichia coli* y coliformes un medio de cultivo selectivo (ECC) y para *Salmonella* spp. un medio de enriquecimiento Rappaport-Vassilladis (RV), medio de cultivo selectivo (agar cromogenico Rambach), y los resultados positivos fueron confirmados por PCR.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y cuantificar a coliformes totales de la superficie de tomate recolectado de empaques agrícolas y supermercados.

### Objetivos particulares

Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp y cuantificar a coliformes totales de la superficie de tomates recolectados de empaques agrícolas.

Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp y cuantificar a coliformes totales de la superficie de tomates recolectados de supermercados.

Identificar el genero *Salmonella* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

Establecer las diferencias de contaminación por coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. existentes entre los empaques agrícolas y supermercados, evaluados en el presente estudio

## HIPÓTESIS

Existe mayor presencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en los tomates de supermercados que en los empaques agrícolas.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa es más específica que el medio de cultivo cromogénico Rambach.

## METAS

Generar información científica acerca de la contaminación por coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en tomates de empaques agrícolas y supermercados.

Mostrar la posible incidencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en tomates de empaques agrícolas y supermercados.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades

En los últimos años se ha registrado un notable incremento de brotes epidemiológicos asociados con el consumo de frutas y hortalizas frescas. De acuerdo con datos del Centro para el Control de Enfermedades de E.U.A. (CDC, por sus siglas en inglés), durante 1973-1992, en los E.U.A. se duplicó la proporción de brotes debido al consumo de productos frescos (NACMCF, 1999).

Entre los factores que influyen en la incidencia y la epidemiología de las enfermedades, sobresalen el nivel general de higiene en el manejo de frutas y hortalizas, la globalización en el suministro y distribución de productos frescos, la introducción de los patógenos en nuevas áreas geográficas, los cambios en la virulencia y resistencia ambiental de los patógenos y los cambios en los hábitos alimenticios de la población (Beuchat, 1998).

Los productos frescos son los productos agrícolas que se venden al consumidor en su estado natural o con un mínimo de procesamiento: lavado, encerado, desinfectado, cortado, refrigerado o congelado. algunos ejemplos de estos frutos encontramos al tomate, pepino, melón y mango (Castro del Campo, 2002).

## Buenas prácticas agrícolas

Un programa efectivo de sanidad contiene dos componentes principales. El primero está relacionado con la higiene personal, y el segundo considera la integridad del producto. El significado de la palabra higiene asocia al producto con buena salud y se refiere a que el producto es limpio y libre de riesgos físicos, químicos y biológicos. Cuando este concepto se aplica a los productos frescos y al proceso, es indicador de buena calidad en la medida en que no existe ningún riesgo de intoxicación o envenenamiento por consumir alimentos contaminados (Siller *et al.*, 2002).

El llevar productos frescos a la mesa del consumidor desde el campo involucran muchos procesos (siembra, desarrollo del cultivo, cosecha, transporte a la planta, empaque, almacenamiento, transporte a mercados terminales y distribución) en los que los productos se encuentran expuestos al manejo humano y al contacto con material y equipo que aumentan el riesgo de contener agentes contaminantes. El principal problema para los productos alimenticios en general, es el evitar los riesgos por contaminación microbiológica y su descomposición (Siller *et al.*, 2002).

El medio ambiente está lleno de microorganismos que de forma natural llegan al producto vegetal, y que son parte de su microflora normal; pero en realidad muy pocos de ellos representan un riesgo para la salud. La verdadera contaminación ocurre cuando estos tienen contacto directo con contaminación fecal o industrial, o por contaminación cruzada del personal, insectos o roedores. Bajo esas circunstancias, los microorganismos

pueden estar en nuestro suelo de cultivo, en el agua de riego, en el agua de lavado, en el personal, etc. (Siller *et al.*, 2002).

Por lo tanto, es importante que durante las operaciones de campo y empaque se deban de seguir ciertos lineamientos, normas y controles que aseguren que el crecimiento de la flora normal del producto esta controlado, y que existe un programa preventivo de contaminación por microorganismos patógenos. Debemos tener presente que toda persona involucrada en la industria de frutas y hortalizas deberán de mantener altos estándares de higiene personal. Además no debemos de olvidar que para este tipo de productos, altamente perecederos, la higiene se deberá mantener durante todo el trayecto desde su cosecha hasta su consumo (Siller *et al.*, 2002).

El mantener la higiene y las buenas prácticas de sanidad en la industria de frutas y vegetales, es responsabilidad de todos los que están envueltos en su proceso: desde el que cultiva hasta el que lo pone a disposición del consumidor final. Todos deben entender la necesidad de las Buenas Practicas de Higiene y deben ser entrenados en cómo implementarlas, ya que muchas de las malas prácticas, se deben a la ignorancia.

Las Buenas Prácticas Agrícolas en el campo inician desde la selección del terreno y sus alrededores, la calidad del agua de riego, la aplicación de plaguicidas, la higiene y sanidad del trabajador y las instalaciones sanitarias , entre otras. Las Buenas Prácticas Agrícolas en el Empaque incluyen tópicos como las instalaciones, el diseño y la construcción de la planta y el equipo, mapas y diagrama de flujo, protecciones, instalaciones sanitarias, señalamientos, limpieza y sanidad, tipo de detergentes, tipo de desinfectante, hojas técnicas y de seguridad, almacenamiento de productos de limpieza y

materia prima, recepción del producto, lavado de fruto, calidad del agua, selección del fruto, empaque del fruto, educación y entrenamiento de los trabajadores, agua de consumo, embalaje, control de etiquetado, condición de transporte, el control de plagas, las practicas de proceso y las prácticas personales, etc. (Siller *et al.*, 2002).

### Inocuidad alimentaria

Más de 200 enfermedades conocidas son transmitidas a través de alimentos. Las causas de enfermedades de origen alimentario incluyen: bacterias, virus, parásitos, toxinas, metales y priones y los síntomas de estas enfermedades van desde ligeras gastroenteritis hasta síndromes de tratamiento neurológicos de por vida, hepáticos y renales. Se han estimado que las enfermedades de origen alimentario causan de 6-81 millones de enfermos y hasta 9,000 muertos cada año en los Estados Unidos de América. Existe la percepción entre los consumidores estadounidenses de que los productos importados, son la causa principal de este tipo de enfermedades. Por su parte, en México la Secretaría de Salud informó que en el periodo de los años 1993-97, de 2,95 millones de personas enfermas por las causas antes descritas, tuvo lugar un promedio anual de 10.300 defunciones (Vásquez y Cabral, 2001).

En los países en desarrollo las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. México es una de las naciones que registraban a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos (Kumate e Isibasi,

1986; Kumate, 1988), siendo muy elevado el costo tanto en vidas humanas y recursos médicos destinados a la atención de los enfermos, como en pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismo laboral (Olarte, 1986). La etiología de las enfermedades diarreicas es múltiple. Sin embargo, en México la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, siendo los factores más importantes aquellos de carácter sanitario, socioeconómico y cultural (Vásquez y Cabral, 2001).

### Inocuidad de frutas y hortalizas

La demanda de frutas y hortalizas frescas de alta calidad, vida de anaquel prolongada y “listas para ser consumidas” se ha incrementado tanto en Estados Unidos como en Europa, generando que la comercialización de productos horto-frutícolas esté dirigida a los que sean manejados y/o conservados por tecnologías de mínimo procesamiento, y de aceptable inocuidad microbiológica (Díaz y Vernon, 1999).

La apreciación de la calidad está directamente relacionada con el estricto respeto por las especificaciones establecidas en las leyes correspondientes. Es decir, un producto será de buena calidad cuando se acoja a la legislación vigente, cubra los requisitos establecidos por el cliente, reúna las características esperadas por los consumidores e incorpore, a lo largo del tiempo, todas las nuevas y cambiantes exigencias. La reducción y/o pérdida de la calidad, y la contaminación por microorganismos patógenos en frutas y hortalizas puede ocurrir durante la precosecha, el corte y recolección, el almacenamiento



y el transporte, en los puntos de venta, y en el mismo empleo final. Por lo que hay que tratar de prevenir dicha contaminación (Díaz y Vernon, 1999).

Al hablar de prevención, se hace referencia a los riesgos que se corren en toda cadena agroalimentaria. Considerando como riesgo la probabilidad de que un agente contaminante, se presente en una determinada fruta o vegetal, cause daño a la salud humana. Los principales riesgos de contaminación en el caso de frutas y vegetales cosechados pueden ser de tres tipos.

- Biológicos, contaminación con bacterias, hongos, parásitos o virus.
- Físicos, objetos como piedras, cristales o fragmentos de metales o empaques.
- Químicos, presencia de aditivos, insecticidas, lubricantes grado no alimenticio y compuestos de limpieza (Díaz y Vernon, 1999).

El centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) considera que las bacterias podrían ser la principal causa de epidemias confirmadas con pruebas de laboratorio y que las principales razones son:

- Temperaturas no apropiadas de almacenamiento
- Higiene deficiente del personal
- Temperaturas no apropiadas de procesamiento
- Alimentos en contacto con superficies no limpias
- Equipo contaminado

Para el caso de frutas y hortalizas, estas pueden contaminarse de manera "natural" con polvo y tierra durante el proceso de cosecha, manejo y almacenamiento, con microorganismos patógenos, por operaciones de lavado, riego o tratamientos

superficiales con agua. Cualquier tipo de contaminante representa un serio riesgo para la salud, que puede ir desde el desarrollo de enfermedades leves hasta serios problemas infecciosos o tóxicos que pueden causar la muerte (Díaz y Vernon, 1999).

### **Puntos básicos para la inocuidad de frutas y hortalizas**

Los puntos consideran la cadena agroindustrial que comprende la producción, recolección, embalaje, procesamiento y transporte de frutas y hortalizas frescas.

1. Es prioritario prevenir la contaminación microbiana de frutas y hortalizas, por encima de confiarse en acciones para reducir la contaminación una vez que ésta se ha dado.
2. Para reducir al mínimo el riesgo de daños por microorganismos en frutas y hortalizas frescas, se deben adoptar sistemas de control y buenas prácticas agroindustriales, en las áreas donde se pueda ejercer control. Siempre que éste no aumente el riesgo de contaminación.
3. Todo lo que entra en contacto con las frutas y hortalizas frescas puede ocasionar contaminación. La mayor fuente de contaminación de microorganismos patógenos proviene de residuos fecales de animales y humanos.
4. Cuando el agua entra en contacto con las frutas y hortalizas frescas, la posibilidad de contaminación por esta fuente depende de la calidad y procedencia de la misma. Se debe reducir el riesgo de contaminación microbiana por el agua utilizada en las actividades de riego y procesamiento. Existen evidencias que demuestran que el uso de agua de riego contaminada puede

incrementar la frecuencia de microorganismos patógenos detectados en productos cosechados.

5. Deben reducirse las posibilidades de contaminación de los productos frescos por estiércol y desechos sólidos municipales. El estiércol y los desechos biológicos sólidos son un fertilizante inocuo y efectivo si se tratan debidamente, pero constituyen una fuente de microorganismos patógenos y constituyen una amenaza a la salud humana si su tratamiento no es el adecuado.
6. La higiene y prácticas sanitarias adecuadas de los operarios participantes en el proceso de producción agroindustrial juegan un papel fundamental para reducir al máximo las posibilidades de contaminación por microorganismos.
7. Es importante entender y cumplir las leyes y reglamentaciones establecidas por las autoridades correspondientes sobre prácticas agrícolas.
8. Se debe establecer un sistema de registro de actividades a todos los niveles de operación agrícola (en el campo, las instalaciones de selección, tratamiento y empaque, en los centros de distribución, en el transporte). Para que un programa de inocuidad tenga éxito debe contar con personal preparado o un sistema eficaz de control y monitoreo, el cual asegure que todos los elementos del mismo funcionan correctamente, para que se tengan datos fiables del origen del producto, su manejo y canales de distribución (Díaz y Vernon, 1999).

Queda claro con lo anterior, que para implementar sistemas de vigilancia y control sanitario en toda empresa dedicada al rubro de producción de alimentos, será necesario invertir una suma importante de dinero para el establecimiento de un sistema de

HACCP, si se desea sobrevivir a las tendencias de consumo de alimentos seguros, desde el campo a la mesa (Vásquez y Cabral, 2001).

El tomate la hortaliza más consumida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente (Infoagro, 2003).

## El tomate

### **Importancia económica**

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta perenne y de diferente duración, según sus variedades. Sin embargo, las condiciones climatológicas la han convertido en una planta anual. El tomate pertenece a la familia Solanácea, y su centro de origen se localiza en la región de los Andes, integrada por Colombia, Bolivia, Chile y Perú donde existe la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres (Taylor, 1986).

La evidencia histórica favorece a México como centro de domesticación primario del tomate. La utilización de formas domésticas en nuestro país es muy antigua; sus frutos eran bien conocidos y empleados como alimentos por las culturas indígenas que habitaban la parte centro y sur de México, quienes la llamaban <<tomatl>> en lengua náhuatl (Riek, 1978).

El tomate es un cultivo que sobresale por su importancia económica y social. Ocupa el primer lugar en exportación con más de 60 mil hectáreas cultivadas al año, lo que representa un 21% de la exportación total, con más de un millón 600 mil toneladas

de tomate fresco cuyo valor fluctúa a 200 millones de dólares; además, es un cultivo que genera fuente de trabajo por actividades que van desde labores de cultivo y cosecha, hasta la selección, empaque y venta del producto; asimismo, es una fuente importante de divisas para el país. Los principales productores son: Sinaloa con el 67.5% de la producción nacional, seguido por Baja California con el 8%, Tamaulipas con 3.8, Veracruz, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo y Sonora con volúmenes que fluctúan entre 1.5 a 2.0%.

