

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETECCIÓN DE *Escherichia coli* Y

Salmonella spp. EN FRESA EN LA REGIÓN CENTRO NORTE DE MÉXICO

Tesis

Que presenta ROBERTO RÍOS VALADÉZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETECCIÓN DE *Escherichia coli* Y *Salmonella* spp. EN FRESA EN LA
REGIÓN CENTRO NORTE DE MÉXICO

Tesis

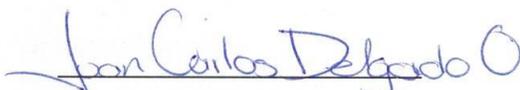
Que presenta ROBERTO RÍOS VALADÉZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Director UAAAN


Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Director Externo

Saltillo, Coahuila

Junio 2018

DETECCIÓN DE *Escherichia coli* Y *Salmonella* spp. EN FRESA EN LA
REGIÓN CENTRO NORTE DE MÉXICO

Tesis

Elaborada por ROBERTO RÍOS VALADÉZ como requisito parcial para obtener
el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



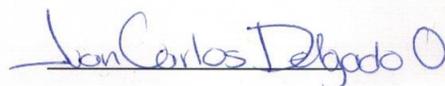
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor Principal



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor



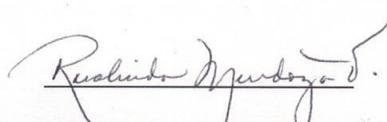
Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz

Asesor



Dra. Mariana Beltrán Beache

Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Subdirectora de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Junio 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado por parte del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme los medios para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por permitirme la oportunidad de crecer y desarrollar mis capacidades en todo momento.

Al Departamento de Parasitología, por todas las facilidades que me otorgó durante el desarrollo del proyecto y por los conocimientos brindados.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez, por su inigualable y muy apreciada amistad, por su apoyo incondicional en todo momento, y principalmente por su éxito profesional y personal que es un claro ejemplo a seguir.

A la Dra Yisa Maria Ochoa Fuentes, por su inigualable y muy apreciada amistad, por su apoyo incondicional en todo momento, y principalmente por su atención en cada aspecto de mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz y la Dra Mariana Beltrán Beache por su invaluable amistad, por apoyarme en mi desarrollo profesional así como personal y por guiarme durante la maestría.

Al M. Anselmo Hernández Pérez, por su amistad y generosidad, por su apoyo ante cualquier situación, gracias por estar y compartir conmigo.

Y a todos los Doctores que directa o indirectamente, participaron en la formación de mi persona en el ámbito laboral como personal.

Gracias.

DEDICATORIA

Principalmente a dios, que gracias a su obra nosotros podemos lograr cosas increíbles, y debemos estar agradecidos por cada aspecto, cada vivencia, cada prueba disfrazada de dificultad que nos hace realizar para lograr nuestro propósito.

A mi esposa Jazmín, por ser mi complemento y motivación, por comprender nuestra profesión y estar siempre conmigo viviendo cada momento.

A mis hijas Daniela y Diana, por motivarme a seguir adelante, gracias por dar alegría a mi vida.

A mi familia, mi papá Roberto, mi mamá Natalia, gracias por apoyarme en todo momento de esta aventura, a mis Hermanas, Miriam y Karla, gracias por su comprensión y buenos consejos.

Al señor Eugenio y la señora Ma. Esther, por su apoyo incondicional, por ayudarnos en el proceso de alcanzar el éxito.

A mis compañeros, Dolores, Valeria, Marisol, Saira, Ulises, por su valiosa amistad y compañerismo.

Índice

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Fresa	6
Valor Nutricional	6
Taxonomía y Morfología	8
Clasificación taxonómica	8
Importancia Económica	9
Comercio Internacional	9
Consideraciones para Exportación	10
Requisitos de Exportación	10
Ley de Protección Alimentaria en EE.UU.	11
Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETA)	12
Coliformes Totales y Fecales	13
<i>Salmonella</i> spp, Ubicación Taxonómica y Generalidades	14
Principales Enfermedades Causadas por <i>Salmonella</i> spp	15
Salmonelosis	15
Fiebre Tifoidea	16
<i>Escherichia coli</i>., Ubicación Taxonómica y Generalidades	17
Principales Enfermedades causadas por <i>E. coli</i>	17
Diarreas Causadas por <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ECET)	17
Colitis Hemorrágica	18

Contaminación de Alimentos Mínimamente Procesados	20
Precosecha	20
Cosecha	21
Post cosecha	22
Puntos de Venta	23
Alertas de Inocuidad	23
Casos de Alerta Sanitaria en Canadá	24
Reportes de brotes por ETA en Estados Unidos	25
Alertas sanitarias en México	26
Determinación de Indicadores de Inocuidad	28
Identificación Molecular de Microorganismos en Alimentos	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Muestreo	31
Conteo de Coliformes Totales en Placa	31
Aislamiento de Bacterias	32
Aislamiento de Salmonella	33
Aislamiento de <i>E. coli</i>	34
Tinción de Gram	35
Tinción de Flagelos	36
Detección Molecular	36
Extracción de ADN	36
Amplificación de PCR	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	60

LISTA DE CUADROS

Tabla 1.- Valor nutritivo de fresa, en 100g de alimento crudo en peso neto	7
Tabla 2.- Casos de alertas sanitarias en Canadá	24
Tabla 3.- Casos de Brotes de enfermedad en EE.UU.	26
Tabla 4.- Alertas sanitarias México	27
Tabla 5.- Boletín epidemiológico de México	27
Tabla 6.- Características morfológicas de bacterias en distintos medios de cultivo.....	34
Tabla 7.- Conteo de UFC de los diferentes centros de las diferentes localidades.....	39
Tabla 8.- Crecimiento bacteriano Aguascalientes.....	41
Tabla 9.- Crecimiento bacteriano Irapuato.....	42
Tabla 10.- Crecimiento bacteriano Zacatecas.	43
Tabla 11.- Crecimiento bacteriano Saltillo.	44
Tabla 12.- Cepas totales del muestreo.....	44
Tabla 13.- Características generales de Enterobacterias.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Placa demostrativa de Coliformes en ARBV (Bioser ©, 2018)	38
Figura 2.- Grafica de UFC de los diferentes comercios de las diferentes localidades.....	39
Figura 3.- Crecimiento bacteriano en agar Sulfito Bismuto.....	60
Figura 4.- Crecimiento bacteriano en agar SS.....	61
Figura 5.- Crecimiento bacteriano en agar Verde Brillante.	61
Figura 6.- Crecimiento bacteriano en agar XLD.....	62
Figura 7.- Crecimiento bacteriano en caldo EC. con Mug.....	62
Figura 8.- Crecimiento de bacterias coliformes en ARBV , colonias biconvexas de 2 a 5 mm, de coloración roja violeta.	63

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son principalmente propagadas por frutas y vegetales crudos, las cuales están en contacto directo con heces de animales, humanos, de manera directa o indirecta, por medio del agua o suelo contaminado; uno de los posibles vehículos de estos microorganismos son las fresas, pues su fruto al llegar a la madures puede estar en contacto con el suelo; además de que su cosecha es manual y puede ocurrir una contaminación cruzada entre el personal y el fruto. Dada esta situación es importante conocer la calidad microbiológica de los productos mínimamente procesados que se ofertan en distintos tipos de comercios para de esta manera demostrar la calidad alimentaria que se ofrece actualmente.

Bajo las normas de detección de microorganismos presentes en los alimentos, NOM-113-SSA1-1994, NOM-210-SSA1-2014 y la NOM-093-SSA1-1994, se llevó a cabo un análisis microbiológico de distintos puntos de venta en la región Centro Norte de México, durante Julio- Agosto del 2017 y Diciembre- Febrero del 2018; en donde se obtuvieron, el conteo de coliformes totales de cada comercio implicado y la determinación de ausencia presencia de *Salmonella spp.* y *E. coli* mediante el uso de técnicas tradicionales de aislamiento e identificación con la reacción en cadena la polimerasa (PCR).

Demostando que los comercios informales y locales son los que mayor carga microbiana de coliformes totales presentan y que la bacteria *E. coli* también está presente en comercios informales de la región de Zacatecas; de igual manera existen microorganismos enteropatogenos asociados como lo son *Klebsiella*, *Pantoea* y *Citrobacter* presentes en la región Centro Norte de México.

ABSTRACT

The diseases transmitted by food are mainly propagated by raw fruits and vegetables, which are in direct contact with feces of animals, humans, directly or indirectly, through contaminated water or soil; One of the possible vehicles of these microorganisms are strawberries, because their fruit when they reach maturity can be in contact with the ground; In addition, their harvest is manual and cross-contamination can occur between the personnel and the fruit. Given this situation, it is important to know the microbiological quality of the minimally processed products that are offered in different types of food market's in order to demonstrate the food quality that is currently offered.

Under the regulations for the detection of microorganisms present in food, NOM-113-SSA1-1994, NOM-210-SSA1-2014 and NOM-093-SSA1-1994, a microbiological analysis of different points of sale was carried out. the North Central Region of Mexico, during July- August 2017 and December- February 2018; where they were obtained, the total coliform count of each trade involved and the determination of absence of *Salmonella spp.* and *E. coli* through the use of traditional isolation techniques and their identification with the polymerase chain reaction (PCR).

Obtaining that the informal and local stores are the ones with the highest microbial load of total coliforms present; moreover *E. coli* is also present in informal stores in the Zacatecas region; however there are associated enter pathogenic microorganisms such as *Klebsiella*, *Pantoea* and *Citrobacter* in the northern central region of México

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014), reconoce que los alimentos insalubres representan una amenaza para la salud a escala mundial y ponen en peligro la vida de todos, pues se estima que las enfermedades diarreicas afectan cada año a unos 220 millones de niños, de los cuales 96,000 mueren. Una de las principales causas son los productos mínimamente procesados que pueden llegar a contaminarse por la manera en que son manipulados (Johnston *et al.*, 2006); cabe resaltar que no todos los que manipulan y consumen alimentos, tienen conciencia de la importancia de realizar prácticas higiénicas básicas al comprar, vender o preparar(OMS, 2015).

Las frutas y hortalizas frescas son vehículos de transmisión de enfermedades producidas por alimentos, ya que estas pueden contaminarse con microorganismos patógenos, por contacto con heces de humanos y animales, de manera directa o indirectamente a través del suelo o agua contaminados (León *et al.*, 2009). Uno de los posibles vehículos de estas enfermedades son las fresas, ya que este cultivo es de tipo herbáceo rastrero, por lo cual, su fruto al llegar a la madures puede estar en contacto directo con el suelo, además de que la recolección de la fresa es manual (SAGARPA, 2017), y por lo general estas son empacadas y distribuidas inmediatamente sin recibir ningún tratamiento desinfectante posterior a su cosecha (León *et al.*, 2009).

Las bacterias que son causantes de la contaminación en alimentos y provocan enfermedades del índole infeccioso se encuentran: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* y *Campylobacter jejuni* (Palomino y Camargo, 2014); en un estudio realizado para determinar la calidad microbiológica de los productos hortícolas frescos procedentes de cultivos en la Habana, Cuba, demostró que cerca del 20% de las muestras analizadas presentaba enterobacterias como *E. coli*, *Salmonella*

spp y *Listeria spp* (Piug *et al.*, 2013). En Estados Unidos, el Centro de Control de Enfermedades (por su siglas en inglés CDC) (2017), reportó el brote de enfermedades gastrointestinales ocasionadas por el consumo de alimentos mínimamente procesados, este caso se relacionó al consumo de papaya maradol durante el periodo de junio-agosto del 2017, esto trajo como consecuencia: 201 casos de los cuales, 65 resultaron en hospitalizaciones y una muerte en 23 estados de la unión americana, causados por la bacteria *Salmonella kiambu*. El panorama epidemiológico de México revela que las principales causas de morbilidad han sido las enfermedades infecciosas, los tres primeros lugares como causa de morbilidad los han ocupado las “infecciones respiratorias agudas”, las “infecciones intestinales por microorganismo” y la “infección de vías urinarias” (Estrada *et al.*, 2016), a su vez el sistema nacional de vigilancia epidemiológica, en su boletín epidemiológico, reporta que a hasta la semana 52 del año 2017 a nivel nacional, el número de enfermedades infecciosas intestinales es de 5 606 759 de personas, de las cuales 44 503 fueron a causa de fiebre tifoidea, 12 549 de fiebre paratifoidea y 90 477 fueron por otras salmonelosis (DGE-SINAVE, 2017).

Los métodos tradicionales de identificación conlleva el uso de medios de preenriquecimiento y enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos y su confirmación mediante pruebas bioquímicas y morfológicas, todo lo anterior puede demorar días o semanas, además de que la sensibilidad de los análisis es baja (Gui y Platel, 2011); existen métodos de identificación bacteriana los cuales son capaces de eficientar los tiempos de análisis de muestras de alimentos, como lo es la identificación molecular; tanta es la importancia de la implementación de esta técnica que se desarrolló un proyecto europeo denominado “Food PCR” cuyo objetivo fue facilitar la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la validación y estandarización de las metodologías de PCR (Malorny *et al.*, 2003); no obstante el costo de este tipo de metodologías son elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero su alta sensibilidad y gran especificidad que brinda la reacción en cadena de la polimerasa es comparada con el beneficio de lograr un diagnóstico rápido y

preciso además de la pronta liberación de productos al mercado (Gonzales *et al.*,2014).

OBJETIVO GENERAL

Detectar microorganismos implicados en la calidad microbiológica como lo son *E. coli* y *Salmonella* spp en fresas de comercios informales, comercios locales, cadenas nacionales e internacionales, de municipios de estados ubicados en el Centro Norte de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Conteo de Coliformes Totales en cada punto de muestreo
- 2.-Detectar la presencia de *E. coli* y *Salmonella* spp en fresas, por medio de metodologías tradicionales.
- 3.-Confirmación de *E. coli* y *Salmonella* spp por medio del uso de PCR.

HIPÓTESIS

Se determinará la presencia de enterobacterias del genero *E. coli* y *Salmonella* spp en fresas ofertadas para su consumo, en por lo menos alguno de los puntos de muestreo ubicado en la región Centro Norte de México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Fresa

En México, la fresa (*Fragaria vesca*) fue introducida en el año de 1852, al municipio de Irapuato, pero no fue sino hasta el año de 1880 que este cultivo tomó importancia económica expandiéndose y logrando popularidad entre los productores de la región (Sánchez, 2008).

A partir de 1940 el estado de Guanajuato se posicionó como el principal productor de este fruto y logró conservar este título hasta el año de 1974, pues la Comisión Nacional de Productores de Hortalizas (CNPH) impuso cargos económicos de plantación y exportación de fresa a los dos principales productores de este fruto durante ese periodo, Irapuato, Guanajuato y Zamora, Michoacán; provocando así un descenso en la producción para los agricultores de Irapuato por una baja rentabilidad del producto, además de que las condiciones edafoclimáticas del estado de Michoacán y su gran cantidad de empresas congeladoras ayudaron a sobresalir al estado en la producción de este cultivo (Echánove, 2001).

Para el año de 1980 el estado de Baja California se destacó como productor de fresa por su alto nivel de tecnificación y cercanía con Estados Unidos de América (EE.UU.) quien es el principal consumidor del fruto, logrando superar rápidamente al estado de Guanajuato; a partir de estos eventos SAGARPA en el 2013 posiciona al estado de Guanajuato en el tercer lugar en la producción de fresa contribuyendo con un 7% de la producción nacional mientras que Baja California contribuye con el 37% y Michoacán con el 50% (SAGARPA, 2013).

Valor Nutricional

La fresa es catalogada como una de las frutas más bajas en calorías (30kcal/100), por debajo del melón (35kcal) o la sandía (32kcal) además de que su contenido lipídico y de sodio también es muy bajo (Tabla 1); una de las principales características es su coloración rojiza la cual se debe a pigmentos que actúan como antioxidantes naturales ideales en la ingesta diaria, ya que evita

la formación de colesterol (Pamplona, 2006). La actividad antioxidante de extractos de fresa se relaciona con el contenido de fenoles totales, adicionalmente, las antocianinas, que son colorantes naturales con potente propiedad antioxidante, son las responsables del color brillante y atractivo de las fresas; un consumo moderado de este tipo de alimentos tiene efectos benéficos para la salud humana, pues la longevidad humana tiene una correlación significativa a los niveles de antioxidantes en la dieta, se ha demostrado que existe una disminución de antioxidantes durante el proceso normal de envejecimiento (Zorrilla, 2002; De la Fuente, 2002). Las propiedades antioxidantes de este fruto ayudan al deterioro oxidativo que afecta a los alimentos, al ser utilizados en la industria alimentaria adicionándose a grasas u otros productos alimenticios para retrasar los procesos de oxidación, o rancidez oxidativa en los alimentos (Carvajal *et al.*, 2012).

Tabla 1.- Valor nutritivo de fresa, en 100g de alimento crudo en peso neto

Lípidos	mg/100g
Colesterol mg	0
Mono insaturados (oleico)	0.05
Minerales	
Fosforo	19
Magnesio	10
Potasio	166
Vitaminas	
Ácido ascórbico	57
Rivoflavina	0.07
Pirodixina	0.06
Cobalamina	0

(Instituto Nacional de Cancerología, 1996).

Taxonomía y Morfología

La fresa es una planta, perteneciente a la familia de las *Rosáceas* y al género *Fragaria*, las principales variedades cultivadas en México son variedad Festival, Albión, Camino Real, Monterey y California (SAGARPA, 2017).

Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Subreino: *Embryobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Superorden: *Rosanae*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosáceas*

Subfamilia: *Rosoidae*

Tribu: *Potentilleae*

Subtribu: *Fragariinae*

Género: *Fragaria*

Especie: *vesca*

La planta de la fresa es herbácea, su sistema radicular está compuesto de raíces principales y raíces secundarias, es de composición generosa de aproximadamente 10 a 40 cm, por lo general no contiene estolones, y si están presentes son muy cortos, sus rizomas son ramificados; la coloración de sus hojas son de un tono verde oscuro, con textura tipo cuero además de no contener tricomas en la parte del haz y su envés se aprecia veloso; la reproducción es de dos tipos: sexual por medio de inflorescencias que por lo regular son hermafroditas en tipo de racimo, sus pétalos son de color blanco y sus receptáculos de color amarillo; de manera asexual se puede reproducir mediante el desarrollo de estolones; el fruto de la fresa es de 2 a 5 cm de grosor, de aspecto subconico de un color rojo brillante en algunas ocasiones rojo pálido, la fresa se logra separar

de su receptáculo con cierta dificultad; el fruto de la fresa es climatérico lo cual implica su maduración una vez cortado de la planta lo cual propicia su madures (Navarro y Muñoz-Garmendia, 2005).

Importancia Económica

El cultivo de la fresa a nivel mundial representa una producción de 12, 920, 201 Tn en el año 2016, y los principales países productores fueron: China con una producción de 3, 801, 865 Tn, seguido de EE. UU. con 1, 420, 570 Tn y México en el tercer lugar con un total de 468, 248 Tn producidas (FAOSTAT, 2017).

El 52.21% de la producción nacional es exportada haciendo de este producto una excelente alternativa para el desarrollo económico nacional, México es el tercer productor y proveedor a nivel mundial de fresa fresca con un 14.83% del valor total de las exportaciones mundiales y específicamente contribuyen con un 87.79% de las importaciones de EE UU (SAGARPA, 2017).

El desarrollo económico que la fresa a representado de 2013 a 2016 es un aumento del 55.9%, al pasar de 417.5 millones de dólares a más de 650.8 millones de dólares, siendo Estados Unidos, Canadá, Brasil, Arabia Saudita, y Reino Unido los principales consumidores de fresa, cabe destacar que la fresa “Hecho en México” amplía su mercado meta llegando a lugares como: Hong Kong, Belice, Países Bajos Rusia, Qatar, Irlanda, entre otros (SAGARPA-SIAVI, 2017). A nivel nacional la producción total de fresa en el año 2017 fue de 201,481 Tn, así mismo los principales estados productores en el 2017 fueron: Michoacán con 151,432 Tn, Guanajuato con 37,487 Tn y el Estado de México con 6,723 Tn (SAGARPA/SIAP, 2018).

Comercio Internacional

Uno de los aspectos de crecimiento en materia de comercio exterior, son las exportaciones de productos que nuestro país produce, por lo tanto es necesario conocer las reglamentaciones que ponen como requisito, el acceso de los productos frescos de origen mexicano, ya que el 96% de las exportaciones de los

productos frescos producidos en México son exportados a EE. UU.; su demanda de exportación de fresa mexicana es del 60% de la producción nacional, de la cual, el 63% corresponde a la exportación de fresa fresca, el 35% a fresa congelada, y el 2% a conservas y preparados, quedando solamente el 40% de la producción de fresa para la demanda nacional. (SAGARPA/SIAP, 2016).

Consideraciones para Exportación

Dentro de los procedimientos necesarios para lograr con éxito la exportación de los productos hacia EE.UU. es necesario contar con la documentación básica que avalen el cumplimiento de las regulaciones y restricciones no arancelarias tales como: certificados sanitarios y certificados de calidad; en cuanto certificados de calidad en alimentos, este apartado comprende la inocuidad del producto, por lo cual es necesario recurrir a un organismo certificado el cual nos avale como productor calificado para realizar ventas en otros países (Proméxico, 2017).

Requisitos de Exportación

Existen medidas y procedimientos nacionales emitidas por organismos como SAGARPA, la cual es responsable del sistema de reducción de riesgos y contaminación (SRRC), que sirve como medida de seguridad alimentaria, la cual disminuye los riesgos catalogados como físicos, químicos y microbiológicos, implicados en los alimentos; haciendo uso de las buenas prácticas agrícolas (BPA) como manual de operación (SAGARPA, 2016).

Existe la organización conocida como “México Calidad Suprema”, integrada por productores, empaques y sus organizaciones; su objetivo principal el de ayudar al gobierno federal, en la integración del mayor número de empresas certificadas que ofrezcan productos agroalimentarios con los más altos estándares de calidad e inocuidad a nivel nacional e internacional;

México Calidad Suprema es un certificado de calidad que ayuda a los productores a que un producto, proceso, sistema o servicio se ajuste a las normas nacionales

o internacionales para llegar de una manera directa a su mercado internacional, un ejemplo de ello es la certificación “Primus GFS” (MCS, 2018).

Ley de Protección Alimentaria en EE.UU.

En los últimos años, se han tomado medidas preventivas para aminorar y prevenir el riesgo de contaminación microbiana y posibles brotes de enfermedades en EE.UU. como lo es la ley de acto de modernización de inocuidad a los alimentos (por sus siglas en ingles FSMA); dicha ley fue emitida por el presidente de EE. UU., Barack Obama, el 4 de enero del 2011 con el objetivo de transformar el sistema de inocuidad alimentaria, implementando medidas efectivas para prevenir la contaminación en lugar de combatirla (FDA, 2018).

Los elementos principales de la ley FSMA y que son importantes para la exportación de productos frescos hacia EE. UU., son: prevención, esta ley cuenta con un mandato autorizado por la legislación, que exige controles preventivos de contaminación, respaldados por la ciencia y en toda la cadena de producción alimentaria; inspección y consentimiento, una manera de mejorar la seguridad de los alimentos es reconocer los métodos de control preventivos y además contar con la aprobación de los productores y procesadores de alimentos; por tal motivo, es necesario que la FDA proporcione la supervisión y garantice la aceptación de los requisitos implicados para el bien común y esta pueda responder de una manera eficaz cuando los problemas se presenten, la ley FSMA reconoce a la FDA como organismo de control de emergencias, el cual debe poseer las herramientas necesarias para responder de manera inmediata cuando surjan problemas en la cadena de producción a pesar de los controles preventivos establecidos; importación, de igual manera la ley FSMA otorga a la FDA la autoridad competente para garantizar que los productos importación atiendan a los padrones de EE. UU. y que estos sean seguros para los consumidores; alianzas reforzadas, el interés principal de la ley FSMA es la participación y colaboración cercana entre y con otras agencias gubernamentales, nacionales y extranjeras, para que de esta forma se reconozca explícitamente que todas las agencias de seguridad en alimentos trabajen de modo integrado para alcanzar

los objetivos de salud pública por el bien de todos los involucrados. (GlobalSTD, 2018; FDA, 2018; GPO, 2011).

Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETA)

La organización panamericana de la salud en conjunción con la organización mundial de la salud, define como enfermedad transmitida por alimento (ETA), a un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad; para que un brote o enfermedad sea reconocido es necesario que los consumidores informen del evento ocurrido, además de notificar a las autoridades de salud y de las actividades de vigilancia sanitaria de las secretarías municipales, estatales y federales, según sea el impacto del caso (OPS, 2016).