Una situación que ha dado ventaja a México en agricultura es el crecimiento generado por la actividad hortícola en el estado de Sinaloa, el cuál se ha sustentado en la utilización de tecnología de vanguardia y en el empleo de una fuerza de trabajo de bajo costo (CAADES, 2002). En los últimos años, el tomate Sinaloense está desplazando del mercado a su principal competidor, el tomate de Florida, gracias a la forma que se cosecha y a su mejor sabor lo cuál ha significado una mayor aceptación por parte de los consumidores norteamericanos (Gaxiola, 1998). Sinaloa, además de ser el principal exportador de estos productos a Estados Unidos, es uno de los principales proveedores a los demás estados de la República, y a pesar de la crisis económica de los últimos años, continúa siendo el productor más importante en el país, siendo reconocido como un estado tomatero (CAADES, 2002). Sin duda uno de los mayores retos es disminuir o inclusive eliminar a los microorganismos que pueden encontrarse como contaminantes de productos hortícola: hongos, bacterias, protozoarios y virus. Si los productos no reciben un manejo poscosecha apegado a estrictas medidas sanitarias durante la cosecha y el empaque, el riesgo de contaminación se incrementa (CAADES, 2002).

## Familia de las Enterobacterias

### **Enterobacterias**

Las enterobacterias son microorganismos aerobios, fermentan una amplia variedad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja; producen toxinas y otros factores de virulencia (Brooks *et al.*, 1999). El manual de bacteriología determinativa de Bergey's, define a las enterobacterias como microorganismos Gram negativos, de forma bacilar, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas, productores de ácido a partir de lactosa y oxidasa negativa (Holt *et al.*, 1994).

Las enterobacterias son organismos que se encuentran en el suelo, agua y vegetación. Cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y la mayoría de los animales de sangre caliente. Esta familia incluye, entre otros, los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*. Algunos microorganismos entéricos, como *Escherichia coli*, forman parte de la flora normal e incidentalmente causan enfermedad, en tanto que otras bacterias como *Salmonellas* y *Shigellas*, con gran frecuencia son patógenas para humanos (Brooks *et al.*, 1999).

### **Características Metabólicas de Enterobacterias**

El primer indicio de que un aislamiento pertenece a la familia Enterobacteriaceae lo constituye una tinción de Gram negativa y su crecimiento en medios de cultivo sólidos específicos para enterobacterias (Koneman *et al.*, 1998). Sin embargo, la

diferenciación de las enterobacteriaceae se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético bacteriano. Estas enzimas dirigen el metabolismo bacteriano por distintas vías que pueden detectarse con medios especiales usados en técnicas de cultivo *in vitro* (Koneman *et al.*, 1998). Los sustratos con los que reaccionan estas enzimas se incorporan al medio de cultivo junto con un indicador capaz de detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos (Koneman *et al.*, 1998). La diferenciación de enterobacterias puede agotar un gran número de pruebas. Sin embargo, haciendo algunas observaciones se puede asegurar que el microorganismo pertenece a este grupo. Por definición, para que un microorganismo sea clasificado dentro de la familia Enterobacteriaceae, debe utilizar glucosa en forma fermentativa, reducir nitratos a nitritos y no exhibir actividad de citocromo oxidasa (Koneman *et al.*, 1998).

Utilización de hidratos de carbono. El término “fermentación” se usa para referirse a la utilización de los hidratos de carbono por las bacterias. La fermentación es un proceso metabólico de oxidorreducción en donde, un sustrato orgánico sirve como aceptor electrónico final de los electrones, en lugar del oxígeno molecular (Koneman *et al.*, 1998). Todas las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae utilizan hidratos de carbono mediante un proceso de fermentación denominado “fermentación ácida mixta,” en donde el ácido pirúvico resultante de la glucólisis finalmente deriva en una variedad de ácidos orgánicos, como ácido acético, propiónico, succínico, fórmico y otros (Koneman *et al.*, 1998). Las bacterias se diferencian por los hidratos de carbono que utilizan y los tipos y cantidades de ácidos mixtos que producen. Estas diferencias

permiten separar diferentes especies. Por ejemplo, la fermentación de glucosa por *Escherichia coli* produce gran cantidad de ácido acético y láctico con una marcada disminución del pH del medio de prueba, mientras que el grupo "*Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia*," metabolizan ácido pirúvico produciendo acetil-metil carbinol y ácidos mixtos en menor cantidad. El gas resultante de bacterias fermentadoras es básicamente una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono, formado a partir de la ruptura del ácido fórmico. Cualquier bacteria que forma gas en un medio de prueba con hidratos de carbono, primero debe formar ácido (Koneman *et al.*, 1998).

La fermentación bacteriana de la lactosa es más complicada que la de glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa unidas por un vínculo de oxígeno conocido como "enlace galactósido". Para que una bacteria utilice lactosa deben estar presente dos enzimas:  $\beta$ -galactósido permeasa que permite el transporte de lactosa a través de la pared celular bacteriana y  $\beta$ -galactosidasa, una enzima necesaria para hidrolizar el enlace  $\beta$ -galactósido una vez que el disacárido ha entrado a la célula, liberando glucosa y galactosa. Enseguida, se produce la degradación de la glucosa (Koneman *et al.*, 1998).

Fermentación de carbohidratos y producción de ácido sulfhídrico. Es necesario un medio ambiente ácido para que un microorganismo produzca ácido sulfhídrico. Como el medio con el carbohidrato fermentable se torna ácido con la fermentación de éste, hay aumento de iones hidrógeno y estos reaccionan con el azufre del tiosulfato de sodio presente en muchos medios formando  $H_2S$ , el cual reacciona con las sales de hierro también presentes produciendo un precipitado negro insoluble (Koneman *et al.*, 1998).



Reducción de nitratos. Todas las enterobacterias, con excepción de ciertos biotipos de *Enterobacter agglomerans* y especies de *Erwinia*, reducen nitratos a nitritos. Los microorganismos que reducen nitratos tienen la capacidad de extraer oxígeno de nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción (Koneman *et al.*, 1998).

Actividad de citocromooxidasa. Todo microorganismo que muestre actividad de citocromooxidasa se excluye de la familia Enterobacteriaceae (Koneman *et al.*, 1998). La presencia de esta enzima indica que el microorganismo es capaz de llevar a cabo un metabolismo oxidativo, donde se transfieren los hidrógenos del ácido pirúvico al ciclo de krebs y el aceptor electrónico final es el oxígeno molecular y se forma agua (Stryer, 1995). Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae, realizan un metabolismo fermentativo, porque están presentes enzimas necesarias para oxidar ácido pirúvico a ácido láctico y otros ácidos orgánicos. De tal forma que no requieren de oxígeno molecular como aceptor electrónico final y la enzima que cataliza la oxidación del citocromo no está presente (Koneman *et al.*, 1998).

### **Microorganismos indicadores**

Los microorganismos indicadores de la condición sanitaria mas comúnmente utilizado son los coliformes. Generalmente se reconoce que la presencia de coliformes indica una condición sanitaria pobre (Hirotsani *et al.*, 2002), las enterobacterias y consecuentemente sus indicadores, coliformes totales y fecales han recibido atención, desde hace tiempo, como contaminantes de productos agrícolas (Ercolani, 1976) microorganismos que pertenecen a este grupo de indicadores pueden alojarse en frutas y

hortalizas frescas en la pre-cosecha o durante la post-cosecha (Vijayakumar and Wolf-Hall, 2002). siendo *Escherichia coli* el indicador por excelencia ya que coloniza el intestino del hombre en pocas horas después del nacimiento y se reconoce como flora normal (Rodríguez, 2002).

La detección directa de bacterias patógenas, virus y quistes de protozoarios requiere de procedimientos muy costosos y que consumen mucho tiempo. Estos requerimientos condujeron al concepto de organismos indicadores de contaminación fecal. En 1914, el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos adoptó al grupo coliforme como un indicador de contaminación fecal de agua potable (Gerba, 1987). Es posible que estos microorganismos indicadores señalen contaminación fecal y el riesgo de la presencia de patógenos, como lo es el genero *Salmonella* (Hirotañi *et al.*, 2002).

Los criterios para un organismo indicador ideal son los siguientes (Bitton, 1994):

1. Debe ser un miembro de la microflora intestinal de animales de sangre caliente.
2. Debe estar presente cuando los patógenos estén presentes y ausentes en muestras no contaminadas.
3. Debe estar presente en números más grandes que el patógeno.
4. Debe ser al menos igualmente resistente que el patógeno a las condiciones ambientales.
5. No debe multiplicarse en el ambiente.
6. Debe ser detectable por métodos sencillos y económicos.
7. El organismo indicador no debe ser patógeno.

Coliformes Totales El grupo de coliformes totales incluye las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas, de forma bacilar que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas a 37°C (Bitton, 1994). Este grupo incluye *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Citrobacter* spp. Estos coliformes son descargados en grandes cantidades en heces humanas y animales. Estos indicadores son útiles en la determinación de la calidad en agua potable y alimentos así como en aguas recreacionales (Bitton, 1994). Algunos miembros de este grupo como *Klebsiella* spp. pueden crecer bajo condiciones ambientales en residuos industriales y agrícolas. En plantas de tratamiento de agua, el grupo de coliformes totales es uno de los indicadores de mayor uso para determinar la eficiencia del tratamiento de la planta (Bitton, 1994). Las pruebas para detección de coliformes son un paso tradicional en el control de calidad en general de productos cárnicos, lácteos, avícolas, congelados o curados, así como en frutas y hortalizas frescas. Es posible conocer los niveles de coliformes existentes en las materias primas, producto en proceso, producto terminado, ambiente de manufactura y equipo (Petrifilm 3M, 1998).

Coliformes Fecales Este grupo incluye todos los coliformes que fermentan lactosa a 44.5°C. Los coliformes fecales comprenden bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de coliformes fecales indica la presencia de materia fecal de animales de sangre caliente. Se ha sugerido el uso de *E. coli* como único indicador de contaminación fecal, ya que puede ser fácilmente distinguida de otros miembros del grupo coliforme fecal por la ausencia de ureasa y presencia de  $\beta$ -glucoronidasa (Bitton, 1994). Los coliformes fecales presentan un patrón de

sobrevivencia similar al de las bacterias patógenas, sin embargo, su utilidad como indicadores de contaminación viral o con protozoarios es limitado ya que son menos resistentes a la desinfección (Bitton, 1994).

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC), cuyas características principales se describirán brevemente y se resumen en el siguiente cuadro (Rodríguez, 2002).

**Cuadro I.** Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea.

<b>Grupo</b>	<b>Síntomas clínicos</b>	<b>Epidemiología</b>	<b>Serogrupos y serotipos más comunes</b>	<b>Factores de patogenicidad</b>
<b>ETEC</b>	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
<b>EHEC</b>	SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, Fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21 O119, O128, O145	STX A/E Intimina PO157
<b>EIEC</b>	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H- O152:H-, O164:H-, O167:H-	Invasividad Plásmido de 140MDa
<b>EPEC</b>	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de dos años	O55, O86, O142, O111:H-, O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa
<b>EAEC</b>	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas pet y pic OMP Plásmido de 60 Mda Citosina
<b>DAEC</b>	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

LT= toxina termolábil  
ST= toxina termo estable  
CFA= factor de colonización antigénico  
BFP= pili con forma rizada  
EIEC= enterotoxigénica  
EHEC= enterohemorrágica

EAF= factor de adherencia de EPEC  
OMP= proteína de membrana externa  
STX= toxina siga  
EIEC= enteroinvasiva  
EPEC= enteropatógena

A/E= adherencia y esfecelación  
AAF= fimbria de adherencia agregativa  
EAST= toxina ST de cepas enteroagregativas  
EAEC= enteroagregativa  
DAEC= adherencia difusa

**Fuente:** Rodríguez, 2002

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).

### Incidencia de bacterias patógenas

La amplia distribución de *E. coli* hace inevitable que la mayoría de los alimentos crudos se encuentren contaminados por este microorganismo. Los alimentos crudos como vegetales y ensaladas de vegetales están ocasionalmente contaminados con serotipos de *E. coli* capaces de causar infección en humanos, incluyendo *E. coli* O157:H7, que está siendo encontrada en un rango cada vez más amplio en animales (Bell y Kryakides, 1998).

Históricamente en la industria de alimentos, ha sido escaso el análisis para tipos específicos de *E. coli*. Es a partir de la reciente emergencia de *E. coli* O157:H7 y del desarrollo de métodos específicos para su detección, que los productos frescos han comenzado a analizarse para este patógeno específicamente (Bell y Kryakides, 1998).

Mientras que la presencia de un microorganismo sea poco frecuente o en números muy bajos en productos crudos, como es el caso de *E. coli* O157:H7 el análisis de dicho organismo podría ser de beneficio limitado, ya que la oportunidad de detectarlo es muy

pequeña. Bajo estas circunstancias el análisis de indicadores de contaminación y *E. coli* pueden proveer mejor información relativa al control del proceso. Generalmente, los resultados de las pruebas de *E. coli* resultan en un mejor aseguramiento del control de la higiene que las pruebas para *E. coli* O157:H7, aunque las condiciones de un acuerdo de compra pueden requerir análisis para este patógeno (Bell y Kryakides, 1998).

Es importante mencionar que las investigaciones en hortalizas frescas y ensaladas en el mercado a nivel detallista, reportan frecuentemente a *E. coli* como contaminante. Ocasionalmente también se reportan especies de *Salmonella*, pero la presencia de *E. coli* O157:H7 en estudios de rutina es rara (Bell y Kryakides, 1998).

No es posible excluir completamente el potencial de contaminación de patógenos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, pero los procedimientos desde el campo hasta el producto terminado, deben orientarse a minimizar la oportunidad de que esto ocurra (Bell y Kryakides, 1998).

### ***Salmonella* spp**

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos, no esporulados. Fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ranmusa, Dsorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de

metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen SH<sub>2</sub> (Terragno *et al.*, 2003).

El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, todavía siguen vigentes las ideas desarrolladas por P.R. Edwards y H.W. Ewing, en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Terragno *et al.*, 2003).

Estudios del DNA mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* y *Salmonella enterica* subespecie *indica*. A su vez las subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (Terragno *et al.*, 2003).