La manera en que se puede desarrollar una ETA se basa en que un patógeno o sus toxinas deben estar presentes en el alimento, pero la sola presencia del patógeno en el mismo no involucra que la enfermedad ocurra, pues las condiciones de salud del hospedante son un factor delimitante en el desarrollo de la enfermedad; en la mayoría de los casos de la ETA, el patógeno debe estar presente en una cantidad suficiente como para causar una infección o producir toxinas, así mismo el alimento debe ser capaz de proveer de sustento para el crecimiento del patógeno (Caballero, 2008). Para que el patógeno se multiplique es necesario que el alimento contaminado permanezca a una temperatura y condiciones ambientales adecuadas como para que el organismo se desarrolle y o produzca toxinas; se debe ingerir una porción suficiente del alimento contaminado, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada (Fernández, 2001).

Las ETA se pueden clasificar en: Infecciones, Intoxicación o infecciones medidas por toxina; la infección transmitida por alimentos es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos patógenos vivos, como: *E. coli*, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp, *Shigella* spp, *Listeria* spp, el virus

de la hepatitis A, *Trichinella spirallis* entre otros; la intoxicación causada por alimentos ocurre cuando las toxinas producidas por bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido o elementos químicos en cantidades que afecten la salud (OPS, 2016).

Coliformes Totales y Fecales

Las ETA son generalmente de carácter infeccioso o tóxico, algunas son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran al organismo a través del agua o alimentos contaminados; existen indicadores de inocuidad los cuales se denominan como coliformes (Jay, 2002). Los coliformes son todas aquellas bacterias en forma de bacilo, aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativos, oxidasa negativa y no esporulantes que tienen la capacidad de proliferar en concentraciones relativamente altas de sales biliares fermentando la lactosa y produciendo ácido o aldehído en un tiempo de 24 horas a 35-37°C; dentro del grupo coliformes existen los catalogados como termo resistentes, ellos están relacionados con la flora intestinal y su peculiaridad radica en que son termo tolerantes, se pueden multiplicar a 44°C, y de fermentar la lactosa, lo que los diferencia del resto que son denominados coliformes totales (CT) (Von, 2007).

E. coli es el indicador principal de contaminación fecal en alimentos y agua contaminada, ella está presente en todas las heces de animales y humanos así como también en las aguas residuales y está estrechamente relacionada a enfermedades en humanos y animales (Environment Agency, 2002); su pronta detección e identificación es de gran importancia para la prevención de enfermedades gastrointestinales y la protección del medio ambiente manteniendo los ríos y canales que son usados como fuentes de riego (Paruch, *et al.*, 2012; Haller *et al.*, 2009).

El género *Salmonella* también forma parte de la familia Enterobacteriaceae y es causante de la enfermedad conocida como salmonelosis y al igual que *E. coli* es transmitida por la ingestión de alimentos contaminados, los cuales tienen contacto

directo con los manipuladores que carecen de una buena higiene o con heces fecales de animales (Caballero, 2008).

***Salmonella* spp, Ubicación Taxonómica y Generalidades.**

División: *Bacteria*

Phylum: *Protobacteria*

Clase: *Gamma-proteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Salmonella*

Son bacilos Gram negativo, anaerobios facultativos con flagelos peritricos, no desarrollan cápsula ni esporas, son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico; necesitan de glucosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo (Brenner, 2000).

Este género comprende dos tipos de especies diferentes las cuales son *Salmonella entérica* y *Salmonela bangori*, se considera que *S. bangori* no es una especie que afecte la salud de los humanos y se aísla generalmente de animales de sangre fría como es el caso de los reptiles; en contraparte *S. entérica* está compuesta de numerosas cepas que son patógenas para los humanos y también causan afecciones en reptiles, aves y mamíferos (Landringe, 2009).

La especie entérica se divide en seis subespecies diferentes: subespecie *entérica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI); la mayoría de las subespecies se aíslan fundamentalmente de reptiles y por tanto se asocian con muy baja frecuencia a infecciones en el hombre, sin embargo, *S. entérica*, subespecie *entérica*, es aislada básicamente de mamíferos y aves, involucrándose con la cadena alimenticia en algún punto del proceso e infectando accidentalmente al hombre y se estima que el 99% de los casos de salmonelosis humana están causados por cepas de la subespecie I (Betancor *et al.*, 2010).

Principales Enfermedades Causadas por *Salmonella* spp

Salmonelosis

Esta enfermedad se caracteriza por dolor abdominal, diarreas, dolor de cabeza y en algunos casos severos, vómito; uno de los síntomas principales es la fiebre y puede llegar a complicarse por la deshidratación que la antecede; en casos de graves se presentan complicaciones en las cuales se ve afectadas las articulaciones, el corazón, los riñones y los pulmones; las muertes ocasionadas por la salmonelosis son raras pero se generan por la severidad de la infección y el tipo de huésped en el que se presente, principalmente en niños menores de 3 años y adultos mayores (Lan, 2009).

El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Salmonella enteritidis* ya que es la que mayormente se reporta en este tipo de sintomatologías, se calcula que en EE.UU. se presentan aproximadamente 5 millones de infecciones por este agente cada año, en Europa se han notificado varias epidemias años anteriores, y en Cuba, la *Salmonella* spp se cataloga entre los 2 agentes que con mayor frecuencia se encuentra en estudios de brotes epidemiológicos (Valdez, 2001). Los huéspedes de esta bacteria suelen ser los animales domésticos, como las aves, cerdos, bovinos, perros y gatos; los hombres enfermos o convalecientes que tienen contacto con la preparación o manipulación de los alimentos son vectores de esta enfermedad; el estado portador en el hombre no es común pero en los animales es frecuente (Galanis *et al.*, 2006).

Los síntomas se presentan en un rango de 12 y 72 horas después de haber ingerido algún alimento contaminado, en algunos casos esta bacteria es capaz de generar síntomas en el hospedero en 6 horas; su modo de transmisión principal es por la ingestión de la bacteria, la cual puede llegar a los alimentos por contacto directo con heces fecales de animales o de los manipuladores de alimentos, principalmente por la contaminación cruzada entre los alimentos preparados con los alimentos crudos, o la ingesta de los alimentos sobre superficies y o utensilios carentes de inocuidad (Fierer, 2001).

Los métodos de prevención de este tipo de enfermedades está enfocado en: adquirir alimentos de origen animal de buena calidad sanitaria y en correcto

estados de conservación, la cocción correcta de los alimentos y la limpieza de los productos crudos como frutas y hortalizas, la limpieza periódica de los lugares donde son preparados los alimentos, además de una higiene de buena calidad por parte de las personas que manipulan y preparan los alimentos (OMS, 2007; Lorenzo y Gálvez, 2015).

Fiebre Tifoidea

Es una enfermedad infecciosa causada por *Salmonella typhi*, los síntomas que la caracterizan son fiebre continua, cefalea, malestar general, aumento del tamaño del hígado y bazo, constipación y con menos frecuencia genera diarreas, algunas de las complicaciones de este padecimiento si no es tratada adecuadamente son perforaciones intestinales y sangramiento; llega a ocasionar la muerte en el 10% de los pacientes y su contagio es común en lugares donde la higiene y limpieza adecuada son escasas, su huésped en general son los humanos (Galanis *et al.*, 2006). Su modo de transmisión es a través de los alimentos que se contaminan con heces u orina de algún paciente portador de la bacteria al no tener una buena higiene; los alimentos que tienen altos índices de propagación de esta enfermedad son: los mariscos que provienen de zonas en contacto con aguas negras, frutas y hortalizas regadas con aguas no tratadas, leche y productos lácteos manipulados por las manos de personas enfermas o portadoras de la bacteria, o algún otro vector como roedores (Jurado,2010).

Las medidas preventivas para no contraer esta enfermedad incluyen, según sea el caso del alimento; almacenamiento adecuado de alimentos, protección de los alimentos contra los vectores y roedores, lavado de manos de una manera adecuada antes, durante y al final del proceso de elaboración, y evitar contaminaciones cruzadas entre el punto de venta y preparación de los alimentos (OMS, 2007).

Escherichia coli., Ubicación Taxonómica y Generalidades

E. coli, es una bacteria que forma parte de:

División: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Clase: *Gamma-proteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Esta bacteria tiene forma de bacilo, Gram negativo, con flagelos peritricos, es anaerobio facultativo y capaz de crecer en medios a 37 °C, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa; 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 (Caballero, 2008).

Esta bacteria se cataloga en seis tipos de cepas o viro tipos que son reconocidas por su potencial patogénico como lo son: *E. coli* Entero Patógena (ECEP), *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* Entero Invasiva (ECEI), *Escherichia coli* Entero Hemorrágica o Verotoxigénica (ECEH), *Escherichia coli* Entero Agregativa (ECEA), *Escherichia coli* Adherencia Difusa (ECAD) (Mc Veigh *et al.*, 2000; Rodríguez, 2002; Graniel, 2003; Caballero, 2008; Riveros *et al.*, 2011; Venezuela, 2016).

Principales Enfermedades causadas por *E. coli*

Diarreas Causadas por *E. coli* Enterotoxigénica (ECET)

Esta cepa se considera similar a *Vibrio cholerae*, la ECET se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no invade al intestino, pero elabora toxinas que producen diarrea, no generan daños o cambios histológicos en las células de las mucosas y su inflamación es poca; la ECET produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los países

desarrollados no están exentos; este microorganismo fue reconocido por primera vez como agente causal de enfermedades en 1968 después de realizar estudios en la India y Bangladesh; es uno de los agentes causales que más ocasiona diarreas en niños y es la causa más frecuente de la llamada “diarrea del viajero” en personas que viajan a algunas partes de Centroamérica, Hispanoamérica y Oriente Medio, Asia y África; esto se debe a que por lo general las ECET están presente en los suministros de agua en áreas que carecen de un manejo adecuado e inocuo o nula purificación (Caballero, 2008).

Los síntomas que se presentan con este agente causal son: cuadros de diarreas líquidas y acuosas, dolor abdominal, vómito y a veces fiebre prolongada moderada causando en algunos casos la deshidratación del huésped (Valdez, 2001). El reservorio de esta cepa es el hombre aunque, algunas han sido identificadas a partir del cerdo y bovino, su periodo de incubación es de entre 10 y 72, su transmisión es por la ingestión de alimentos y en algunos casos agua contaminada; la contaminación de estas bacterias es causa de una mala práctica en la manipulación de los alimentos o bien el método de conservación de los productos es deficiente además que la forma en que se ofrecen los productos no es la más adecuada en la mayoría de los casos (Gómez, 2014).

Las medidas preventivas para evitar contraer este tipo de enfermedad es el garantizar la manipulación higiénica de los alimentos que se consumen, además que el personal conozca y realice las técnicas de higiene personal como lo es el lavado de manos al iniciar la preparación y elaboración de los alimentos, y cada que sea necesario según la actividad que se realice; procurar mantener los alimentos calientes a una temperatura superior a 60°C y los alimentos fríos a menos de 5°C (DuPont, 2008).

Colitis Hemorrágica

Escherichia coli entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH) catalogada también en el grupo de STEC (*Shiga Toxin E. coli*), debido a que estas bacterias también producen una toxina citotóxica para células del riñón y presentan similitud estructural a la toxina que produce *Shigella dysenteriae*; las STEC son

productoras de vero toxinas que actúan en el colon, sus síntomas son: en primer instancia colitis hemorrágica, para después presentar síndrome urémico hemolítico, el cual al presentar complicaciones con el paciente genera infecciones en el riñón; esta cepa no es capaz de fermentar sorbitol y posee un fago en donde se codifican las vero toxinas también llamadas “Toxinas Shiga”, y posee una fimbria polar larga que usa para su adherencia (Rodríguez, 2002).

Esta enfermedad está caracterizada por diarreas sanguinolentas que aparecen después de haber consumido alimentos contaminados de alguna manera como las antes descritas; las complicaciones en algunos pacientes son fallos renales descritos como síndrome urémico hemolítico lo cual es proclive a una serie de aflicciones en diferentes órganos del cuerpo humano comprometiendo así la salud del hospedero (Campistol, 2013). El principal microorganismo que genera esta enfermedad es *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7, la cual es altamente sensible al calor de los tratamientos convencionales de conservación de alimentos y de cocción de alimentos preparados (Caballero, 2008).

El principal reservorio de esta cepa es el hombre y el ganado bovino fundamentalmente; los síntomas se presentan comúnmente entre 24 y 48 horas después del consumo de alimentos contaminados o con un mal manejo de almacenamiento, la transmisión de esta cepa principalmente es por la ingesta de carne mal cocida, especialmente las carnes molidas pues la textura de la misma es rugosa y se puede adherir la bacteria y también en la leche cruda o con un tratamiento térmico deficiente; sin embargo el hombre también es capaz de propagar la bacteria debido a los malos hábitos en la manipulación de los alimentos, algunas recomendaciones para evitar este tipo de enfermedades incluyen desde conservar correctamente las carnes, además de evitar la contaminación cruzada con otros alimentos, cocinar de manera correcta y por el tiempo adecuado los alimentos como la carne (Alam, 2006).

Contaminación de Alimentos Mínimamente Procesados.

Una de las debilidades de los producto mínimamente procesados, es que son susceptibles a contaminarse en el lugar de producción y a lo largo de la cadena de distribución, este tipo de contaminaciones puede suceder si no existen medidas de control que disminuyan la carga microbiana posible presente; además de que el patógeno puede persistir e incluso multiplicarse en el alimento, a continuación se presentan las posibles fuentes de contaminación en las etapas de la producción y venta (Shaw *et al.*, 2015).

Precosecha

En esta etapa de la producción de alimentos, está relacionada con las actividades propias del manejo del cultivo, así como su siembra y consideración del tipo de riego utilizado para lograr el correcto desarrollo de la planta; las contaminaciones que surgen en este punto del proceso, son difíciles de identificar pues factores como la calidad microbiológica del agua, el uso de fertilizantes de origen animal, así como abonos, el manejo de fauna nociva y los de animales de compañía, amplían las variables de contaminación (León *et al.*, 2009).

Frecuentemente la contaminación de los alimentos en este punto se da por la recurrente exposición al suelo o agua contaminados, pues la forma en la cual se suministra el agua al cultivo y la calidad de agua suministrada son factores relevantes que pueden determinar la capacidad de propagación de los patógenos, además, no solo la contaminación se puede obtener por contacto, sino que, algunos patógenos pueden ingresar por acción capilar por las hendiduras o tejidos vegetales dañados durante la producción, generalmente en países en desarrollo es común utilizar aguas residuales no tratadas para el riego del cultivo lo cual incrementa el riesgo de contaminación de las frutas y hortalizas (Pettersson *et al.*, 2001). Vegetales que tiene mayor proximidad al suelo o están en contacto directo con él pueden llegar a contaminarse cuando se presente una lluvia intensa o atreves el agua de riego, esto sucede cuando el agua salpica a los productos y los patógenos presenten en el suelo logran llegar al vegetal o

fruto (Heaton y Jones, 2008), los microorganismos que se encuentran en el suelo son asociados a las heces de animales domésticos, animales silvestres, e insectos; de igual manera algunas aves pueden esparcir cierto tipo de patógenos como *Salmonella* spp y *E. coli* (Beuchat y Ryu, 2007).

Cosecha

En este punto de la cadena de producción y dependiendo de las características del fruto o vegetal, la cosecha se realiza de manera manual, por medio utensilios o maquinaria de corte, en este punto del proceso los contaminantes que actúan durante o después de la cosecha dependen específicamente del lugar de empaque, como lo es en campo para su distribución inmediata o en alguna planta empacadora, en la cual el producto se somete a lavado y embalaje en una planta procesadora; en consecuencia a este tipo de procesos los trabajadores de la industria alimentaria han sido responsables de brotes de enfermedades transmitidos por alimentos; algunos de los aspectos importantes en la higiene de los trabajadores son: manos contaminadas, falta de higiene en general incluyendo ropa, cabello sucio, heridas abiertas, infecciones en las manos, enfermedades gastrointestinales como gastroenteritis o ser portador asintomático de patógenos entéricos, además del acceso limitado a letrinas en el predio o lugar de empaque lo cual conlleva a la defecación en el cultivo (Greig *et al.*, 2007).

Las medidas de prevención de este tipo de acontecimientos se describen como buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM), las cuales incluyen capacitación enfocada a la higiene de los procesos en donde el personal está involucrado, abarcando aspectos como capacitación del personal en materia de higiene , como lo es el correcto lavado de manos y su frecuencia necesaria antes de entrar en contacto directo con los cultivos, uso de guantes y /o cofia, además del uso y disponibilidad de letrinas en el predio (Bejar *et al.*, 2007)

Post cosecha

Este punto de la cadena de suministro involucra totalmente lo que le sucede al alimento después de su cosecha, atreves de su distribución a los puntos de venta; esta parte es catalogada como “procesamiento”, y se refiere en los casos en los cuales los materiales crudos son convertidos en un producto de valor agregado, las frutas y hortalizas reciben un tratamiento más económico, algunas son empacadas y distribuidas inmediatamente después de cosecharse sin ningún tratamiento posterior a su recolección, mientras que otros productos son sometidos a lavado, desinfestación y empaque antes de su distribución (León et al., 2009). Los focos posibles de contaminación en esta etapa reúne muchos factores los cuales son: heces de animales, insectos, otros vegetales, vehículos o contenedores donde se coloca el producto para su traslado, además de las diferentes operaciones del procesamiento y distribución del producto, el agua de lavado, equipo de corte, embalaje y clasificación, bandas trasportadoras y otras superficies de contacto, además de las manos de los manipuladores del producto (Izumi *et al.*, 2008).

Dentro de los riesgos que existen en la manipulación de los alimentos frescos son la contaminación cruzada y el lavado del producto, ya que cualquier materia extraña que entre en contacto con el producto tiene el potencial necesario de convertirse en una fuente de contaminación microbiana además de que el lavado es importante en el proceso, y es comúnmente empleado en la industria alimentaria para remover residuos de tierra y desechos, con el objetivo de aminorar la carga microbiana en el alimento fresco (Gómez, 2009),.

La contaminación de los alimentos también está relacionada con el transporte del cultivo de producción o de la empacadora al almacén a su posterior distribución, factores como la temperatura del medio de transporte así como las condiciones higiénicas son vitales para reducir alguna contaminación microbiana (León *et al.*, 2009).

Puntos de Venta

El conocimiento del lavado de los vegetales con agua ya sea en el punto de venta o en el hogar no elimina completamente los microorganismos patógenos presentes en el alimento, pero este tratamiento es capaz de reducir el número de los microorganismos, generalmente los manipuladores de alimentos son lo que principalmente contaminan el producto al no atender las prácticas básicas de higiene como lo es el lavado de manos antes de tocar o preparar cualquier alimento o superficie que pueda estar en contacto con el (León *et al.*, 2009).

Alertas de Inocuidad

Las ETA abarcan una gran cantidad de sintomatologías y dolencias, las cuales son un gran problema de salud pública en el mundo y se presentan con mayor frecuencia; esto se debe a la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas, ellos pueden estar presentes en cualquier parte del proceso desde la producción hasta el consumo de los alimentos, lo llamado “del campo a la mesa” y puede deberse a la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire (OMS, 2018)

Algunas enfermedades como las que son causadas por *Salmonella* no tifoídica, son un problema de salud pública en todas las regiones del mundo y están presentes tanto en países con alto poder económico, como en los países de bajo poder económico, otras enfermedades, como la fiebre tifoidea, el cólera transmitido por alimentos y las enfermedades causadas por *E. coli* patógena, son mucho más comunes en los países de bajo desarrollo (WHO, 2015).

Según el informe “Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria”, presenta un estimado de 31 agentes patógenos causantes de 600 millones de casos de enfermedad de transmisión alimentaria de los cuales 420 000 mueren, incluidos 125 000 niños menores de 5 años; las enfermedades diarreicas representan más de la mitad de las enfermedades transmitidas por alimentos, pues cerca de 550 millones de personas son

afectadas por este tipo de enfermedades y 230 000 mueren cada año a causa de estas, los sectores vulnerables como lo son los niños menores de 5 años representan 220 millones de casos de enfermedad y causan 96 000 muertes por este tipo de afecciones y la principal causa de estos resultados se debe a la ingestión de carne y huevos crudos o mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos, contaminados por norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoídica, *Klebsiella* y *Escherichia coli* patógena (OMS,2015).

Casos de Alerta Sanitaria en Canadá

Los casos de alerta sobre productos contaminados en el país de Canadá es una de las medidas de previsión de estas enfermedades, pues en lo que va del año 2018 estos son algunos de los avisos sanitarios y acciones emitidas por la Agencia Canadiense de Inspección alimentaria (CFIA) sobre los alimentos que posiblemente estén contaminados con microorganismos patógenos, y estos están relacionados con productos vegetales que se obtienen en mercados (Tabla 2); su severidad de propagación varía desde: la clase 1, como el riesgo más probable de contagio, la clase 2, como riesgo moderado de contagio de patógenos y clase 3, que representa un riesgo mínimo moderado, algún daño o propagación por patógenos (CFIA, 2018).

Tabla 2.- Casos de alertas sanitarias en Canadá

Alertas Sanitarias			
Ubicación	Fecha	Producto	Descripción
Quebec, Ontario	14 de abril del 2018	Fresas Congeladas	Alerta sanitaria clase 1, posible contaminación de <i>hepatitis</i> a en el producto, retiro de producto del mercado (CFIA, 2018).
British Columbia, Manitoba	15 de abril del 2018	Coco Rallado	Alerta sanitaria clase 2, posible contaminación de <i>Salmonella</i> en el producto, retiro del producto del mercado (CFIA, 2018)

Ottawa	25 enero 2018	de del	Semillas de sésamo	Alerta sanitaria de clase 2, posible contaminación con <i>Salmonella</i> , retiro del producto del mercado (CFIA, 2018)
Alberta, British Columbia, Manitoba, y Saskatchewan	26 enero 2018	de del	Semillas de sésamo	Alerta sanitaria clase 2, posible contaminación de <i>Salmonella</i> , venta por internet del producto, se recomendó tirar el producto que fue recibido el día 9 y 10 de enero del 2018, (CFIA, 2018).
Ontario	26 enero 2018	de del	semillas de Sésamo	Alerta sanitaria clase 2, alerta notificada por la empresa, posible contaminación de <i>Salmonella</i> retiro del producto contaminado (CFIA, 2018).
Alberta, British Columbia, Manitoba	24 enero 2018	de del	Coco Rallado	Alerta sanitaria clase 2, posible contaminación con <i>Salmonella</i> , retiro de los productos del mercado (CFIA, 2018).

Reportes de brotes por ETA en Estados Unidos

En EE.UU. el Centro de Control de Enfermedades (CDC) es el encargado de notificar los posibles brotes de enfermedades, así como su seguimiento y notificación a la población mediante un registro de brotes de enfermedades o casos presentados y sus posibles fuentes de contaminación (Tabla 3); los científicos y detectives de enfermedades asociados al CDC, trabajan alrededor del mundo para rastrear enfermedades, información y brotes respondiendo a las emergencias de todo tipo, y usar lo que se ha aprendido para fortalecer la salud y la capacidad de recuperación de los Estados Unidos (CDC, 2017)

Tabla 3.- Casos de Brotes de enfermedad en EE.UU.

Brotes de ETA				
Alcance	Fecha		Producto	Descripción
Once estados de EE.UU.	12 de abril	del	Lechuga romana en trozos	Personas infectadas con bacteria <i>E. coli</i> O157:H7, consumo de vegetales crudos desarrollaron el síndrome urémico hemolítico, el origen del producto es Yuma en la región de cultivo en Arizona (CDC, 2018).
Ocho Estados de EE.UU.	20 de Marzo	del	Coco deshidratado	Se identificó el brote de <i>Salmonella typhimurium</i> , a causa de la ingesta de coco deshidratado, la FDA recolecto coco deshidratado de los hogares de los pacientes, el microorganismo en cuestión fue identificado en las muestras de los productos (CDC, 2018).
Tres estados de EE.UU.	27 de febrero	del	Germen crudo	<i>Salmonella montevideo</i> , a causa de la ingesta de Germen crudo, contenido en alimentos preparados de varios restaurantes (CDC, 2018).

Alertas sanitarias en México

En México, los organismos que ayudan a la prevención y control de brotes de enfermedades son la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), y la Dirección General de Epidemiología, encargada del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (DGE-SINAVE) ; dichos organismos tienen como misión, proteger a la nación contra riesgos a la salud y el bienestar general de la población, vigilando que los animales, vegetales

productos y subproductos que se importan, no representen un riesgo de inocuidad, informando a la población mediante alertas sanitarias y sobre las cuales se deben tomar medidas en salud pública de manera urgente y eficaz (Tabla 4), además de brindar información epidemiológica útil para la salud pública y la vigilancia epidemiológica de la nación (Tabla 5) (COFEPRIS, 2014; DGE-SINAVE, 2015; SAGARPA, 2016).