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I) y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez.

Como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres no siguen las reglas del "International Code of Nomenclature of Bacteria", de manera que sus nombres se deben escribir en letras romanas (no itálicas) y con mayúscula; por



ejemplo el nombre completo de *Salmonella* Typhimurium es *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovariedad Typhimurium. Como este nombre es muy largo, a los fines prácticos se usa directamente *Salmonella* Typhimurium. Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *Salmonella bongori*, de baja incidencia en patología humana o animal, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ej: *Salmonella* subesp. IV 50: b : - (*Salmonella enterica* subesp. *Houtenae* 50:b : -)

Los nombres de todas las serovariedades están contenidos en el Esquema de Kauffmann-White, publicado por el "Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de Salmonella", del Instituto Pasteur de París (Terragno *et al.*, 2003).

Las epidemias de infección intestinal por *Salmonella* spp son uno de los problemas más comunes en todo el mundo, principalmente en instituciones de países en desarrollo. Se estima que cada año ocurre en los Estados Unidos de América (EUA) un promedio de 800,000 a cuatro millones de infecciones por *Salmonella*, de las cuales alrededor de 500 son fatales. Aproximadamente 40,000 de éstas se confirman con laboratorio y son serotipificadas por los laboratorios estatales de salud pública, los cuales a su vez informan al Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia (CDC, por sus siglas en inglés) (Chávez-de la Peña *et al.*, 2001).

En México este tipo de infecciones se han notificado de manera ocasional, aunque sospechamos que la frecuencia puede ser mayor, debido al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos. Y es aún menos frecuente que se dé a

conocer un brote por *Salmonella* spp entre los empleados de un hospital (Chávez-de la Peña *et al.*, 2001).

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por los alimentos los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2 500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium*. Es una enfermedad aguda de distribución mundial, con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con medidas de salud pública óptimas. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida; en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables. Tiene una incidencia estacional, por lo que el canal endémico registra aumento de casos a partir del mes de mayo, con pico máximo en julio y agosto y una declinación a partir de septiembre (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Cuando se identifica el alimento responsable del brote, no es sorprendente encontrar personas que dicen haberlo consumido y no se han visto afectadas. Esto puede explicarse por el distinto grado de contaminación del alimento según la porción, por la cantidad ingerida, por un sesgo de recuerdo en los entrevistados, por un sesgo de clasificación (casos

leves o inaparentes clasificados como sanos) o por distinta susceptibilidad de cada individuo. Es posible también que exista una influencia entre las diversas sustancias que se consumen coincidentemente con el alimento contaminado, el alcohol entre ellas (Bellido *et al.*, 1996).

Los alimentos de origen animal, como pollos, huevos, carne y productos lácteos, son reconocidos históricamente como vehículos de especies del género *Salmonella* (Guo *et al.*, 2001). En años anteriores frutas y vegetales eran raramente reportadas como vehículos de transmisión de *Salmonella* spp. (Wei *et al.*, 1995). En años recientes, los brotes de infecciones asociados con frutas y hortalizas crudas y/o mínimamente procesadas han ocurrido con mayor frecuencia (De Roever, 1998). Esto debido a que el consumo de las mismas se ha incrementado en los últimos años (Bhagwat, 2004), por lo que actualmente las infecciones han sido recurrentes (Harris *et al.*, 2001). *Salmonella* spp. ha estado involucrada en brotes por el consumo de tomate, melones, sandía, berro de mostaza y frijol (Beuchat, 1996; Schuenzel and Harrison, 2002).

El consumo de tomates frescos fue epidemiológicamente asociado a 176 casos de infección por *Salmonella javiana* en Illinois, Michigan, Minnesota y Wisconsin en 1990. En 1993, se identificaron los tomates como vehículo de la infección del brote multiestado ocasionado por *Salmonella enterica* serotipo *montevideo* (CDC, 1993; Guo *et al.*, 2000). Zhuang *et al.*, (1995) describieron las condiciones que influyen en la sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella enterica* serotipo *montevideo* en la superficie de tomates. El crecimiento rápido ocurrió en tomates maduros cortados (pH  $4.1 \pm 0.1$ ) a temperatura ambiente, *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis*, *Salmonella enterica*

serotipo *Infantis*, y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* se han reportado que pueden desarrollarse en tomates frescos (pH 3.99 a 4.37) a 22 y 30°C (Asplund and Nurni, 1991; Guo *et al.*, 2000).

La vigilancia de *Salmonella* en todas las etapas de la cadena de procesamiento de los alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonellosis transmitida por alimentos y en el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de control de la misma (Ferragno *et al.*, 2003).

En programas de monitoreo y control es esencial contar con métodos de laboratorio eficientes para el aislamiento, identificación y tipificación de *Salmonella*. Sin embargo, se debe destacar que hay muchos procedimientos distintos para el aislamiento de *Salmonella*. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones (Ferragno *et al.*, 2003).

El sistema de serotipificación de *Salmonella* es probablemente el mejor sistema de tipificación fenotípica bacteriano jamás desarrollado. Tiene un alto poder discriminatorio y provee información con significado epidemiológico. La tipificación molecular da información adicional, pero no es un sustituto de la serotipificación. La disponibilidad y el costo de antisueros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones.

Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella* son relativamente estándar, sin embargo puede haber variaciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas. Como una alternativa se están introduciendo cada vez más los

métodos moleculares; que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen la desventaja que son caros (Terragno *et al.*, 2003).

### Reacción en cadena de la polimerasa

El aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. continúan siendo un problema importante tanto en la microbiología clínica y aplicada (Hoorfar *et al.*, 1999), como en la microbiología de los alimentos. Los métodos convencionales generalmente requieren de 72 a 96 h. Estos consisten en un pre-enriquecimiento para la recuperación de *Salmonella* spp, enriquecimiento selectivo que permite el crecimiento de especies del genero *Salmonella* y reduce la presencia de otras especies bacterianas, aislamiento usando agar selectivo, y confirmación por serología y pruebas bioquímicas (Tan and Shelef, 1999). Uno de los métodos más prometedores para la detección de *Salmonella* spp. se basa en la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, por sus siglas en inglés) que combina la simplicidad con una alta especificidad y sensibilidad para la detección de bacterias patógenas en alimentos (Kimura *et al.*, 1999).

#### **Definición**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue descrita por primera vez por Kary Mullis *et al.*, en 1983 (Wang *et al.*, 1997). Es definido, como una síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA (Way *et al.*, 1993).

La PCR, desde su introducción, ha sido un método utilizado para la detección de patógenos en alimentos. Representa un procedimiento rápido con sensibilidad y especificidad para la detección inmediata e identificación de bacterias patógenas específicas de varias muestras de alimentos (Vantarakis *et al.*, 2000).

La PCR consta de tres pasos que son regidos por temperaturas: El primero conocido como desnaturalización; el cual consiste en un aumento de temperatura entre los 92 y 98 °C, en un tiempo de 30 a 40 segundos; se presenta una separación o desnaturalización de la doble cadena del DNA, obteniéndose DNA de cadena sencilla. El segundo paso es el alineamiento o apareamiento de los “primers” a su secuencia complementaria por una baja de temperatura que oscila entre los 50 a 60 °C en un tiempo de 30 a 60 segundos. En el tercer paso se realiza la polimerización, la cual es realizada por la enzima DNA polimerasa (Taq polimerasa), paso conocido también como extensión, la temperatura óptima es de 72 °C. Durante esta última etapa la enzima adiciona nucleótidos complementarios en cada una de las cadenas moldes. Estos tres pasos se repiten de 25 a 40 ciclos, de acuerdo a la aplicación específica. Finalmente se presenta una baja de temperatura aproximadamente a 4 °C que conserva en buen estado los productos de la reacción (McPherson and Moller, 2001) (Figura 1).

## REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

25-40 Ciclos de 3 pasos

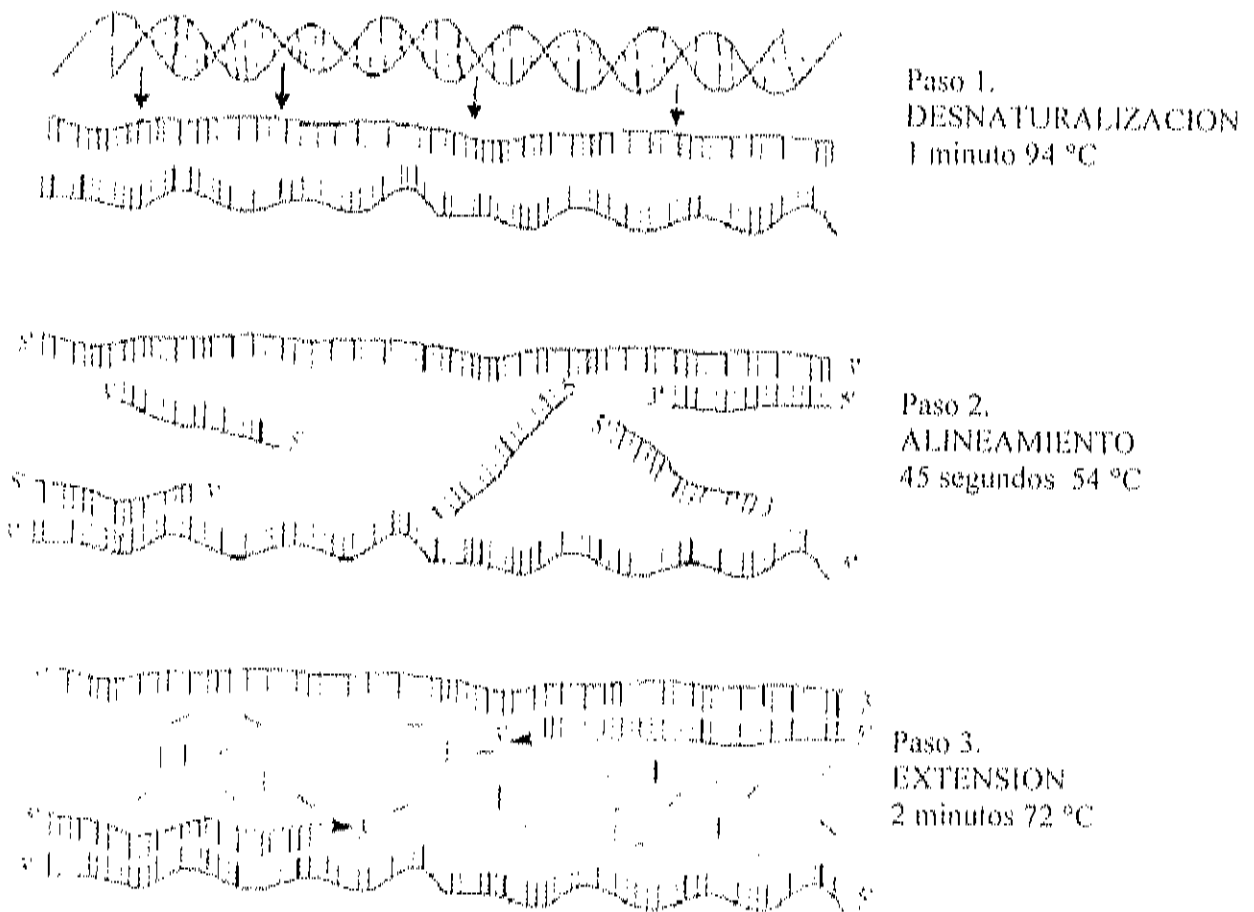
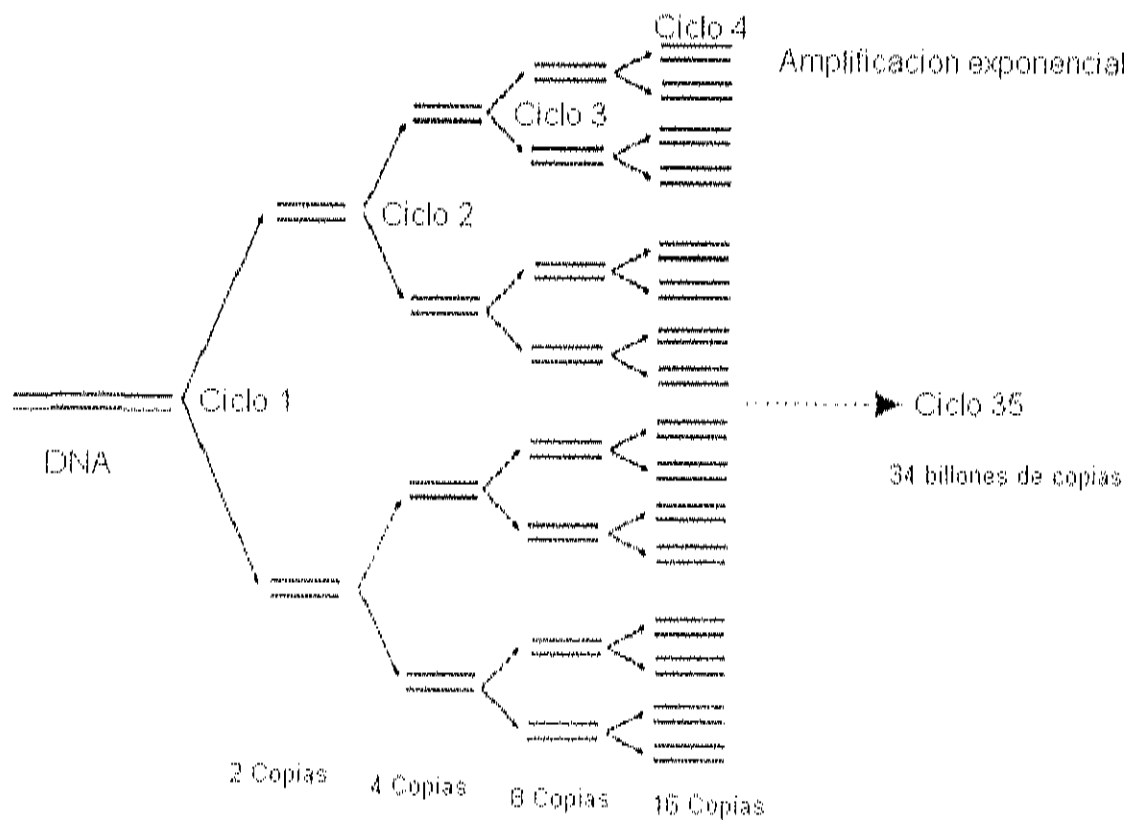


Figura 1: Esquema que muestra los tres pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación exponencial por PCR no solo presenta las ventajas de especificidad y sensibilidad, sino también de eficiencia y versatilidad de aplicaciones a nivel diagnóstico y de investigación. (Figura 2).