Tabla 4.- Alertas sanitarias México

Alertas Sanitarias			
Ubicación	Fecha	Producto	Descripción
México	10 de marzo del 2016	Pistaches importados de EE.UU.	Retiro de pistaches contaminados por <i>Salmonella</i> , la empresa responsable procedió al retiro voluntario del producto, el cual fue empaquetado en el periodo de 24 de octubre al 7 de noviembre de 2015 (COFEPRIS, 2016)

Tabla 5.- Boletín epidemiológico de México

Boletín epidemiológico, número 52, volumen 34, semana 52, del 24 al 30 de diciembre del 2017, semanal y acumulado (SINAVE, 2018).			
Enfermedades infecciosas intestinales	Enfermedades por fiebre tifoidea	Enfermedades por fiebre paratifoidea	Otras salmonelosis
5, 606, 759	44, 503	12, 549	90,477

Determinación de Indicadores de Inocuidad

El Codex Alimentarius define criterio microbiológico como la aceptabilidad de un producto o un lote de alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas / metabolitos por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote, esta definición está relacionada con los análisis microbiológicos que se necesitan para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos de exportación. (Codex Alimentarius, 2013)

México, para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos, tiene metodologías conocidas como Normas Oficiales Mexicanas (NOM); las NOMs son de carácter obligatorio y son elaboradas por dependencias de gobierno federal, y para otorgar la máxima eficacia a estas normas, la secretaria de economía participa en foros y organismos internacionales como lo son Codex Alimentarius, Comisión Panamericana de Normas Técnicas, Comisión Electrónica Internacional y la Organización Internacional de Normalización (ISO); las NOMs establecen reglas, especificaciones, atributos, características o mandatos que son aplicables a un producto, proceso, instalación o método de producción (Secretaría de Economía, 2016).

Dentro de las normatividades que la secretaria de salud promueve se encuentra la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos; esta norma es de carácter obligatorio en el territorio nacional para las personas físicas o morales, que se dedican a efectuar los métodos a que se refieren a la determinación de microorganismos patógenos, en alimentos para consumo nacional o de importación y productos de exportación; esta norma tiene por objetivo, el establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano: *Salmonella* spp, *S. aureus*, *L.*

monocytogenes, Enterococos, Coliformes Fecales y *E. coli*; esta norma es totalmente equivalente con las normas internacionales:

-Norma Internacional ISO 16649-3. Microbiología de los alimentos y alimento de animales. Método horizontal para el recuento de *E. coli*-glucuronidasa positivo. Parte 3. Técnica utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-glucuronido. Primera edición (2005).

-Norma Internacional ISO 7899-2 Calidad del agua. Detección y enumeración de Enterococos intestinales. Parte 2: Método de Filtración por membrana.

-Norma Internacional ISO 8199 Calidad del agua. Guía general sobre la enumeración de microorganismos por cultivo. (06-2005).

-Norma Internacional ISO 11290 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de *L. monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1a. edición (1996). 9.5 Norma Internacional ISO 6888. Microbiología - Guía general para la enumeración de *S. aureus* - técnica de recuento de colonias, 1a. edición (05-1983).

-Norma Internacional ISO 6579 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 4a. edición (2002).

Identificación Molecular de Microorganismos en Alimentos

Una parte importante en la calidad de los alimentos, es la detección y enumeración de los microorganismos que pueden estar presentes en las superficies como en los alimentos; la necesidad de diferenciar bacterias patógenas y no patógenas, así como de bacterias que habitan en el suelo, el agua y el tracto intestinal requiere de métodos confiables, rápidos, sensibles pero principalmente específicos (Coester *et al*, 2000); la reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación selectiva de secuencias específicas que se encuentran en el ADN (ácido-desoxirribonucleico), este método requiere de dos

secuencias de oligonucleótidos llamados iniciadores o cebadores los cuales son complementarios a los extremos de la región de ADN que se quiere amplificar (Rojas *et al*, 2006).

Las principales diferencias entre métodos de identificación por medios de cultivo, en comparación con el método de PCR, están definidas por el tiempo de espera de los resultados y su alta sensibilidad de los métodos moleculares (Pedraza, 2014); el método tradicional el cual incluye la preparación de la muestra, enriquecimiento en medios de cultivo y posteriormente su inoculación a medio selectivos y diferenciales, puede tomar entre 4 a 5 días, además de que la sensibilidad de la prueba es baja pues es capaz de identificar de uno a dos UFC en 25g de muestra (Villareal, 2008); en cambio la técnica de PCR es capaz de otorgar resultados en un tiempo estimado de 3 a 4 horas y con un límite de detección de 5 a 10 UFC/ml (Marathe *et al*, 2012). Existe evidencia del uso de la técnica PCR punto final, como método de identificación molecular de bacterias enteropatógenas mediante el uso de los cebadores universales (27f/ 1492r) en aves de corral, que permitió la detección *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Proteos vulgaris*, en estos (Abo-Amer y Mohammed 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La recolección de las muestras de fresas fue en los municipios de Irapuato, Gto.; Aguascalientes, Ags.; Zacatecas, Zac., y Saltillo, Coah., en cada localidad se muestreo el 10% de los comercios de cadena internacional, comercios de cadena nacional, comercios locales y comercios informales, de los cuales se tomó un comercio de cada localidad; cada muestra estuvo compuesta de 250g de fresa tomada completamente al azar, durante el periodo julio-agosto del año 2017 y diciembre-febrero del año 2018. Las muestras recolectadas fueron manipuladas y transportadas como se indica en la NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Se tomaron 250gr de cada punto de muestreo, obteniendo un total de 32 muestras se introdujeron en bolsas de polietileno de primer uso evitando la contaminación de la muestra y se etiquetaron según fueran su origen y lugar de procedencia; obtenidas las muestras de cada punto, se almacenaron en hieleras de poliestireno de primer uso, las cuales contenían bolsas refrigerantes congeladas para mantener las muestras a una temperatura de refrigeración aproximada a 4°C, y mantener el estado físico de las muestras; dichas muestras fueron transportadas al laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para su análisis

Conteo de Coliformes Totales en Placa

Siguiendo la metodología descrita en la norma oficial mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos CT en placa. Previamente y bajo condiciones asépticas y de laboratorio, se preparó Agar Rojo Bilis Violeta (Violet Red Bile Agar, ARBV TM MEDIA®) según las indicaciones del fabricante y se vació en cajas petri estériles, se prepararon tubos de ensayo estériles que contenían 9 ml agua peptonada al 0.1% de concentración. Se pesaron 25 gr de fresa de cada muestra obtenida; dentro de

una campana de flujo laminar se depositaron las fresas en bolsas de polietileno de primer uso y se agregaron 75 ml de agua peptonada estéril, la bolsa se cerró para evitar alguna contaminación de la muestra y usando las manos, se froto la bolsa contra las fresas durante un minuto, incorporando el agua peptonada en toda la superficie, trascurrido el tiempo y utilizando una micropipeta con puntas estériles; se tomó un mililitro de la mezcla de agua de peptonada con las fresas y se procedió a realizar diluciones seriadas en los tubos de agua peptonada al 0.1% hasta obtener la dilución 10^{-3} ; de cada dilución se tomó un mililitro para vértelo en una caja petri nueva estéril, a la cual se le agregaron de 10 a 15 ml del medio ARBV (TM MEDIA®).

Una vez añadido el medio se, realizaron 6 movimientos circulares en dirección a las manecillas del reloj, 6 movimientos circulares en contra del sentido de las manecillas del reloj, 6 movimientos hacia arriba y hacia abajo y finalmente 6 movimientos de izquierda a derecha, hasta lograr la incorporación completa de la muestra con el medio ARBV (TM MEDIA®), se dejó solidificar por 2 minutos para después agregar de 5 a 10 ml del medio ARBV (TM MEDIA®), en cada caja solidificada, el agar se incorporó en la superficie del medio de la manera anteriormente descrita, este procedimiento se realizó por duplicado de cada muestra y de cada dilución; finalmente las cajas petri solidificadas se incubaron a 35°C , durante 24 ± 2 horas.

Posteriormente se realizó el conteo de las UFC en las cajas, tomando como coliformes las colonias con características siguientes: color rojo oscuro, y morfología semejante a lentes biconvexas con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.

Aislamiento de Bacterias

En referencia a la metodología descrita en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores, y Determinación de microorganismos patógenos, y a la NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Se procedió al aislamiento de los microorganismos

evaluadores de inocuidad en alimentos. Todos los medios utilizados fueron de la marca TM MEDIA® y preparados de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Aislamiento de Salmonella

Previamente al análisis, se preparó el medio necesario para el enriquecimiento de la bacteria, que fue Caldo Lactosado ; una vez ubicados en el laboratorio de toxicología, se limpió y sanitizó el área donde se trabajó, en este caso fue una campana de flujo laminar, bajo condiciones de inocuidad y de laboratorio; se tomó de cada muestra obtenida 25g de fresa por triplicado, y se colocaron en frascos que contenían 225 ml de medio de pre-enriquecimiento Caldo Lactosado agar y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras en el agar Caldo Lactosado, se tomó 1 ml de cada frasco y se transfirió respectivamente a cada tubo de medio de enriquecimiento selectivo Selenito Cistina, y de igual manera a los tubos de Tetrionato, agregándoles 0.1 μl de colorante verde brillante al 1% solo a los tubos de Tetrionato, se incubaron los tubos de cada muestra por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomó de los tubos de enriquecimiento una aza bacteriológica y se realizaron estrías simples sobre cada uno de los medios selectivos y diferenciales; Sulfito Bismuto (SB), Verde Brillante (VB), SS AGAR (Salmonella Shigella) y XLD AGAR (Xilosa Lisina Desoxicolato), se vaciaron en cajas petri estériles dejando solidificar; una vez realizadas las estrías en cada medio se incubaron a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ por un periodo de 24 horas y en caso de no presentar crecimiento se dejaron incubar por 24 horas más. Terminado el tiempo de incubación de los medios, se identificó las características morfológicas de la bacteria en cada medio inoculado y tomando como presuntivo positivo del género *Salmonella* las colonias que presentaron las siguientes características según al NOM-210 SSA1-2014 (Tabla 6):

Tabla 6.- Características morfológicas de bacterias en distintos medios de cultivo

Aislamiento de <i>Salmonella</i>		
Medio de cultivo	Tipo de medio	Característica
Agar SS	Selectivo diferencial	Colonias translúcidas, ocasionalmente opacas, algunas colonias dan centro negro, las colonias fermentadoras de lactosa son rojas.
Agar XLD	Selectivo diferencial	Colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro.
Agar VB	Selectivo	Colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido
Agar SB	Selectivo	Colonias cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico, halo café, tornándose posteriormente negro.

Aislamiento de *E. coli*

Previamente se prepararon tubos de ensayo lo cuales contenían 9ml de medio Verde Brillante Lactosa (VBL) y una campana de Durham en su interior, y tubos con 9 ml de caldo EC. con MUG, también con una campana de Durham en su interior, los medios se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se pesaron 25gr de fresas de cada punto de muestreo y se inocularon en 225 ml de agua peptona al 1%, las muestras se incorporaron con el agua peptonada mediante movimientos circulares durante 2 min, después se inoculo 1ml en los tubos de ensayo con medio VBL, se incubaron durante 24h a 48h a 35°C ± 1°.

Trascurrido el tiempo de incubación, se observaron los tubos y se consideró como resultado positivo al crecimiento de coliformes fecales a los tubos que presentaron turbidez en el medio asociado a la generación de microorganismos, y la formación de una burbuja de gas dentro de la campana de Durham lo cual se asocia con la presencia de microorganismo fermentadores de lactosa, de las muestras positivas, se tomó una azada y se inocularon en los tubos que contenían el agar caldo EC. con MUG y campana de Durham en su interior; se incubaron por 24h a 48h \pm 2h a 35°C \pm 1°. Pasado el tiempo de incubación, se confirmó el crecimiento de las bacterias a causa de la turbidez en el medio y la formación de una burbuja de gas en la campana a causa de la presencia de microorganismos fermentadores de lactosa.

Los tubos que presentaron turbidez y formación de una burbuja de gas en la campana de Durham fueron expuestos a luz ultravioleta para identificar la posible fluorescencia del genero *E. coli.*, también se les agrego unas gotas del reactivo Kovac's para observar la formación de un anillo purpura en la superficie del caldo en el tubo.

Tinción de Gram

De cada medio de cultivo el cual presento crecimiento típico a *Salmonella* y *E. coli.* se realizó un frotis bacteriano sobre un porta objetos, a la cual se le agregó una solución de cristal violeta transcurrido un minuto,; se decantó la solución de cristal violeta y se adicionó una solución de lugol sobre el frotis, el cual se dejó reposar por un minuto; el lugol se decantó y se enjuago el porta objetos con etanol de forma de goteo constante durante 30 segundos; se realizó un segundo enjuague, con agua destilada para finalmente agregar una solución de safranina, la cual se dejó actuar por 30 segundos; se decantó el colorante se dejó secar, y se observó al microscopio (López *et al*, 2014).

Tinción de Flagelos

De cada medio de cultivo el cual presentara crecimiento típico a *Salmonella* y *E. coli.*, se colocó una gota de agua destilada sobre el extremo de un porta objeto; se tomó con un aza bacteriológica el crecimiento bacteriano y se agregó a la gota de agua formando una suspensión; enseguida se inclinó el portaobjetos, logrando que la suspensión se deslizara de un extremo a otro del portaobjeto, se dejó secar al aire; se agregó mordente, cubriendo todo el recorrido de la gota y se dejó actuar por 10 min; una vez transcurrido el tiempo, se decantó y enjuago con agua destilada evitando que el agua cayera de golpe sobre la preparación; se adicionó una solución de cristal violeta la cual cubrió toda la preparación y se dejó actuar por 2 minutos; finalmente se decantó y enjuagó con agua destilada, se dejó secar al aire y se observó al microscopio (Rodríguez *et al.*, 2005).

Detección Molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó según el método de Doyle y Doyle (1990). Se tomó una azada a cada una de las bacterias, previamente aisladas e identificadas como gram negativas con presencia de flagelos peritricos, anfitricos o lofotricos; se maceraron , en un mortero de porcelana y se añadió 500µl de buffer de extracción (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2 %), se recuperó el macerado, colocándolo en un tubo eppendorf estéril al cual se le adicionó cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se mezcló con la ayuda de un vortex durante 10 segundos o hasta que se homogenizara la mezcla posteriormente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min, con ayuda de micropipetas se recuperó el sobrenadante, se colocó en otro tubo eppendorf estéril y se agregó un volumen igual de isopropanol; se dejaron en reposo durante 10 min a 4°C, para después centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min, se decantó la mezcla sin desprender la pastilla, la cual fue lavada con etanol al 70%, finalmente se resuspendió la pastilla con agua des-ionizada estéril. Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 1% y bajo condiciones de 100 volts

por 30 min y mediante el uso de un foto documentador se observó el ADN de las muestras obtenidas.

Amplificación de PCR

Una vez extraído el ADN de las bacterias obtenidas, se procedió a realizar la técnica de PCR en el termociclador Select Cyclor II (Bioproducts®), usando los primers universales 27F y 1492R para la detección del gen 16s presente en los microorganismos procariontas; se realizó una reacción de 15µl la cual estuvo compuesta por, agua libre de nucleasas, taq master mix 2x, 20 µM de cada primer y 1 µl de ADN. Las condiciones de la reacción para la amplificación del gen fueron 40 ciclos, de 95°C por 5 min, 94°C por 25 seg de desnaturalización, 45 seg de 54°C alineamiento, 72°C por 1 min extensión y extensión final de 72° por 7 min (Abo-Amer y Mohammed, 2015).

Los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en cámara de electroforesis bajo condiciones de 100 voltios por 30 min usando un marcador de peso molecular de 100 pb, esperando obtener un peso de 1400 pb (Abo-Amer y Mohammed, 2015). Obtenidas las amplificaciones del gen 16s se etiquetaron y enviaron al laboratorio UA-Lab, para la obtención de la secuencia del gen amplificado.

Obtenidas la secuencias, se procedió a su comparación utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Información (NCBI) por medio de su programa BLAST, para la comparación de la cadena de nucleótidos obtenidas de cada muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 32 muestras de 16 comercios de la región Centro Norte de México, de las cuales se obtuvieron colonias de características típicas de CT (color rojo oscuro) y su morfología es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm. en los conteos de todas las muestras analizadas (anexo 1 Figura).

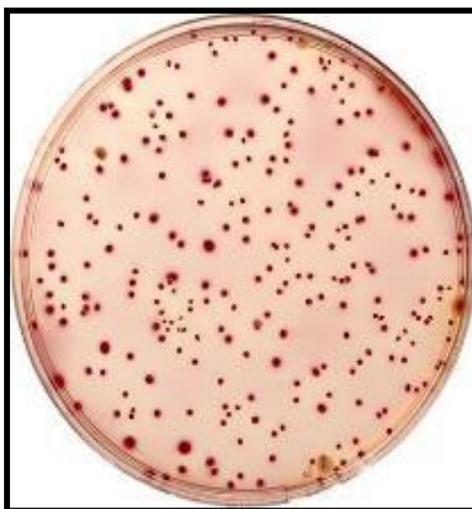


Figura 1.- Placa demostrativa de Coliformes en ARBV (Bioser ©, 2018)

En la figura 2 se puede observar que solo el 16% de los comercios muestreados cumple con la normatividad (nivel de conteo de CT inferior a 100 UFC/mL), cabe señalar que este porcentaje está comprendido por los comercios de cadena nacional e internacional, los cuales al tener un programa de inocuidad establecido por su administración ayuda a mantener las poblaciones de CT en niveles bajos; sin embargo, algunos de los comercios (Cadenas internacionales de la localidad de Ags. e Irapuato y Cadenas nacionales de Irapuato) se encuentran casi sobre el límite estipulado, lo cual nos indica que la frecuencia de las acciones de los programas de sanidad por parte de los establecimientos necesitan ser estrictamente periódicos para no sobrepasar dichos valores.

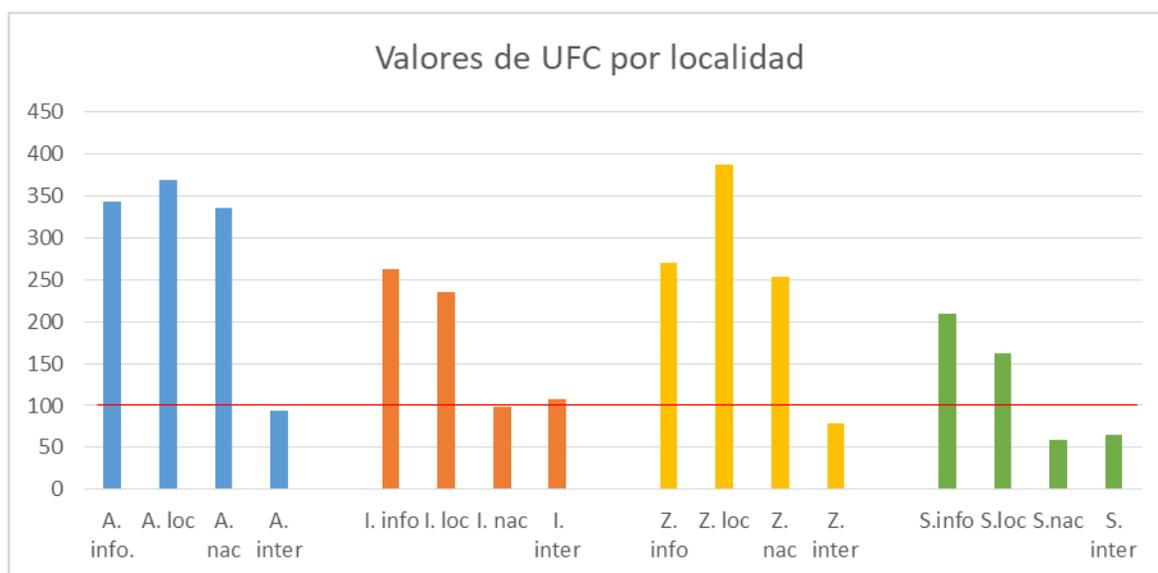


Figura 2.- Grafica de UFC de los diferentes comercios de las diferentes localidades.

Los valores obtenidos del análisis de conteo de CT en las diferentes localidades (Tabla 7) se puede apreciar la variabilidad que existe entre los diferentes tipos de mercado, demostrando que los comercios de tipo informal y local de todas las localidades sobrepasan los límites permisibles por la NOM-093-SSA1-1994.

Tabla 7.- Conteo de UFC de los diferentes centros de las diferentes localidades.

Aguascalientes		Irapuato		Saltillo		Zacatecas	
MUESTRA	UFC	MUESTRA	UFC	MUESTRA	UFC	MUESTRA	UFC
C. Informal	343	C. Informal	262	C. Informal	270	C. Informal	209
C. local	368	C. local	235	C. local	387	C. local	162
C. Nacional	335	C. Nacional	99	C. Nacional	253	C. Nacional	59
C. Internacional	94	C. Internacional	108	C. Internacional	78	C. Internacional	65

La simple presencia de estos microorganismos o su recuento superior a 100 UFC/g en el producto, demuestra una contaminación del mismo (Gallego, 2012); se ha demostrado que la capacidad de infección de este tipo de microorganismos puede ser menor a 20 células, pero su capacidad de infección estará determinada por el estado de salud del hospedante, además de la edad y la diferente toxicidad del microorganismo presente en el alimento contaminado (PHAO, 2016).

De igual manera se puede considerar que los valores obtenidos, no solo son consecuencia de un mal manejo de los programas sanitarios de los comercios, si no que puede ser por la falta de cuidado al empaquetar o transportar el producto a sus distintos puntos de venta (León *et al.*, 2009). Las muestras contaminadas con mayor presencia de CT identificadas en este estudio, son los comercios informales y locales, una característica importante de estos resultados es la proximidad en la cadena de suministro al consumidor, las condiciones en las cuales se oferta el producto y la falta de medidas de higiene; el desarrollo de estudios microbiológicos en cultivos de jitomate como el realizado por Ocaña *et al.* (2015), quienes sugieren que las condiciones de inocuidad del jitomate se ven comprometidas o están directamente relacionadas con la falta de medidas de prevención de los trabajadores durante la cosecha como pueden ser: el uso recurrente guantes, algún tipo de desinfectante o lavado de manos programado por cada cierto tiempo en su jornada.

Ávila *et al.*, (2008) reafirman que las buenas prácticas agrícolas son necesarias para la disminución de este tipo de patógenos presentes en los productos mínimamente procesados para lograr la disminución de estos valores, es necesario contar con un responsable de buenas prácticas agrícolas en cada punto de producción, el cual brinde capacitación constante al personal y optimice el control y vigilancia de estos microorganismos indicadores de inocuidad. Debido a que este tipo de microorganismos son capaces de adquirir sus nutrientes del hospedero y lograr desarrollarse, además de permanecer en el producto por un lapso de tiempo prolongado y conseguir entrar en contacto con el consumidor (Madigant, 2003; Ferrero *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2015).

De las 32 muestras analizadas se logró obtener colonias con características morfológicas similares a *Salmonella* spp. y *E. coli* como las descritas en la NOM-210-SSA1-2014 (Tabla 6). Las cuales están distribuidas en las diferentes localidades (Tabla 8).

Tabla 8.- Crecimiento bacteriano Aguascalientes.

Localidad	Punto de muestreo	Código de muestra	Característica	Concordancia con normatividad
Ags	C. Informal	SB A1	Colonias negras; con o sin brillo metálico (Fig. 3, Anexo 1)	Positivo
		SB A1.2		
	SB A1.3			
	C. Local	VB A1	Colonias color blanco, amarillo verdosa, en medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)	Negativo
VB A1.2				
VB A1.3				
C. Local	SS A1	Colonias de cloración rosa a roja, con bordes definidos, cóncava (Fig. 4, Anexo 1)	Negativo	
	SS A1.2			
	SS A1.3			
C. Local	XLD A1	Colonia de color blanco cremosa, circular, cóncava, sobre fondo amarillo anaranjado (Fig. 6, Anexo 1)	Negativo	
	XLDA1.2			
	XDLA.3			
C. Local	SB A2	Colonias negras; con o sin brillo metálico. (Fig. 3, Anexo 1)	Positivo	
	SB A2.2			
	SB A2.3			

	VB A2	Colonias de color	Negativo
	VB A2.2	blanco, amarillo	
	VB A2.3	verdosa, en medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)	
	SS A1	Colonias de cloración	Negativo
	SS A1.2	rosa a roja, con bordes	
	SS A1.3	definidos, cóncava. (Fig. 4, Anexo 1)	
C.	VB A3	Colonias de color	Positivo
Nacional	VB A3.2	blanco, amarillo	
	VB A3.3	verdosa, en medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)	

Tabla 9.- Crecimiento bacteriano Irapuato.