### Amplificación Exponencial



**Figura 2:** Esquema que muestra la amplificación exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



## **Estructura del DNA**

En 1952, la comunidad científica finalmente aceptó la idea de que los genes estaban constituidos por DNA. La información acerca de la estructura del DNA se derivó de estudios de dispersión bioquímica iniciados por Friedrich Miescher en 1860 y por análisis de difracción de rayos X llevados a cabo por William Astbury en el decenio de 1940 y continuados por Rosalind Franklin, Linus Pauling y otros.

Se sabía que la unidad básica para construir DNA era un nucleótido, constituido por un azúcar desoxiribosa de cinco carbonos al cual se fijan un fosfato esterificado en la posición 5' del anillo, y en el sitio 1' una base nitrogenada. De las cuales hay dos tipos, las pirimidinas más pequeñas y las purinas de mayor tamaño.

Los nucleótidos poseen una estructura polarizada: un borde denominado extremo 5' donde se localiza el fosfato y otro borde llamado extremo 3'. Puesto que todos los nucleótidos apilados de la cadena miran hacia el mismo lado, toda la cadena tiene una dirección. Un extremo es el 3' y otro el 5'. El análisis de difracción de rayos X indica que la distancia entre los nucleótidos apilados es de 3.4 Å (0.34 nm) y sugiere la presencia de una estructura grande repetida cada 3.4 nm. En una muestra de DNA, el número de purinas siempre es igual al número de pirimidinas. Más específicamente, el número de adeninas siempre es igual el de timinas, y el de guaninas al de citosinas. En otras palabras, Chargaff descubrió las siguientes reglas en la composición de bases de DNA,  $A=T$ ,  $G=C$ , y  $A+T \neq G+C$ . Los datos de Chargaff arrojaron nueva luz sobre la molécula de DNA confiriéndole especificidad e individualidad de un organismo a otro.

Sin embargo, el significado de la equivalencia de bases todavía no está claro (Karp, 2003).

La proposición de Watson y Crick Watson y Crick propusieron un modelo de la estructura del DNA que incluye los siguientes elementos.

1. La molécula se compone de dos cadenas de nucleótidos.
2. Las dos cadenas se enrollan alrededor de un eje central formando un par de hélices derechas. Las hélices derechas avanzan girando en dirección de las manecillas del reloj).
3. El esqueleto-azúcar-fosfato-azúcar-fosfato- se localiza en el exterior de la molécula con los dos grupos de bases proyectándose hacia el centro.
4. Las bases ocupan planos aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la molécula y por lo tanto se colocan una sobre otra igual que platos apilados. Las interacciones hidrofobas y las fuerzas de van der Waals entre las bases apiladas estabilizan toda la molécula del DNA. Las vueltas helicoidales y los pares de bases planares, en conjunto, confieren a la molécula el aspecto de una escalera de caracol.
5. Las cadenas se conservan unidas mediante puentes de hidrógeno entre las bases de una cadena y sus correspondientes bases sobre la otra cadena. Al mismo tiempo, la fuerza de los puentes de hidrógeno es aditiva, de modo que el gran número de ellos que mantiene las cadenas juntas confiere estabilidad a la doble hélice de la molécula.

6. La distancia del átomo de fósforo del esqueleto al centro del eje es de 10 Å (por lo tanto, la anchura de la doble hélice es de 20 Å).
7. La pirimidina de una cadena siempre coincide con una purina de la otra cadena. Esta relación genera los 20 Å de ancho en la molécula.
8. Los átomos de nitrógeno unidos al carbono 4 de la citosina y al carbono 6 de la adenina muestran predominantemente la configuración amino ( $\text{NH}_2$ ) y no la forma imino ( $\text{NH}$ ). De manera similar, los átomos de oxígeno enlazados al carbono 6 de la guanina y al carbono 4 de la timina predominantemente muestran configuración ceto ( $\text{C}=\text{O}$ ) en vez de configuración enol ( $\text{C}-\text{OH}$ ). Estas restricciones estructurales en la configuración de las bases sugieren que la única purina estructuralmente capaz de enlazarse a timina es adenina y que guanina es la única purina capaz de enlazarse a citosina. Por lo tanto, los únicos pares posibles son A-T y G-C. Los pares A-T se unen mediante dos puentes de hidrógeno y los pares G-C mediante tres puentes de hidrógeno.
9. Las dos cadenas que componen una doble hélice corren en direcciones opuestas; o sea, son antiparalelas.
10. La doble hélice efectúa una vuelta completa cada 10 residuos (3.4 nm).
11. No hay restricción alguna sobre la secuencia de bases de determinada cadena de la molécula. Sin embargo, una vez especificada la secuencia particular de una cadena automáticamente queda determinada la secuencia de la otra cadena a lo que se le conoce como complementariedad (Karp, 2003).

Importancia de la proposición de Watson y Crick. Desde la primera vez que los biólogos consideraron al DNA como material genético, definieron tres principales funciones que debía cumplir.

1. Almacén de información genética. El DNA es la “plantilla” molecular, un registro de instrucciones precisas almacenadas que definen todas las características hereditarias mostradas por un organismo.
2. Autoduplicación y herencia. Puesto que el DNA contiene toda la plantilla de un organismo, debe contener la información para su propia duplicación. La duplicación del DNA es el medio para transmitir instrucciones genéticas de una célula a sus células hijas o de un individuo a su descendencia.
3. Expresión del mensaje genético. Durante muchos años los biólogos sospecharon que los genes individuales transportan información para sintetizar proteínas específicas.

El modelo de la estructura del DNA propuesto por Watson-Crick fue de suma importancia para averiguar de qué manera se efectúan las dos primeras de estas tres funciones genéticas. El modelo apoyó fuertemente la sospecha de que el contenido de información del DNA reside en la secuencia lineal de las bases. A cada gen corresponde determinado segmento de DNA (Karp, 2003).

### **Estudios con PCR**

Hoorfar *et al.*, (1999), trabajaron con controles presuntivos y negativos de *Salmonella* spp. para determinar la especificidad y sensibilidad del PCR. Oliveira *et al.*, (2002) determinaron la especificidad y sensibilidad de PCR combinado con Rappaport-Vassiliadis (RV) para la detección de *Salmonella* spp. PCR-RV es un método sensible y disminuye el tiempo para la identificación de *Salmonella* spp. (Oliveira *et al.*, 2003). Wang *et al.*, (1997), desarrollaron un protocolo universal para la detección de 13 patógenos en alimentos por PCR. Guo *et al.*, (2000), lograron la detección de *Salmonella montevideo* por PCR en tomates inoculados, con la utilización de oligos derivados de *hlyA*.

## MATERIALES Y METODOS

### Puntos de muestreo

El estudio se realizó en empaques agrícolas y supermercados de Culiacán. Se realizó en dos etapas: primero, se llevo a cabo el muestreo de los supermercados, en las fechas de noviembre del 2003 a enero del 2004. Posteriormente se muestrearon tres empaques agrícolas del valle de Culiacán durante el calendario de enero del 2004 a el mes de marzo del 2004. Para ambas empresas (empaques y supermercados) se hizo una división en tres niveles de calidad (bajo, medio y alto). Para el caso de supermercados la división se realizó de acuerdo a la infraestructura de lugar, limpieza, diseño arquitectónico, acomodo del fruto, higiene y vestimenta de sus trabajadores. Los empaques agrícolas se dividieron en base a el manual de buenas prácticas agrícolas, elaborado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Por Siller *et al*; (2002). El cual arrojó el siguiente puntaje en base a preguntas contenidas por este manual: para baja calidad 70 puntos, 415 puntos para el clasificado como de media calidad y al denominado como alta calidad alcanzó un puntaje de 700.

### **Muestras**

Se llevaron a cabo ocho muestreos para cada nivel de calidad, con un total de 24 muestreos para cada tipo de empresa (empaques y supermercados) por lo que resultaron

48 muestreos, se realizaron un total de tres determinaciones con una replica, por lo que se obtuvieron 912 datos para ser analizados. Para llevar a cabo el presente estudio se recolectaron de 3 a 4 frutos de tomates, con un peso aproximado de 300 gramos, se depositaron en bolsas ziploc previamente esterilizadas, se colocaron en una hielera y se transportaron a 4 °C al laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. unidad Culiacán. Las evaluaciones fueron realizadas dentro de las primeras 5 h, después de la recolección de las muestras.

En los empaque agrícolas las muestras se recolectaron utilizando guantes estériles, depositando los frutos en bolsa ziploc previamente esterilizada, se colocaron en una hielera y se transportaron a 4 °C al laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. unidad Culiacán. Las evaluaciones fueron realizadas dentro de las primeras 5 h, después de la recolección de las muestras.

Para el caso de supermercados, las manos del muestreador se esterilizaron antes de entrar al supermercado, con alcohol al 70%, para evitar contaminación cruzada al fruto. En los supermercados los frutos se colocaron en bolsas de alta densidad previamente esterilizadas, una vez fuera del supermercado los frutos se colocaron en bolsa ziploc estéril, se colocaron en una hielera y se transportaron a 4 °C al laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. unidad Culiacán. Las evaluaciones fueron realizadas dentro de las primeras 5 h, después de la recolección de las muestras.

## Preparación de los medios de cultivo y de enriquecimiento

### **Agar ECC (CHROMagar)**

Se utilizó el agar ECC (CHROMagar), para la determinación cromogénica de coliformes totales y *Escherichia coli*. Se prepararon para cada seis muestras 1000 mL del medio ECC.

Se pesaron 32.8 gr. de agar ECC en una balanza electrónica (Sartorius, LC42005) el contenido se colocó en un matraz de 2000 mL que contenía 1000 mL de agua purificada previamente medida en una bureta de 1000 mL, se tapo el matraz con papel aluminio y se colocó en una parrilla con agitación (Thermolyne, SP46925), se calentó hasta ebullición sin pasar los 100 °C para disolver completamente el agar. El vaciado a las cajas de petri se realizó en una campana de flujo laminar (Enviroco, PN31370) agregando aproximadamente 12 mL del agar a cada caja de petri.

### **Rappaport-Vassiliadis (RV)**

Para el enriquecimiento se utilizó Rappaport-Vassiliadis (RV), preparándose 600 mL para cada seis muestras, 100 mL para cada una.

Se pesaron 18 gr. de Rappaport-Vassiliadis en una balanza electrónica (Sartorius, LC42005) el contenido se colocó en un matraz de 1000 mL que contenía 600 mL de agua destilada previamente medida en una bureta de 1000 mL, se tapo el matraz con papel aluminio y se colocó en una parrilla con agitación (Thermolyne, SP46925), se



calentó hasta disolución completa. Después se esterilizó en autoclave a 121 °C, por 15 minutos. Finalmente se dejó enfriar y se procedió a su uso y/o a su almacenamiento hasta su uso.

### **Agar Rambach (CHROMagar )**

Para la determinación de *Salmonella*, se utilizó agar Rambach (CHROMagar), preparándose 1000 mL para cada seis muestras.

En un matraz de 2000 mL que contenía 1000 mL de agua purificada previamente medida en una bureta de 1000 mL, se colocó en una parrilla con agitación (Thermolyne, SP46925), se le adiciono el líquido suplementario, agitar y mezclar. Posteriormente se le adiciono el agar lentamente hasta observar un aumento de volumen se calentó hasta ebullición sin pasar los 100 °C para disolver completamente el agar. El vaciado a las cajas de petri se realizó en una campana de flujo laminar (Enviroco, PN31370) agregando aproximadamente 12 mL del agar a cada caja de petri.

### Preparación, enriquecimiento e identificación de la muestra

Se siguió la metodología utilizada por Awang *et al.*, (2003), con algunas modificaciones, la cual se describe a continuación

En una balanza electrónica (Sartorius, LC42005), se verificó que el peso de la muestra fluctuara dentro de los 300 gr. Posteriormente las muestras se colocaron sobre la

campana de flujo laminar (Enviroco, PN31370), previamente desinfectada con alcohol etílico al 95%, las muestras se procesaron con el mechero encendido, para crear un ambiente estéril y no alterar los resultados. Los medios de cultivo se rotularon con las claves individuales para cada muestra. Con una bureta estéril se agregaron 300 mL de agua purificada estéril a cada muestra que contenían los frutos de tomates enseguida se agitó manualmente durante 2 min, esto para que el posible contenido microbiano retenido en los frutos se dispersara en el agua. Posteriormente se retiraron los frutos de la bolsa.

#### **Identificación de *E. coli* y coliformes totales en empaques agrícolas**

Se utilizó agua purificada estéril como solución diluyente, se tomó 1 mL y 10 mL de cada muestra y se depositaron en un sistema de filtración compuesto por una bomba de vacío, Felisa (FE, 1500L), matraz kitazato, maníful (GelmanSciences, 15402), embudos de filtración (PALL, GelmanSciences), en el cual se colocaron una membrana con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ (PALL, Corporation). se depositó la membrana en las cajas ya rotuladas, se incubaron a 37 °C en una incubadora (VWR, 3015), todas las muestras se incubaron por 24 h aproximadamente (APHA, 1998).

Al día siguiente se observaron los resultados; los coliformes totales fueron cuantificados en un contador de colonias (Solbat, Q-20) y para *E. coli* se determinó la presencia-ausencia.