Localidad	Punto de muestreo	Código de muestra	Característica	Concordancia con normatividad
Irapuato	C. informal	VB I1	Colonias de color	Negativo
		VB I1.2	blanco, amarillo	
		VB I1.3	verdosa, en medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)	
	C. Nacional	SB I3	Colonias negras; con o	Positivo
		SB I3.2	sin brillo metálico.	
		SB I3.3	(Fig. 3, Anexo 1)	

Tabla 10.- Crecimiento bacteriano Zacatecas.

Localidad	Punto de muestreo	Código de muestra	Característica	Concordancia con normatividad	
Zac.	C. Informal	VB Z1	Colonias de color	Negativo	
		VB Z1.2	blanco, amarillo		
		VB Z 1.3	verdosa, en medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)		Positivo
			Tubos con turbidez y formación de gas, con fluorescencia (Fig.7, Anexo 1)		
C. Local	VB Z2	Colonias color blanco,	Negativo		
	VB Z2.2	amarillo verdosa, en			
	VB Z2.3	medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)			
C. Nacional	VB Z3	Colonias color blanco,	Negativo		
	VB Z3.2	amarillo verdosa, en			
	VB Z3.3	medio de fondo amarillo verdoso. (Fig. 5, Anexo 1)			
C. internacional	SB Z4	Colonias negras; con	Positivo		
	SB Z4.2	o sin brillo metálico.			
	SB Z4.3	(Fig. 3, Anexo 1)			

Tabla 11.- Crecimiento bacteriano Saltillo.

Localidad	Punto de muestreo	Código de muestra	Característica	Concordancia con normatividad
Sal.	C Nacional	VB S3	Colonias blanco,	Negativo
		VB S3.2	amarillo verdosa, en medio de fondo	
		VB S3.3	amarillo verdoso (Fig. 5, Anexo 1)	

Tabla 12.- Cepas Totales del Muestreo

Localidad	T. C	S. S	Gn /F	S. Ec	Gn /F	OTRAS	Gn /F	S/S
AGS	36	12	6	15	15	3	3	6
IRA	33	21	6	9	6	-	-	3
SAL	33	21	3	9	3	-	-	3
ZAC	33	21	3	9	9	-	-	3

T.C.- Total de cepas, S.S.- similar a *Salmonella*, Gn.- Gram negativo, F.-Flagelos, S. Ec.- Similar a *E. coli*, S/S.- Sin Similitud.

Conforme al análisis molecular realizado en cada cepa obtenida de cada localidad se demuestra que, los microorganismos presentes son: *Klebsiella variicola*; en la localidad de Aguascalientes comercios informales y comercios de cadena nacional; en Zacatecas, en los comercios locales; *Klebsiella aerogenes*, en la localidad de Aguascalientes en el comercio local; *Bacillus subtilis* en la localidad de Irapuato en los comercios informales y Zacatecas en los comercios informales; *Pantoea agglomerans*, en la localidad de Irapuato en los comercios nacionales y Saltillo en los comercios nacionales; *E. coli* Y *Citrobacter* sp. en la localidad de Zacatecas en los comercios informales y finalmente, *Bacillus licheniformis* en la localidad de Zacatecas en los comercios nacionales.

Las bacterias que forman parte de la microbiota del intestino del ser humano y de otras especies animales se les conoce también como coliformes, estas bacterias pertenecen a la familia enterobacteriaceae la cual incluye alrededor de 30 géneros, las cuales son capaces de generar ETA (Rebins *et al.*, 2016); las bacterias identificadas en este estudio pertenecen a esa familia y contienen diversas características (Tabla 13), los reportes de estas bacterias en diferentes productos vegetales cada vez es mayor y su identificación en los alimentos y su alta capacidad de resistencia ante antibióticos es un aspecto relevante en la industria alimentaria como en la salud pública (Zang *et al.*, 2018).

Tabla 13.- Características generales de Enterobacterias.

Forma	Gram	Fermenta carbohidratos	oxidasa	Anaerobio facultativo	Catalasa
Bacilo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

Existen bacterias las cuales son recurrentes dentro del grupo de coliformes, por ejemplo *Citrobacter* sp, la cual se ubica dentro de los coliformes y es considerada por generar infecciones en las vías urinarias, el hábitat natural de *Citrobacter* es el medio ambiente, en suelo, agua, aguas residuales, alimentos, e incluso en el ser humano, se pueden encontrar en los órganos internos de los animales, especialmente los anfibios, reptiles, mamíferos y aves, que consume productos frescos contaminados, generalmente se le relaciona con la presencia de bacterias como *Kebsiella* sp (Campuzano *et al*, 2015; Soto *et al*, 2016).

La bacteria identificada en este estudio *Klebsiella* es encontrado generalmente en condiciones hospitalarias, aprovechando las condiciones inmuno suprimidas de los pacientes, sin embargo cada vez más son los reportes de aislamiento de este microorganismo en alimentos crudos o frescos como lo es el jitomate, la lechuga o el pepino, los cuales son comercializados en puestos ambulantes y mercados (Pilar *et al.*, 2013). Su proliferación se da por contacto directo con agua

de drenaje y heces tanto de animales como de humanos; investigaciones alrededor del mundo han demostrado que *Klebsiella* ha adquirido resistencia a diferentes antibióticos como lo son el sulfamethoxazole, ampicilina y ácido clavulánico principalmente; es importante vigilar y monitorear la resistencia a antibióticos hacia esta bacteria presente en los alimentos y así lograr un tratamiento efectivo de control y evitar posibles brotes (Touati *et al.*, 2017).

Dentro de las bacterias asociadas a los coliformes también se identificó la presencia de la bacteria *Pantoea agglomerans*, de igual manera se encuentra en las heces de los animales y de humanos y es considerada como un organismo oportunista el cual tiene la habilidad de generar enfermedades gastrointestinales en hospederos inmuno suprimidos (Muñoz *et al.*, 2014); se ha detectado su presencia en productos vegetales frescos como lo son jitomate, lechuga y pepino los cuales pueden llegar a contaminarse por medio del contacto directo con suelo contaminado, o por el esparcimiento del agua de riego contaminada, los productos frescos alimenticios son el principal medio de propagación de esta bacteria al ser distribuidos o comercializados en mercados y comercios informales; la resistencia a antibióticos también está presente en este microorganismo, siendo resistente al ácido clavulánico, amoxicilina y ampicilina (Falomir *et al.*, 2010).

La incidencia de la bacteria *E. coli* en este estudio, fue en los comercios informales, autores como Ferrero *et al.* (2010), reportan la presencia de esta bacteria en productos frescos que se ofertaban en mercados de la localidad de Centenario en Huacho, Perú; algunos de los productos ofertados en este mercado fueron melón, lechuga, rabanito, y fresa; demostrando que las condiciones en donde son expendidos este tipo de productos es determinante para encontrar o no a este tipo de microorganismos patógenos, además de que las prácticas comunes de esa localidad son las de lavar las frutas que se van a comercializar con agua de río que posiblemente esté contaminada. Así mismo Cuevas *et al.* (2009), demostraron que uno de los factores de contaminación es el agua de riego utilizada, pues al realizar un análisis microbiológico de suelo y

agua de riego de la región del valle de Culiacán, Sinaloa; encontraron cargas microbianas promedio de 1.6×10^4 UFC/100 mL del patógeno, sin embargo de manera complementaria realizo pruebas de resistencia a antibióticos en contra de las cepas que identificaron y aislaron de su análisis, demostrando que de las 46 cepas de *E. coli* recolectadas, 38 fueron resistentes a estreptomycin; lo cual es un foco de alerta, se utilizan medidas correctivas que al paso del tiempo pueden resultar en graves consecuencias.

CONCLUSIÓN

Se logró identificar mediante el conteo de Coliformes Totales, los posibles puntos de riesgo en la venta de productos frescos conocidos también como mínimamente procesados; demostrando que los comercios informales, como locales son los que presentan mayor densidad de Unidades Formadoras de Colonias; así como se logró determinar la presencia de *E. coli* en comercios informales en el estado de Zacatecas, adicionalmente se registró la presencia de otras enterobacterias identificadas como *Klebsiella variicola*, *Pantoea agglomerans* y *Citrobacter* sp, lo cual evidencia la presencia de más microorganismos los cuales también son causantes de enfermedades entero gástricas; por lo que su correcta identificación es fundamental para evitar brotes epidemiológicos por alimentos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Amer Aly E., Shobrak Mohammed Y. Isolation and Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Salmonella, Shigella and Proteus from Domestic Birds, The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2015, 45, 23-34.
- Alam MJ, Zurek L. (2006). Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle Enterohemorrágica O157 H: 7. Comentario en relación a dos casos clínicos, Revista chilena de pediatría, Revista Chilena de pediatría. 2006. Vol.70, n.3, Available from: doi.org/10.4067/S0370-41061999000300008
- AOAC (2018) Método Oficial de Análisis. Métodos microbiológicos. 2007. Consulta: 15 de mayo del 2018. Disponible en: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1_ensp.htm
- Ávila, G., E. Sánchez, E. Muñoz, L. R. Martínez y E Villalobos. Diagnóstico de la calidad microbiológica en frutas y hortalizas en Chihuahua, México. Python, Revista Internacional de Botánica Experimental. 2008, 77, 129-136.
- Béjar Gardea A, Gonzalez, A., G. Higuera-Ciapara A.I., & Cuamea Navarro F. Buenas prácticas en la producción de alimentos: productos pecuarios, productos agrícolas, productos acuícolas, Procesamiento de alimentos. Trillas 2007.
- Betancor, L., Pereira, M., Martínez, A., Giossa, G., Fookes, M., Flores, K., Barrios, P., Repiso, V., Vignoli, R., Cordeiro, N., Algorta, G., Thomson, N., Maskell, D., Schelotto, F., Chabalgoity, J.A. Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Journal of Clinical Microbiology. 2010. 48, 2413-2423.
- Beuchat LR, Ryu JH. Produce handling and processing. Emerging Infectious Diseases. 1997, 3, 459-465.
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. *Salmonella* nomenclature. Journal of Clinical Microbiology. 2000. 38, 24-65
- Caballero Torres Ángel E., Temas de higiene de los alimentos., editorial ciencias médicas, Colombia: Editorial ciencias médicas. 2008, 16, 223-239.
- Campistol Josep m., Arias Manuel, Ariceta Gema, Blasco Miguel, Espinosa Mario, Grinyó Josep M., Praga Manuel, Torra Roser, Vilalta Ramón, Rodríguez de Córdoba Santiago. Actualización en síndrome hemolítico urémico atípico: diagnóstico y tratamiento. Documento de consenso, Revista Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología, Nefrología. 2013, 33, 127-45

- Campuzano Silvia, Mejía Flórez Dayana, Madero Ibarra Catalina, Paola Pabón Sánchez Catalina. Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. NOVA., 2015, 13 23 81-92
- Canadian food inspection agency, Food Recall Warning- Certain sesame seeds recalled due to salmonella, Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2018-01-25/eng/1516924920359/1516924931724#r05>
- Canadian food inspection agency, Update Food recall warning hello fresh Brand sesame seeds recalls due to salmonella. Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2018-01-26/eng/1517028958690/1517028961693>
- Canadian food inspection agency, Update Food recall warning brand sesame seeds recalled due to salmonella. Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2018-01-26/eng/1517002692037/1517002695280>
- Carvajal de Pabón, Luz Marina, El Hadi, Yahia, Cartagena, Regulo, Peláez, Carlos, Gaviria, Carlos A, & Rojano, Benjamín Alberto. Capacidad antioxidante de dos variedades de *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa) sometidas a variaciones en la nutrición vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012., 17 1, 37-53.
- CDC (2017) Works saves lives everywhere, every day, 2017 Consulta: 13 abril 2018 Disponible en: <https://www.cdc.gov/about/24-7/savinglives/index.html>
- CFIA (2018), Food recall warnings high-risk. Consulta: 11 de abril 2018 disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/eng/1299076382077/1299076493846>
- Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneff J, Cocito C, Gala J. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, 38, 3048-3054.
- COFEPRIS (2017) SECRETARIA DE SALUD 2014, Consulta: 3 de mayo del 2018 Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/cofepris/Paginas/VisionYMision.aspx> SECRETARIA DE SALUD 2014 /3/05/18
- COFEPRIS (2018) Alerta sanitaria regularizada, producto importado pistache contaminado Consulta: 14 de mayo del 2018 Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/211093/Alerta_Sanitaria_Pistaches_Regularizada_120417.pdf

Control Diseases Centre (2017) Multistate outbreaks of Salmonella urbana infections Linked to imported maradol papayas (Final Update), Consulta: 3 febrero 2018 Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/urbana-09-17/index.html>

De la Fuente, M. Effects of antioxidants on immune system ageing. European Journal of Clinical Nutrition. 2002, 56, 55-8.