### **Identificación de *E. coli* y coliformes totales en supermercados**

Se utilizó agua purificada estéril como solución diluyente. Se tomaron 0.3 mL de cada bolsa Ziploc y se colocaron en un tubo de ensaye conteniendo 2.7 mL de agua estéril, se agitó en el vortex (Scientific Products, S8220), y así se obtuvo la dilución 1:10 y de esta se tomaron 0.3 mL y se depositaron en un nuevo tubo conteniendo 2.7 mL de agua esteril, se agitó en el vortex (Scientific Products, S8220), y así se obtuvo la dilución 1:100, así sucesivamente hasta obtener la dilución 1:10000. Esto se realizó para todas las muestras. Una vez obtenidas todas las diluciones de cada una de las muestras, se prosiguió a realizar la técnica de extensión en placa.

Se seleccionaron 0.1 mL y las diluciones 1:100 y 1:10000 para *E. coli* y coliformes totales. Se realizó la técnica de extensión en placa (APHA, 1998). De cada dilución se tomó 0.1 mL y se depositó en la caja ya rotulada con el medio ECC. Se incubaron a 37 °C en una incubadora (VWR, 3015), todas las muestras se incubaron durante 24 h.

Al día siguiente se observaron los resultados; los coliformes totales fueron cuantificados en un contador de colonias (Solbat, Q-20) y para *E. coli* se determinó la presencia-ausencia.

### **Identificación de *Salmonella* spp en empaques agrícolas y supermercados**

El agua restante de la determinación de *E. coli* y coliformes se colocó en frascos estériles con una capacidad de 250 mL, se equilibraron los pesos en una balanza electrónica (Sartorius, LC42005), se centrifugó a 4000 x g durante 25 min en una

centrífuga (Centra, CL3 Thermo IEC, rotor # 243). Se tomaron 10 mL del sobrenadante con una pipeta estéril y se depositaron en un matraz de 250 mL previamente esterilizado, se agregaron al mismo matraz 100 mL de Rappaport-Vassiliadis (RV) con la ayuda de una bureta esteril , todo esto se realizó en una campana de flujo laminar (Enviroco, PN31370), con un mechero encendido. Los matraces que contenían las muestras fueron incubados a 37 °C durante 19 ± 1 h.

Posterior al enriquecimiento se utilizó agua purificada estéril como solución diluyente. Se tomaron 0.3 mL de cada matraz y se colocaron en un tubo de ensaye conteniendo 2.7 mL de agua estéril, se agitó en el vortex (Scientific Products, S8220), y así se obtuvo la dilución 1:10 y de esta se tomaron 0.3 mL y se depositaron un en nuevo tubo conteniendo 2.7 mL de agua esteril, se agitó en el vortex (Scientific Products, S8220), y así se obtuvo la dilución 1:100, así sucesivamente hasta obtener la dilución 1:10000. Esto se realizó para todas las muestras. Una vez obtenidas todas las diluciones de cada una de las muestras, se prosiguió a realizar la técnica de extensión en placa (APHA, 1998).

Se seleccionaron 0.1 mL y las diluciones 1:100, 1:10000, 1:1000000 y 1:100000000. De cada dilución se tomó 0.1 mL y se depositó en la caja ya rotulada con el medio cromogenico Rambach. Se incubaron a 37 °C en una incubadora (VWR, 3015). todas las muestras se incubaron por 24 h aproximadamente.

Los resultados fueron expresados en base a la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. los resultados obtenidos fueron posteriormente confirmados mediante la PCR.

**Cuadro 2.** Medios de cultivo y de enriquecimiento para las distintas técnicas de laboratorio utilizadas para los diferentes microorganismos.

<b>Microorganismo</b>	<b>Medio de Cultivo y/o de Enriquecimiento</b>	<b>Técnica</b>
Coliformes Totales	Agar ECC	Extensión en placa (Supermercados) Filtración por membrana (Empaques)
<i>Escherichia coli</i>	Agar ECC	Extensión en placa (Supermercados) Filtración por membrana (Empaques)
	Rappaport	Crecimiento bacteriano
<i>Salmonella</i> spp	Agar Rambach	Extensión en placa

### Confirmación de *Salmonella* spp. por PCR

*Salmonella* spp fue confirmada a través de la PCR y se basó en la metodología utilizada por Wang *et al.*, (1997), con modificaciones, la cual se describe a continuación.

#### **Extracción del DNA**

Los resultados positivos obtenidos a través de los métodos convencionales además de controles positivos y negativos fueron confirmados mediante la PCR. Para la extracción del DNA, se utilizó el sistema Wizard® SV Genomic Purification System (Promega, Madison, WI, EUA). Una colonia positiva fue inoculada en 5 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB, Bioxon, México), se incubaron a 37 °C durante 19 ± 1 h, en una incubadora (VWR, 3015), se agregó 1 mL a microtubos de 1.5 mL, se centrifugó a 14,000 x g por 2 min., en una centrifuga (Heraeus, Biofuge primoR), se desechó el sobrenadante y se le agregó 600 µL de solución para lisis nuclear, se incubó a 80 °C por 5 min., en un termoblock (Fisher Scientific, 301N0074), enseguida se agregaron 3 µL de solución RNasa, se incubó a 37 °C por 30 min., en una incubadora (VWR, 3015), todo esto para romper la estructura o la pared de las bacterias, posteriormente se agregaron 200 µL de solución para la precipitación de proteínas, se incubó en hielo por 5 min., se centrifugó de nuevo a 14,000 x g por 3 min., en una centrifuga (Heraeus, Biofuge primoR), todo esto para separar al DNA de las proteínas histónicas o empaquetadoras de DNA, el sobrenadante obtenido se agregó a otro microtubo que contenía 600 µL de isopropanol el cual se mezcló hasta observar una pequeña masa

visible de DNA, después de esto se centrifugo a 14,000 x g por 2 min., en una centrifuga (Heraeus, Biofuge primoR), se tiró el sobrenadante y se agregaron 600 µL de etanol al 70 %. se centrifugo de nuevo a 14,000 x g por 2 min., en una centrifuga (Heraeus, Biofuge primoR), todo esto para lavar y deshidratar al DNA, se desechó el sobrenadante y se secó el DNA por 15 min. en aire seco, enseguida se añadieron 100 µL de solución para la rehidratación del DNA, finalmente se incubó a 65 °C con agitaciones periódicas por 1 h. En un temoblock (Fisher Scientific, 301N0074), se corrió un gel de agarosa al 1 % en electroforesis en una camara horizontal mini-gel (CBS Scientific) y una fuente de poder (Amersham Pharmacia Biotech, EPS-301) para asegurar la correcta extracción del DNA.

### **Electroforesis de comprobación**

Para la comprobación de una correcta extracción de DNA, se utilizó un gel de agarosa al 1 % con buffer TAE 1X a la que se le agregó 15 µL de bromuro de etidio para visualizar las bandas del DNA. La electroforesis se realizó en una camara horizontal mini-gel (CBS Scientific) a 100 mV por 30 min. en una fuente de poder (Amersham Pharmacia Biotech, EPS-301) Los resultados correctos, fueron seguidos de la amplificación por PCR.

### **Amplificación por PCR**

Para la amplificación de gen *invA* (gen blanco), se utilizaron los iniciadores (oligos o primers) Sal-3 TATCGCCACGFTTCGGGCAA y Sal-4

TCGCACCGTCAAAGGAACC. La mezcla madre (11.5  $\mu$ L volumen total) se preparó en microtubos de 0.5 mL, donde para cada muestra se agregaron 8.48  $\mu$ L de agua, 0.75  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 0.66  $\mu$ L de dNTPs, 1.25  $\mu$ L de buffer, 0.13  $\mu$ L de Sal-3, 0.13  $\mu$ L de Sal-4 y 0.1 de Taq polymerasa (Promega Madison, WI, EUA) Se mezcló perfectamente en un microtubo de 0.5 mL. En microtubos de 0.2 mL se agregaron 11.5  $\mu$ L de la mezcla madre para cada muestra y 1  $\mu$ L de muestra con excepción del blanco, se colocaron las muestras para su amplificación en el termociclador (Termo Hybaid PCR Express, SPRT 001 ISSUE 2) el cual se programó a 94 °C por 1 min. para la preincubación. Se desarrollaron 35 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 1 min. alineación de los iniciadores a 50 °C por 1 min. y extensión del DNA a 72 °C por 2 min. en cada ciclo. Después los tubos fueron incubados a 72 °C por 5 min. y finalmente a 4 °C hasta ser utilizados.

### **Electroforesis final**

Para la detección de la amplificación se utilizó un gel de agarosa al 1 % con buffer TAE 1X a la que se le agregó 15  $\mu$ L de bromuro de etidio para visualizar las bandas amplificadas esperando un producto final de 275 bp. La electroforesis se realizó en una cámara horizontal mini-gel (CBS Scientific) a 100 mV por 30 min en una fuente de poder (Amersham Pharmacia Biotech, EPS-301) y se usó un marcador de peso molecular (PCR Markers, Promega, 50-150-300-500-750-1000 pb).



## Fotografía

La revelación de la fotografía se realizó en sistema de computo que consta de una computadora (LG, Studio Works 563A), fotodocumentador (UVP, BioImaging Systems) y un revelador de fotos (UVP, Mitsubishi P91D).

## Diseño estadístico

El diseño estadístico utilizado fue de dos factores totalmente al azar. Donde el factor 1, esta representado por las empresas con dos niveles: supermercados y empaques agrícolas y el factor 2, lo representa el tipo de la empresa con tres niveles: bajo, medio y alta calidad.

## Análisis estadístico

Para el caso de coliformes totales se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), realizando una ANOVA, donde el modelo fue:

$$Y_{ijlc} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + E_{ijlc}$$

$\tau_i$  = Efecto de empresa

$\beta_j$  = Efecto del nivel

$(\tau\beta)_{ij}$  = Efecto de interacción empresa-nivel

### **Análisis Descriptivo**

Para el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp. el trabajo se enfocó a la presencia o ausencia, por lo cual se realizó un análisis descriptivo

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab, Versión 14.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio en frutos de tomate, muestran que coliformes totales, *E. coli* y *Salmonella* spp son bacterias que pueden ser encontradas en la superficie de tomates ya tanto en empaques agrícolas como en supermercados.

El análisis de resultados se presenta para cada una de las bacterias en estudio, discutiendo efectos principales e interacciones significativas.

### Análisis de Varianza

**Efectos principales para coliformes totales.** La tabla ANOVA de coliformes totales (cuadro 3) muestra que el efecto principal de los factores empresa y nivel de calidad resultaron ambos significativos ( $p = 0.000$ ). Estas diferencias se pueden observar en las figuras 3 y 4.

Mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) se encontraron diferencias significativas en las empresas y en los niveles de calidad, las cuales se muestran a continuación:

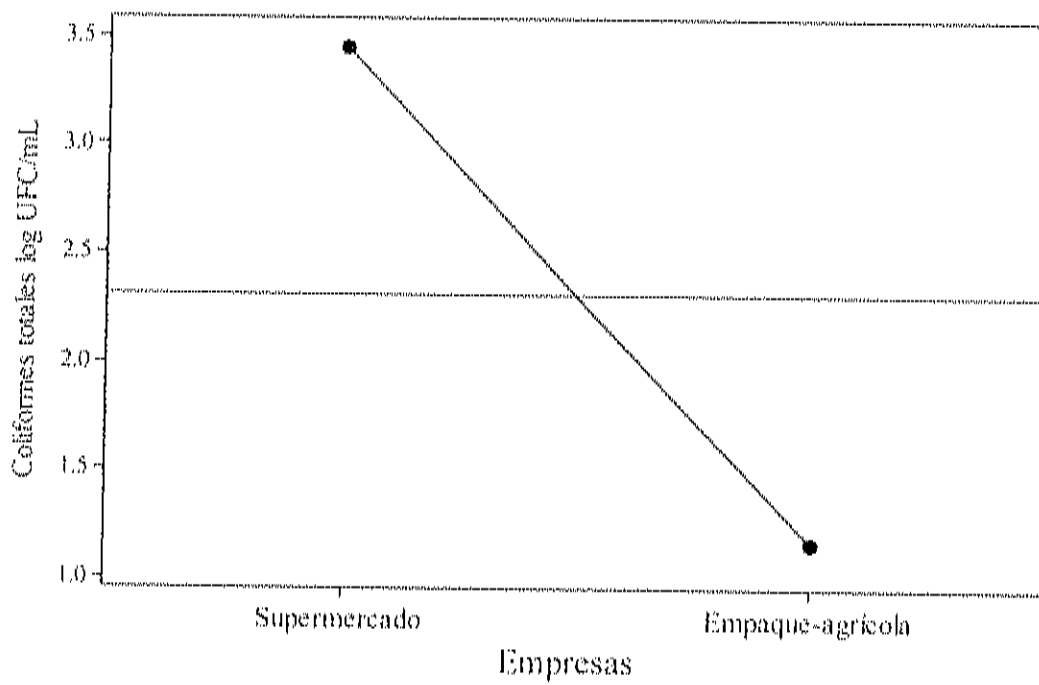
Empresas:	Supermercados	Empaques agrícolas	
	-----	-----	
Nivel de calidad:	Alta	Media	Baja
	-----	-----	-----

La prueba de Tukey y la ANOVA (cuadro 3) nos señalan que las empresas que muestra un mayor nivel de contaminación son los supermercados, ya que estos lugares son mayormente visitados por los clientes, también existe una mayor manipulación del fruto lo que implica una mayor contaminación cruzada cliente-fruto.

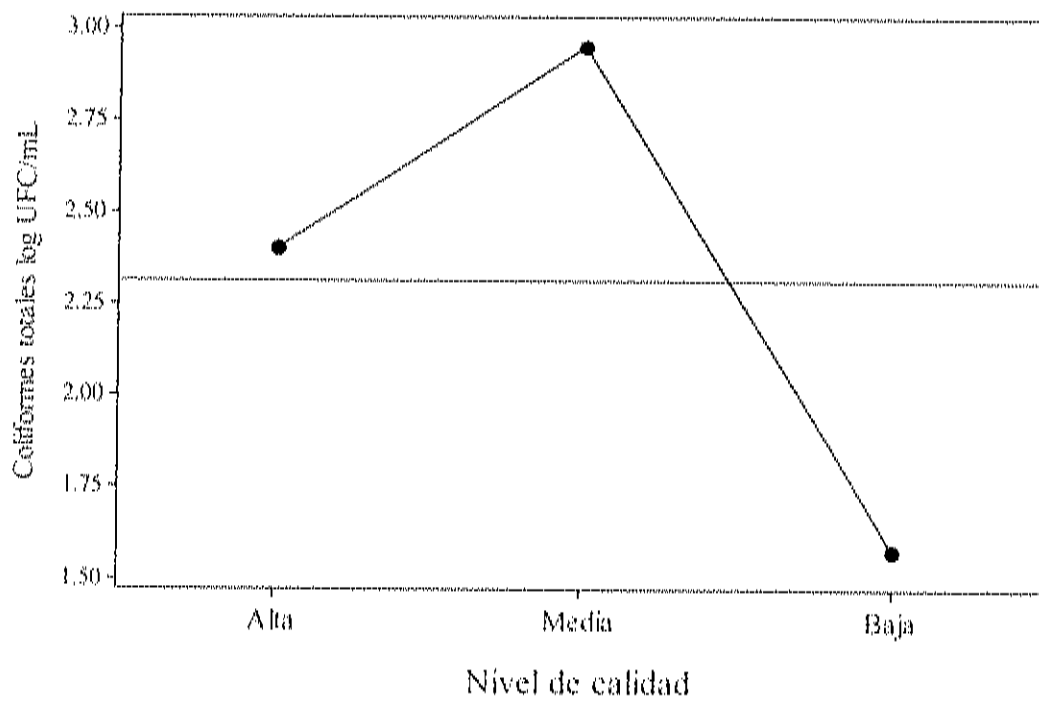
Los niveles de calidad que mostraron una mayor contaminación de los frutos de tomate fueron los de media y alta calidad en los que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El nivel de calidad con menor contaminación fue el de baja calidad que sí mostró diferencias significativas con los de media y alta calidad.

**Cuadro 3.** ANOVA de colíformes totales

<b>Fuente</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Seq SS</b>	<b>Adj SS</b>	<b>Adj MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Empresa	1	62,360	62,360	62,360	84,23	0,000
Nivel de Calidad	2	15,288	15,288	7,644	10,32	0,000
Empresa*Nivel de Calidad	2	0,865	0,865	0,432	0,58	0,562
Error	42	31,095	31,095	0,740		
Total	47	109,607				



**Figura 3.** Efectos principales: coliformes totales en supermercados y empaques agrícolas



**Figura 4.** Efectos principales: coliformes totales en los distintos niveles de calidad (baja, media y alta calidad)

**Efecto de Interacción para coliformes totales.** La interacción empresa\*nivel de calidad no fue significativa ( $p = 0.562$ ) (figura 5). Como se puede ver en la figura 5, el paralelismo obtenido en los resultados nos muestra que no hay interacciones. Podemos ver también que las empresas con mayor presencia de coliformes son los supermercados y el nivel mas alto es el señalado como de media calidad en ambas empresas.

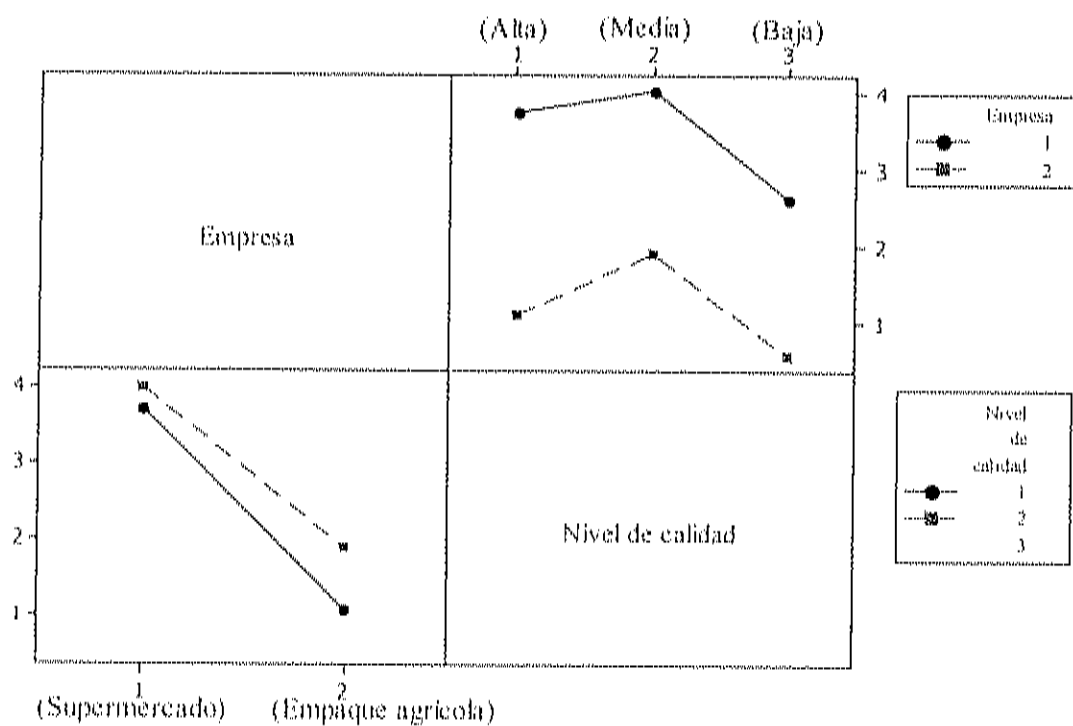


Figura 5. Efecto de la interacción Empresa-Nivel de calidad para coliformes totales.



**Cuadro 4.** Resultados de coliformes totales, expresados en log<sub>10</sub> (UFC/mL)

<b>Calidad</b>	<b>Supermercados<sup>a</sup></b>	<b>Empaques agrícolas<sup>b</sup></b>
	<b>coliformes totales</b>	<b>coliformes totales</b>
Alta	4.07	1.76
Media	4.63	2.72
Baja	3.13	0.64

<sup>a</sup> Nivel de calidad en base a infraestructura, limpieza, diseño arquitectónico, higiene y capacitación de personal

<sup>b</sup> Nivel de calidad en base al manual de calidad elaborado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

En ambas empresas el comportamiento de los niveles de calidad son muy semejantes, sobresaliendo en mayor presencia de coliformes totales en los mercados como de media calidad, la razón de tal acontecimiento puede ser el mayor visita de clientes existente en estas empresas, lo que motiva una mayor contaminación por coliformes totales.

Ambas empresas en todos sus distintos niveles de calidad muestran la presencia de coliformes totales, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Hirotsani *et al.*, (2002), en un estudio en el que analizaron la superficies de vegetales en los cuales incluían a tomates de supermercados en Estados Unidos y México, quienes reportaron la presencia de coliformes totales en cada muestra analizada. Mukherjee *et al.*, (2004), en un estudio similar realizado en empaques orgánicos y convencionales de Minnesota, donde se analizaron vegetales que incluían tomates, reportaron una media (log) de la cuantificación de coliformes en número más probable por gramo de 2.3 y 1.9 para empaques orgánicos y convencionales respectivamente.

Okafo *et al* (2003), señala que por cada 45 coliformes totales existe la probabilidad de que se encuentre una bacteria patógena, lo cual indica un riesgo a la salud, sobre todo en personas que el sistema inmune deficiente, tal es el caso de niños, ancianos y personas inmunocomprometidas.

### **Resultados de *E. coli*.**

Los resultados para *E. coli*, se representan en la cuadro 5. Donde podemos observar que los niveles mas altos fueron encontrados en supermercados, sobre todo en los seleccionados con el nivel medio de calidad, esto se debe posiblemente porque son los mas visitados por el consumidor, debido a su amplia distribución en la ciudad, por tal motivo el fruto es tocado por las manos de una mayor cantidad de clientes al hacer estos una selección del fruto, lo que produce una mayor contaminación cruzada cliente-fruto. En contraparte los señalados con el nivel de calidad bajo fueron los que mostraron menor nivel de contaminación por *E. coli*, la razón de estos resultados podría ser que en estos establecimientos el cliente casi no manipula el fruto sino generalmente compra cajas, lo que evita el contacto mano-fruto.

Lo que corresponde a empaques agrícolas podemos observar que el nivel de contaminación por *E. coli* es menor a los supermercados, esto porque existe una desinfección del fruto y el contacto por trabajadores es mínimo. Un punto importante es que los empaque señalados como de baja calidad sean los que mostraron resultados menor contaminación, nosotros proponemos que puede ser por la alta temperatura alcanzada por el fruto al ser transportada al empaque, ya que el fruto es transportado por una distancia de 100 Km. en camiones tapados solamente con malla sombra. La temperatura ambiente en estos lugares es de 30-40 °C aproximadamente, por lo que el fruto al ser transportado en las condiciones señaladas podría alcanzar temperaturas aproximadas a 50-60 °C. Lo que evita la sobrevivencia de las bacterias seleccionadas en

el presente estudio, ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento de estas bacterias fluctúan entre 37- 45 °C.

**Cuadro 5.** Resultados de *E. coli*, presencia-ausencia

Calidad	Supermercados <sup>a</sup>	Empaques agrícolas <sup>b</sup>
	<i>E. coli</i> <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> <sup>c</sup>
Alta	<sup>d</sup> 1/8 <sup>e</sup>	<sup>d</sup> 1/8 <sup>e</sup>
Media	4/8	1/8
Baja	0/8	0/8

<sup>a</sup> Nivel de calidad en base a infraestructura, limpieza, diseño arquitectónico, higiene y capacitación de personal.

<sup>b</sup> Nivel de calidad en base al manual de calidad elaborado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

<sup>c</sup> Presencia de *E. coli* en el total de muestras analizadas.

<sup>d</sup> Muestras positivas.

<sup>e</sup> Total de muestras analizadas.

Mukherjee *et al.*, (2004), en un estudio realizado en empaques orgánicos y convencionales de Minnesota, donde se analizaron vegetales que incluyen tomates, reportaron un porcentaje de 1.6 y 9.7 % en empaques convencionales y orgánicos respectivamente. Hirotani *et al.*, (2002) demostraron la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en los que se incluye a *E. coli* en la superficie de vegetales entre ellos tomates, obtenidos de mercados en E.U.A. y México. La presencia de estos microorganismos indicadores de contaminación fecal se relaciona con la posible presencia de patógenos como lo es *Salmonella* spp.

### **Resultados de *Salmonella* spp.**

En el presente trabajo se muestran ocho resultados positivos mediante el método de cultivo en agar (Rambach), en supermercados, sin embargo, la comprobación por PCR, arrojó solamente una muestra positiva, lo cual nos indica la falta de especificidad de este medio de cultivo y hace necesario que para la detección de *Salmonella* se realice la comprobación por PCR, debido a que combina la simplicidad con una alta especificidad y sensibilidad para la detección de bacterias patógenas en alimentos como lo indican Kimura *et al.*, (1999) para la obtención de un resultado mas confiable. *Salmonella* estuvo ausente en las muestras obtenidas y analizadas de supermercados denominados de alta calidad obteniendo dos falsos positivos en medio de cultivo Rambach, esto se debe posiblemente a la buena selección de proveedores, capacitación del personal, condiciones de higiene en el cuidado del fruto, cómo lo señalan Thunberg *et al.*, (2002) estos supermercados tanto sus proveedores por los resultados obtenidos aprovechan los adelantos en agricultura, procesado, distribución y mercadeo para ofrecer un mejor producto al consumidor cada año. En los supermercados denominados de baja calidad resulto una muestra positiva para *Salmonella* en la comprobación de PCR y tres falsos positivos en el medio de cultivo Rambach, esto porque como pudimos observar en nuestros muestreos muchos de estos establecimientos compran frutos que no cumplen los requisitos para ser exportados y en algunos casos son extraídos directamente del campo sin ser desinfectados, además de las malas instalaciones y poca higiene de estos lugares, pueden ser posiblemente la causa de estos resultados. En los supermercados

denominados de media calidad obtuvimos dos falsos positivos en Rambach y ausencia en la comprobación por PCR (CUADRO 6).

**Cuadro 6.** Incidencia de muestras positivas para *Salmonella* en supermercados

Calidad <sup>a</sup>	Medio de cultivo (Rambach) <sup>b</sup>	Comprobación (PCR) <sup>c</sup>
Alta	<sup>d</sup> 2/8 <sup>e</sup>	<sup>d</sup> 0/8 <sup>e</sup>
Media	3/8	0/8
Baja	3/8	1/8

<sup>a</sup> Nivel de calidad en base a infraestructura, limpieza, diseño arquitectónico, higiene y capacitación de personal.

<sup>b</sup> Enriquecimiento en Rappaport-Vassiliadis e incubación a 37°C en Rambach.

<sup>c</sup> Reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>d</sup> Muestras positivas.

<sup>e</sup> Total de muestras analizadas.

Son pocos los estudios realizados sobre la calidad microbiológica de hortalizas en supermercados, unos muestran resultados positivos para *Salmonella* y en otros estudios muy similares los resultados son negativos. Awang *et al.*, (2003), en un estudio realizado en mercados de Selangor, Malaysia, demostraron al igual que en nuestro estudio la presencia de *Salmonella* en frutos vegetales, aunque no en tomates, pero sí, en frutos comunes en esa región como lo son selom (*Oenanthe stolonifera*), Pegaga (*Centella asiatica*), Kangkong (*Ipomoea aquatica*) y Kesum (*Polygonum minus*). Por el contrario, Thunberg *et al.*, (2002), mostraron resultados negativos en la presencia de *Salmonella* en frutos como alfalfa, brócoli, coliflor, pepino, lechuga., obtenidos de supermercados del área metropolitana de Washington. Johannessen *et al.*, (2002), demostraron en su estudio bacteriológico de productos frescos obtenidos de supermercados en Noruega, resultados negativos para *Salmonella*. Aquí los frutos examinados fueron lechuga, hierbas, champiñones, fresas.



En el cuadro 7, podemos observar los resultados obtenidos de los empaque agrícolas, los mismos que muestran ausencia total de *Salmonella* en todos los empaque tanto de alta, media y baja calidad, muestran coincidencia con los obtenidos por Mukherjee *et al.*, (2004), en un estudio similar realizado en empaques orgánicos y convencionales de Minnesota, donde se analizaron vegetales que incluían tomates, reportaron ausencia total de *Salmonella* en tomates, pero se logró un aislamiento de *Salmonella* en lechuga y otro en pimientos verdes. Podemos argumentar nuestros resultados señalando que la dosis de cloro utilizada en estos empaque es suficiente para la eliminación de patógenos que posiblemente puedan acarrear del campo y que el tiempo de la desinfección al empacado es muy poco, lo mismo que el contacto con el fruto, lo que hace poco probable una posible contaminación sobre todo de bacterias de origen fecal, claro que es mas factible una contaminación por coliformes ya que estas pueden tener un origen no fecal y se encuentran muy comúnmente en el ambiente.

**Cuadro 7.** Incidencia de muestras positivas para *Salmonella* en empaque agrícolas

Calidad <sup>a</sup>	Medio de cultivo (Rambach) <sup>b</sup>	Comprobación (PCR) <sup>c</sup>
Alta	<sup>d</sup> 0/8 <sup>e</sup>	<sup>d</sup> 0/8 <sup>e</sup>
Medio	0/8	0/8
Baja	0/8	0/8

<sup>a</sup> Nivel de calidad en base a infraestructura, limpieza, diseño arquitectónico, higiene y capacitación de personal.

<sup>b</sup> Enriquecimiento en Rappaport-Vassiliadis e incubación a 37°C en Rambach.

<sup>c</sup> Reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>d</sup> Muestras positivas.

<sup>e</sup> Total de muestras analizadas.

### **Resultados de la comprobación por PCR**

La comprobación por PCR, muestra un resultado positivo de los ocho obtenidos de los métodos convencionales. en la figura 6, observamos el gel de agarosa seccionado en dos partes, en el pozo 9 y 10 observamos las líneas del marcador de peso molecular, con el que nos basamos para poder señalar si las muestras alcanzaron el número de pares de bases finales que caracterizan al gen específico para los primers utilizados como lo indica Wang *et al.*, (1997) en el pozo 13 podemos observar la amplificación que es una de las muestras de supermercados de baja calidad, en los pozos 7, 14, 15 y 16 también se observan amplificaciones pero estas son de los controles positivos. Los pozos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 12 muestran los resultados de las siete muestras restantes, en las que no se observa amplificación ya que se trata de falsos positivos para *Salmonella* spp. en el medio de cultivo Rambach. Los pozos 8 y 11 representa el control negativo.

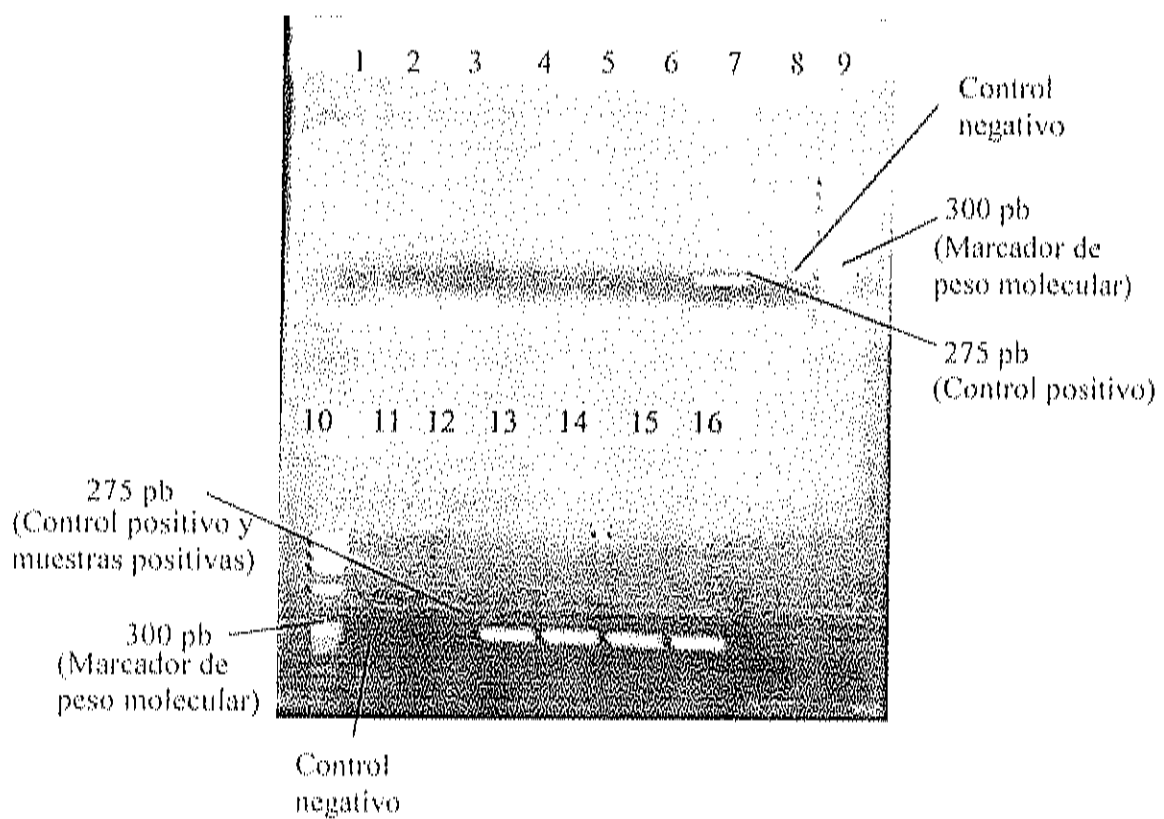


Figura 6. Resultados de la amplificación en el gel de agarosa

## CONCLUSIONES

La mayor contaminación se presentó en tomates obtenidos de empaques agrícolas y supermercados de media calidad.

*Salmonella* spp. fue aislada de tomates obtenidos de supermercados de baja calidad.

*E. coli* fue aislada de tomates obtenidos de empaques agrícolas de alta y media calidad.

*E. coli* fue aislada de tomates obtenidos de supermercados de alta y media calidad.

La técnica de la PCR mostró ser efectiva en la identificación de cepas del género *Salmonella* obtenidas de medio de cultivo selectivo.

## SUGERENCIAS

Se recomienda para posteriores estudios a realizar en este campo de investigación, la realización de un mayor número de muestreos.

Realizar pruebas de sensibilidad en posteriores estudios.

Igualmente se sugiere la realización de pre-enriquecimiento de las muestras a evaluar para la comparación de resultados con este estudio.

## LITERATURA CITADA

- American Public Health Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 ed. Washington, D. C.
- Asplund, K., and Nurmi, E., 1991. The growth of *Salmonellae* in tomatoes. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 177-182.
- Awang, N. S., Rusul, G., Hassan, Z., Reezal, A., Hajar, S. I., Nishibuchi, M., Radu, S., 2003. Incidence of *Salmonella* spp. in raw vegetables in Selangor, Malaysia. *Food Control.* 14, 475-479.
- Bancomext., 2004. Alimentos frescos. Guía de exportación sectorial. México, D.F. p. 11, 12, 80.
- Bell, A., Kryakides, A., 1998. *E. coli* a practical approach to the organism and its control in food. Blackie Academic & Professional. Londres, P. I.
- Bellido, B.J.B., González, M.F., Arnedo, P.A., Galiano, A.J.V., Safont, A.L., Herrero, C.C., Criado, J.J., Mesanza, del N.I., 1996. Brote de infección alimentaria por *Salmonella* Enteritidis. Posible efecto protector de las bebidas alcohólicas. *Medicina Clínica.* 107, 641-644.
- Beuchat, L. R., 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Center for food safety and quality enhancement. University of Georgia, Griffin, Georgia, USA.

- Beuchat, L. R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59, 204-216.
- Bhagwat, A. A., 2004. Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. *Food Microbiology.* 21, 73-78.
- Bitton, G., 1994. Wastewater microbiology. Wiley-Liss, New York. p. 101-102.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg, 16ª Ed. Trad. Del inglés por Pérez G.J., Edit. Manual Moderno. México D.F., pag. 267-282.
- CAADES., 2000. Reporte de productos exportados temporada 1999-2000. Culiacán, México.
- CAADES., 2002. Reporte de productos exportados temporada 2001-2002. Producción de hortalizas en Sinaloa, exportaciones de tomate en Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
- Castro, del C. N. 2002. Sobrevivencia de *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. Tesis de Maestría; Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. Unidad Culiacán,
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Multi-state outbreak of *Salmonella* serotype Montevideo infection. Publication EPI-AID, 93-97. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. Ga.
- Chaidez. Q.C. 2002. Inocuidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Efectos del Agua Contaminada. *Agua Latinoamericana.* 2, 36-39.



- Chávez-de la Peña, M.E., Higuera, I.A.L., Huertas, J.M.A., Báez, M.R., Morales de L.J., Arteaga, C.F., Rangel, F.M.S., León, R.S.P., 2001. Brote por *Salmonella* Enteritidis en trabajadores de un hospital. *Salud pública de México*. 43, 211-216.
- del Cerro, A., Soto, S.M., Mendoza, M.C., 2003. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology*. 20, 431-438.
- De Roever, C., 1998. Microbiology safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*. 9, 321-347.
- Díaz, S.R., and Vernon, C.J., 1999. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2, 133-136.
- Ercolani, G.L., 1976. Bacteriological quality assessment of fresh market lettuce and fennel. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 847-852.
- Gawande, P.V., and Bhagwat, A.A., 2002. Inoculation onto Solid Surfaces Protects *Salmonella* spp. during Acid Challenge: a Model Study Using Polyethersulfone Membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 86-92.
- Gaxiola, H.E., 1998. Nafta y exportación de hortalizas de Sinaloa: impactos en el empleo. *La revista del doctorado*. No. 2. Culiacán, México.
- Gerba, C.P., 1987. Phages as indicators of fecal pollution., in: *Phage Ecology*. Goyal, S.M., Gerba, C.P., Bitton, G. Eds. Wiley Interscience, New York, p. 197-209

- Guo, X., Chen, J., Beuchat, L.R., and Brackett, R.E., 2000. PCR Detection of *Salmonella enterica* Serotype Montevideo in and on Raw Tomatoes Using Primers Derived from *hlyA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5248-5252.
- Guo, X., Chen, J., Brackett, R.E., and Beuchat, L.R., 2001. Survival of Salmonellae on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruit Development through Fruit Ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4760-4764.
- Gutiérrez, C.L., Montiel, V.E., Aguilera, P.P., González, A.M., 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud pública de México.* 42, 490-495.
- Harris, L.J., Beuchat, L.R., Kajs, T.M., Ward, T.E., and Taylor, C.H., 2001. Efficacy and Reproducibility of a Produce Wash in Killing *Salmonella* on the Surface of Tomatoes Assessed with a Proposed Standard Method for Produce Sanitizers. *J. Food Prot.* 64, 1477-1482.
- Hirotsani, H., Naranjo, J., Moroyoqui, P.G., and Gerba, C.P., 2002. Demonstration of Indicator Microorganisms on Surface of Vegetables on the Market in the United States and Mexico. *J. of Food Science.* 67, 1847-1850.
- Holt, G.J., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Hoorfar, J., Baggesen, D.L., Porting, P.H., 1999. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *J. of Microbiol. Methods.* 35, 77-84.

- Infoagro., 2001. El cultivo de tomate. Morfología y taxonomía. Plagas y enfermedades. [Infoagro.com/hortalizas/tomate.2.asp](http://Infoagro.com/hortalizas/tomate.2.asp)
- [Infoagro.com/hortalizas/tomate.htm](http://Infoagro.com/hortalizas/tomate.htm), 2003.
- Johannessen, G.S., Loncarevic, S., Kruse, H., 2002. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 199-204.
- Karp, G., 2003. *Biología Celular y Molecular*, 1era. Ed. Trad. Del Ingles por Pérez, G.J. Edit. McGraw-Hill Interamericana. Pag. 389-399.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T., and Flood, S.J.A., 1999. Evaluation of TaqMan PCR Assay for Detecting *Salmonella* in Raw Meat and Shrimp. *J. Food Prot.* 62, 329-335.
- Koneman, E.W., Stephen, D.A., Dowell, V.R., Janda, W.M., Herbert, M.S., Washington, C.W., 1998. *Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color*. 3ª Ed. Trad. Del Ingles por Meerot, N.G. y Roel, B.E., Edit. Panamericana. México. p. 230.
- Kumate, J. and Isibasi, A., 1986. Pediatric diarrheal diseases: A global perspective. *Pediatr. Infect. Dis.* 5, 21-27
- Kumate, J., 1988. Morbilidad y mortalidad por diarreas en México. En: *Enfermedades diarreicas en el niño*. Edit. Torregrosa Ferrás L, Olarte J, Rodríguez Suárez RS, Santos Preciado J. I, Velásquez Jones L., Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México <<Federico Gómez>>, 9ª ed., México. D.F. p. 11-19.

- Kvenberg, J., Stolla, P., Stringfellow, D. and Garrett, E.S., 2000. HACCP development and regulatory assessment in the United States of America. *Food Control*, 11, 387-401.
- McPherson, M.J., and Moller, S.G., 2001. *The Basics. PCR*. Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
- Moore, J., 1999. Convención annual FPAA. Incrementos en el consumo de tomate. *Productores de hortalizas*. Año 8, No. 1 p.46.
- Motarjemi, Y. and Kläferstein, F., 1999. Food safety, Hazard Analysis and Critical Control Point and the increase in foodborne diseases: a paradox?, *Food Control*. 10, 325-333.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Díez-Gonzalez, F., 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J. Food Prot.* 67, 894-900.
- NACMCF, National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods., 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *J. Food Control*. 10, 117-143.

- Nogva, H.K., Lillehaug, D., 1999, Detection and quantification of *Salmonella* in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *Int. J. Food. Microbiol.* 51, 191-196.
- Olarte, J., 1986. El problema de las diarreas infecciosas. *Bol. Epidemiol.*, 1, 61-65.
- Olayemi, A.B., 1997. Microbiological hazards with agricultural utilization of urban polluted river water. *Int. J. Environ. Health Res.* 7, 149:154.
- Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Cé, M.C., Rocha, S.L.S., and Canal, C.W., 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology.* 36, 217-221.
- Oliveira, S.D., Santos, L.R., Schuch, D.M.T., Silva, A.B., Salle, C.T.P., and Canal, C.W., 2002. Detection and identification of *Salmonella* from poultry by PCR. *Veterinary Microbiology.* 87, 25-35.
- Okafo, C.N., Umoh, V.J., Galadima, M. 2003. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. *The Science of the Total Environment.* 311, 49-56.
- Petrifilm 3M, 1998. Productos de microbiología. St. Paul MN, 55144-1000 E.U.
- Rick, C.M., 1978. The tomato, *Scientific American.* New York, p. 75-55
- Rodríguez, A. G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México.* 44, 464-475.

- Schuenzel, K.M., and Harrison, M.A., 2002. Microbial Antagonists of Foodborne Pathogens on Fresh, Minimally Processed Vegetables. *J. Food. Prot.* 65, 1909-1915.
- Siller, C.J.H., Báez, S.M.A., Sañudo, B.A., Báez. S.R., 2002. Manual de buenas prácticas agrícolas: Guía para el agricultor; Buenas prácticas agrícolas para frutas y hortalizas frescas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. p. 1-62.
- Siller, C.J.H., Báez, S.M.A., Sañudo, B.A., Muy, R.M.D., 2002. Manual de calidad: Verificación interna, POES y registros para unidades de producción y empaque de frutas y hortalizas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. p. 1-73.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M., 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20, 339-343.
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. Stanford University. 4<sup>a</sup>. Ed. Freeman W.H. and company, New York.
- Tan, W., Shelef, L.A., 1999. Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. *J. Microbiol. Methods*. 37, 87-91.
- Taylor, J.B., 1986. *The tomato crop*. Ed. By Atherton and Rudich. Great Britain, p. 659.

- Terragno, R., Caffer, M.L., Bruno, S., Binsztein, N., 2003. Manual de procedimientos *Salmonella*: Parte I: Aislamiento, identificación y serotipificación. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Argentina. P. 1-4.
- Thunberg, L.R., Tran, T.T., Bennett, R.W., Matthews, R.N., and Belay, N., 2002. Microbial Evaluation of Selected Fresh Produce Obtained at Retail Markets. *J. Food Prot.* 65, 677-682.
- Vantarakis, A., Komnínou, G., Venieri, D., and Papapetropoulou, M., 2000. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. In mussels. *Environ. Microbiol.* 48, 105-109.
- Vásquez, A.J., and Cabral, M.A., 2001. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. *Infancia*, 28, 4-13
- Vijayakumar, C. and Wolf-Hall, C.E. 2002. Minimum bacteriostatic and bactericidal concentrations of household sanitizers for *Escherichia coli* strains in tryptic soy broth. *Food Microbiology*, 19, 383-388.
- Wang, R.F., Cao, W.W., and Cerniglia, C.E., 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83, 727-736.
- Way, J.S., Josephson, K.L., Pillai, S.D., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P., and Pepper, I.L., 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex Polymerase Chain Reaction. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64, 1473-1479

- Wei, C.J., Huang, T.S., Kim, J.M., Lin, W.F., Tamplin, M.L., and Bartz, J.A., 1995. Growth and Survival of *Salmonella montevideo* on Tomatoes and Disinfection with Chlorinated Water. *J. Food Prot.* 58, 829-836.
- Zhuang, R.Y., Beuchat, L.R., and Angulo, F.J., 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in Raw Tomatoes as Affected by Temperature and Treatment with Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2127-2131.



## ANEXOS

Fórmulas, Preparación de Medios de Cultivo e Interpretación**CHROMagar™ Rambach Agar**

CHROMagar™ Rambach Agar	
Fórmula por litro de agua	
Agar opaco	20.0 g
Propylene glycol	10.4
Mezcla cromogenica	2.7
Peptona y extracto de levadura	8.0
Cloruro de sodio	5.0
pH final : 7.2 +/-0.2	

## Preparación:

1. Preparar 1000 ml. de agua purificada. Adicionar el contenido líquido suplementario, agitar y mezclar.
2. Dispersar lentamente el polvo en agua rotando hasta que el agar se aumente de volumen y se disuelva completamente.
3. Hervir (100 °C) revolver o agitar repetidamente. Continuar hasta que se derrita totalmente el agar.

4. Enfriar a 45 °C aproximadamente, mover y agitar suavemente hasta homogenizar antes de vaciar a las cajas de petri.
5. El medio puede ser mantenido por un día a temperatura ambiente o almacenarlo por varios días en refrigeración. (mantener en la oscuridad).
6. El medio se incuba de 35 a 37 °C.

Interpretación:

*Salmonella* ----- Roja

Varios coliformes ----- Azules o violetas

*Proteus*, etc. ----- Incoloras

## CHROMagar™ ECC

---

### CHROMagar™ ECC

Fórmula por litro de agua

---

Agar	15.0 g
Mezcla cromogenica	4.8
Peptona y extracto de levadura	8.0
Cloruro de sodio	5.0

---

pH final : 7.2 +/-0.2

#### Preparación:

1. De acuerdo con la cantidad deseada, peso y uso, la proporción es de 32,8 g/L de agua purificada o use una dosis total pre-pesada con el volumen correspondiente de agua purificada.
2. Dispersar lentamente el polvo en agua rotando hasta que el agar se aumente de volumen y se disuelva completamente.
3. Hervir (100 °C) revolver o agitar repetidamente. Continuar hasta que se derrita totalmente el agar.
4. Enfriar a 45 °C aproximadamente, mover y agitar suavemente hasta homogenizar antes de vaciar a las cajas de petri.
5. Almacenar en la oscuridad antes de usarse
6. El medio se incuba a 30 o 44 °C, si se trata de coliformes totales o fecales respectivamente

Interpretación:

*E. coli*----- Azul

Varios coliformes ----- violetas

Otras bacterias gram negativas----- Incoloras

### Preparación de Caldo de Enriquecimiento

#### **Rappaport-Vassiliadis (RV)**

---

Rappaport-Vassiliadis (RV)	
Fórmula por litro de agua	
Peptona de soja	5.0 g
Cloruro sódico	8.0
Fosfato monopotásico	1.6
Cloruro de magnesio	40.0
Verde de malaquita	0.04

---

#### Preparación:

1. De acuerdo con la cantidad deseada, peso y uso, la proporción es de 30 g/L. de agua destilada o use una dosis total pre-pesada con el volumen correspondiente de agua destilada.
2. Calentar suavemente hasta disolución completa.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C, por 15 minutos.
4. Almacenar protegido de la humedad, hasta ser utilizado.

## Preparación de componentes de la PCR

### Agarosa al 1%

1. Pesar 0,3 g de agarosa y agregarse a un matraz de 250 mL.
2. Agregar también al matraz 30 mL de buffer Tris acetato-EDTA (TAE) 1X.
3. Calentar por 20 segundos en microondas.
4. Enseguida realizar calentamientos de 5 segundos hasta observar una total disolución de la agarosa en el buffer TAE 1X.
5. Enfriar a 45 °C, arroximadamente al chorro de agua.
6. Agregar 15 µL de bromuro de etidio
7. Depositar el contenido final al recipiente de la cámara de electroforesis que contiene el peine necesario, para el numero de orificios que se requieran.
8. Finalmente se deja enfriar el gel.

NOTA: El buffer se vende como 20X, del cual se toma 25 mL, y se aforan a 500 mL con agua destilada, para así obtener una concentración final de 1X, que es como se requiere

**Buffer TAE 20X**

---

Buffer TAE 20X	
Tris base	96.8 g
Acido acético glacial	22.8 mL
EDTA 0.5M, pH 8.0	40.0 mL
Agua destilada	800.0 mL

---

### Colorante de carga (DYE)

Reactivos	Concentración	Cantidad
EDTA Na	50 mM	0.6 mL
Glicerol	30.0 %	1.8 mL
Azul bromofenol	2.5 %	0.6 mL
Agua bidestilada estéril		3.0 mL



### **Solución de bromuro de etidio**

Concentración final ----- 0.5 mg/mL

Solución stock añadir ----- 25 mg (1000X)

Aforar con agua bidestilada a ----- 50 mL

Solución de trabajo ----- 0.5 ug/mL

La solución de trabajo para geles se obtiene haciendo la dilución 1: 1000 de la concentración final.

PELIGRO! Altamente carcinogénico, proteger de la luz, almacenar en contenedores opacos y cubiertos con aluminio.

### **Primers**

Los primers se necesitan a una concentración de 0.25 mg/mL. Por lo tanto se necesita agregar agua miliQ o HPLC estéril; al sal-3 346.6 microlitros y al sal-4 342.8 microlitros, así se tienen ya los primers a 1.0 mg/mL, que es el stock para almacenar. Se preparan alícuotas de cada uno de la siguiente manera: 25 microlitros del stock y 75 microlitros de agua miliQ o HPLC estéril. La concentración final de estas alícuotas será de 0.25 mcg/ml y listas para usarse en la reacción de la PCR.

**Volumen de componentes de la mezcla madre hasta 20 muestras (en microlitros)**

muestras	Agua	MgCl <sub>2</sub>	dNTP <sub>s</sub>	Buffer	Oligo 1	Oligo 2	Taq Pol
1X	8.48	0.75	0.66	1.25	0.13	0.13	0.1
2X	16.96	1.5	1.32	2.5	0.26	0.26	0.2
3X	25.44	2.25	1.98	3.75	0.39	0.39	0.3
4X	33.92	3	2.64	5	0.52	0.52	0.4
5X	42.4	3.75	3.3	6.25	0.65	0.65	0.5
6X	50.88	4.5	3.96	7.5	0.78	0.78	0.6
7X	59.36	5.25	4.62	8.75	0.91	0.91	0.7
8X	67.84	6	5.28	10	1.04	1.04	0.8
9X	76.32	6.75	5.94	11.25	1.17	1.17	0.9
10X	84.8	7.5	6.6	12.5	1.3	1.3	1
11X	93.28	8.25	7.26	13.75	1.43	1.43	1.1
12X	101.76	9	7.92	15	1.56	1.56	1.2
13X	110.24	9.75	8.58	16.25	1.69	1.69	1.3
14X	118.72	10.5	9.24	17.5	1.82	1.82	1.4
15X	127.2	11.25	9.9	18.75	1.95	1.95	1.5
16X	135.68	12	10.56	20	2.08	2.08	1.6
17X	144.16	12.75	11.22	21.25	2.21	2.21	1.7
18X	152.64	13.5	11.88	22.5	2.34	2.34	1.8
19X	161.12	14.25	12.54	23.75	2.47	2.47	1.9
20X	169.6	15	13.2	25	2.6	2.6	2

### Pasos para crear un nuevo programa en el termociclador

1. Conectar el equipo a un regulador y este a la corriente eléctrica.
2. Encender el equipo, del botón ubicado en la parte posterior.
3. Seleccionar "Files" con los botones ▲▼◀▶, y oprimir enter.
4. Seleccionar "New" con los botones ▲▼◀▶, y oprimir enter.
5. Con los botones ▲▼◀▶, ubicar en "Lid" para programar la temperatura de la tapa que generalmente se usa 103 °C.
6. Seleccionar "NOWAIT" con los botones ▲▼◀▶, y oprimir el botón "sel" para cambiar a WAIT.
7. Ubicar el cursor, una posición antes de END, con los botones ▲▼◀▶, para luego oprimir el botón "1", para registrar la primer temperatura con su tiempo.
8. Oprimir nuevamente el botón "1", para registrar la segunda temperatura y primera de los ciclos, correspondiente a la desnaturalización.
9. Nuevamente oprimir "1", para la segunda temperatura y tiempo del ciclo, correspondiente a la alineación del primers.
10. Oprimir "1", para registrar la temperatura y tiempo de extensión.
11. Oprimir el botón "4", para registrar desde donde iniciaran los ciclos y el numero de repeticiones, aparecerá "GOTO" aquí se coloca el 2, que donde iniciaran los ciclos y en "REP" el número de ciclos, generalmente de 30 - 40.

12. Oprimir una vez mas "1", para registrar la última temperatura y tiempo del programa.
13. Oprimir el botón "2" , aparecerá hold donde se colocara la temperatura de almacenamiento que es de 5 °C, también aparecerá finalmente enter.
14. Oprimir "enter" y luego "exit", aparecerá que sí se quiere salvar, oprimir "enter" en "YES", aparecerá para poner nombre al programa, esto con el botón "set" para las letras y ▲▼◀▶, para ir cambiando de posición.
15. Ya terminado de poner el nombre, oprimir "enter" y el programa estará registrado.
16. Oprimir "Exit" para ir al menú principal.

### **Correr un programa**

1. Seleccionar "STAR" oprimir "enter", aparecerán todos los programas registrados, seleccionar el indicado con los botones ▲▼◀▶.
2. Oprimir "enter" en dos ocasiones y el termociclador trabajara con el programa seleccionado.
3. Si cometimos un error y se desea detener el programa oprimir "star/stop" y luego "enter".
4. Si el programa se efectuó adecuadamente, al final solo oprimir "exit" y apagar el equipo.