Dirección general de epidemiología (2017), Sistema nacional epidemiológico, boletín epidemiológico, (2017). , Numero 45, Volumen 34, Semana 45, del 5 a 11 de noviembre del 2017. Consulta: 23 noviembre 2017 Disponible en: www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/273715/sem45.pdf

DuPont HL. . (2008) Systematic review: prevention of travelers' diarrhea, Aliment Pharmacology Therapeutics, 2008, 27, 741–751.

Echánove, F. 2001. Abastecimiento a la ciudad de México: El caso de los pequeños productores de fresa de Guanajuato. Investigación Geográfica. 2001, 45, 128-148.

Environment Agency. The Microbiology of Drinking Water. Part 1 – Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Bristol, 2002.

Estrada Soto Guadalupe, Moreno Altamirano Laura, Pahua Díaz Daniel., Panorama Epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad, Departamento de Salud Pública. Facultad de medicina. Universidad nacional autónoma de México. 2016, 59

Falomir M.P., Gozalbo D. and Rico H. Coliforms bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Spain 2010

FAO (2018) Codex Alimentarius. Principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de los Criterios Microbiológicos para los alimentos: CAC/GL 21 – 1997. Consulta: 15 de mayo del 2018. Disponible en: www.fao.org/input/download/standards/394/CXG_021s.pdf Codex Alimentarius. Principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de los Criterios Microbiológicos para los alimentos: CAC/GL 21 – 1997.

FDA (2018) Guidance for FSMA Regulation 2017. Consulta: 11 de mayo del 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/default.htm> 11/05/18

FDA (2018) Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant. Manual Analítico Bacteriológico, Capítulo 4, La enumeración de *E. coli* y las bacterias

- coliformes, marzo de 2012 Consulta: 15 de mayo del 2018. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.
- FDA (2018) Regulation of FSMA, Consulta: 11 de mayo del 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm284406.htm> 02/01/18
- Fernández Núñez F. Giardiasis. En. Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco MM, Zuazo Silva JL. , editores. Tratado de Microbiología y Parasitología Médica. La Habana: Ciencias Médicas. 2001, 8, 31-37.
- Ferromaque Meza María del Rosario; Manrique León, Brunilda Edith, Ayala Ariadela Lizardo. Coliformes fecales y *E. coli* en Fresa, Melón, Lechuga, y Rabanito que se Expenden en el mercado Centenario. Huacho. Revista de ciencia y Tecnología Vol.1 (1) 2011.
- Fierer, J., Guiney, D.G., 2001, Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. Journal of Clinical Investigation. 2001, 107, 775-780.
- Financiera nacional de desarrollo agropecuario, rural, forestal y pesquero (2017) Panorama de la fresa, enero 2015, Consulta: 8 octubre 2017. Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Fresa.pdf>
- Food recall warning Montana Brand frozen strawberries recalled due to hepatitis A, Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/foodrecallwarnings/complete-listing/2018-04>
- Food recall warning- Buena's Brand grated coconut recalled due to *Salmonella*, Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/foodrecallwarnings/complete-listing/2018-04-15/eng/1523849246712/1523849248686>
- Food recall warning various brands of coconut product's recalled due to *Salmonella* Consulta: 11 de Abril 2018 Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2018-01-24/eng/1516842455613/1516842460165>
- Valdés-Dapena Vivanco MM. Enterobacterias. En. Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo. JL editores. Tratado de Microbiología y Parasitología Médica. La Habana: Ed. Ciencias Médicas. 2001, 252-80.

- Galanis, Eleni, et al. Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000–2002. *Emerging infectious diseases.*, 2006, vol. 12, 381-388
- Gallego Jesús Felipe. Aplicación de normas y condiciones higiénico-sanitarias en restauración, España: Ediciones Paraninfo., España, 2012, pg. 97-98, ISBN 13: 9788428332897
- Global Estándar Certification (2018), Consulta: 11 de mayo del 2018 Disponible en: <http://www.globalstd.com/certificacion/iso-9001/que-es-el-fsma>
- Gómez Duarte Oscar G., (2014), Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia, *Revista chilena de infectología.* 2014 Vol., 5, 31 no.5 Santiago oct. 2014.
- Gómez, MA. Evaluación microbiológica de frutas y hortalizas expendidos en la zona metropolitana de Monterrey, N. L., mediante tecnologías rápidas. 2009. Tesis (M.C.). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- GOV, (2018) government publishing office 2011. Consulta: 13 de mayo del 2018. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-111publ353/pdf/PLAW-111publ353.pdf> government publishing office 2011
- Greig JD, Todd ECD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection* 2007, 70, 1752-1761.
- Gui J, Patel IR. Recent advances in molecular technologies and their application in pathogen detection in foods with particular reference to *Yersinia*. *Journal Pathogen Pathology.* 2011, 310, 1-35.
- Haller L., Pote J., Loizeau J-L., Wildi W. Distribution and survival of fecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Ecology. Indicators.* 2009, 9, 540-547.
- Promexico (2018) inversión y comercio, pasos para exportar. Consulta: 11 de mayo del 2018 Disponible en: <http://www.promexico.gob.mx/es/mx/pasos-exportar,2017>, promexico, inversión y comercio, pasos para exportar.
- DGV-SINAVE (2018) programas epidemiológicos Consulta: 5 de mayo del 2018 Disponible en: [5/05/18https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica](https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica)
- Instituto nacional de cancerología. , (1996), Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México, instituto nacional de la nutrición "Salvador Zubiran". , Editorial Pax, México, México: Editorial Pax, 1996.

- Izumi H, Poubol J, Hisa K, Sera K. Potential sources of microbial contamination of satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. *Journal of Food Protection*. 2008, 71, 530-538.
- Jay J. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A: Zaragoza, (España: Editorial Acribia S.A. :).2002, 4 edición, 615 pp.
- Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Anciso J, Mora B, Moe CL. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*. 2006. 112, 83-95.
- León JS, Jaykus LA, Moe CL. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: *Microbiologically Safe foods*. 2009., Heredia N, Wesley I, García S. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, pp. 255-290.
- Jurado Jiménez R. , Arenas Muñoz C. , Doblaz Delgado A., Rivera A., J. Torre Cisneros. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas, *Medicine*. Córdoba, España: 2010, 102 497-501.
- Lan, R., Reeves, P.R., Octavia, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection Genetics Evolution*. 2009, 9, 996-1005.
- Langridge, G.C., Nair, S., Wain, J. Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally. *Journal of Infections Diseases* 2009, 199, 602-603.
- Lorenzo, Tamara Díaz, Gálvez Marta Cardona. Las Buenas Prácticas de Manipulación de Alimentos en el hospital. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. , 2015, vol. 25, 1, 22.
- Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: Towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69, 290-296.
- Marathe S, Chowdhury R, Bhattacharya R, Govindasamy A. et al. Chakravorty. .Direct detection of Salmonella without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against hilA gene. *Food Control*. 2012, 23, 559-563.
- Mc Veigh A, Fasano A, Scott DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson. IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxigen embedded in a transposase-like gene. *Infection and Immunity*. 2000, 68, 5710 - 5715.
- México Calidad Suprema (2018) Certificaciones 2018. Consulta: 13 de mayo del 2018. Disponible en: <http://mexicocalidadsuprema.org/certificaciones/2018-certificaciones>
- Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections linked to chopped romaine lettuce, 2018 Consulta: 13 abril 2018 Disponible en: <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html>

- Multistate outbreak of Salmonella Montevideo linked to raw sprouts (final update)
 Consulta: 13 abril 2018 Disponible en:
<https://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-01-18/index.html>
- Multistate outbreak of Salmonella typhimurium linked to dried coconut Consulta:
 13 abril 2018 Disponible en:
<https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-03-18/index.html>
- Muñoz Soto Lourdes, Teixidó Neus Josep Usall, Torres Rosario, Viñas Inmaculada. Detection and quantification by PCR assay of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 on apples, International Journal of Food Microbiology. 2014, 75, Pg45-52 Available from: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.014
- Navarro C, Muñoz-Garmendia. Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. 6. Real Jardín botánico. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. , CISC, Madrid, Spain: CISC. 2005. 6, 88-93
- NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método Para La Determinación De Salmonella En Alimentos.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Prácticas De Higiene Y Sanidad En La Preparación De Alimentos Que Se Ofrecen En Establecimientos Fijos.
- Ocaña-de Jesús RL, Gutiérrez-Ibáñez AT, Sánchez-Pale JR., Mariezcurrena-Berasain MD, Velázquez-Garduño G, Laguna Cerda A, Rojas Puebla. Calidad microbiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido bajo condiciones de invernáculo en 5 Municipios del Estado de México. Python, Revista Internacional de Botánica Experimental. 2015, 84, 45-50
- OMS (2007), Manual de las 5 claves para la inocuidad de los alimentos, Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria 2018, Consulta: 23 de octubre del 2017. Disponible en:
www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf, ISBN 978 92 4 359463 7, Francia.
- OMS, (2015) Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Consulta 12 de noviembre de 2018, disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>
- OPS (2018), Enfermedades transmitidas por alimentos, (2016,), Consulta: 4 enero 2018. Disponible en:
www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1083

6%3A2015enfermedadestransmitidasporalimentoseta&catid=7678%3Aha
ccp&Itemid=41432 lang=pt

FAO (2018), Segunda conferencia internacional sobre nutrición, Roma, Italia 19-21 Noviembre de 2014. Consulta: 27 febrero 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ml542s.pdf>

FAO (2017) Faostat, Datos de cultivos por producción hasta el año 2016. Consulta: 8 diciembre 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

OMS (, 2015) 5, Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria (2015), Consulta: 15 de diciembre del 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>

Osvaldo López Cuevas, Josefina León Félix, Maribel Jiménez Edeza y Cristóbal Chaidez Quiroz. Detección y Resistencia a Antibióticos de Escherichia coli y Salmonella en Agua y suelo Agrícola, Revista de Fitotecnia México 2009 32 119- 126, 2009

Palomino-Camargo C, González-Muñoz. Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Revista Peruana de Medicina Experimental. Salud Pública Pública. 2014, 31, 3, 535-546.

Pamplona Roger Jorge D. Salud por los alimentos, editorial Safeliz S.L. colmenar viejo Madrid, España: editorial Safeliz. 2006, 1ª edición pg. 108.

Panamerican Health Organization, 2016, Control sanitario Peligros biológicos, Consulta: do el día 21 de mayo del /05/2018, tomado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838%3A2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaaccp&Itemid=41432&lang=en,

Paruch A., Maehlum T. Specific features of Escherichia coli that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of fecal contamination in the environment. Ecológica Indicators. 2012, 23, 140-142.

Pedraza Jose Bernardo Gonzalez, Sanandres Nicole Soto Pereir Amira A. Zamira Soto Varela José Villarreal Camacho. Aislamiento de Salmonella spp y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte, 2014, vol. 30, no 1.

Petterson SR, Teunis PF, Ashbolt NJ. Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. Risk Analysis. 2001. 21, 1097-1108.

- Pilar Falomir María, Rico Hortensia, Gozalbo Daniel. Enterobacter and Klebsiella Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents, Department of Microbiology and Ecology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, and Burjassot, Spain. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*. 2013, Available from: DOI: 10.1089/fpd.2013.1552
- Piug Yamila, Leyva Virginia, Rodríguez Suárez Armando, Carrera Vara José, L. Molejón Pedro, Pérez Muñoz Yoldrey, Dueñas Moreira Odeite. Calidad Microbiológica de las Hortalizas y Factores Asociados a la Contaminación en Áreas de Cultivo en La Habana., *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 2013, 13, 111-1119.
- Primus lab (2018) Home page 2018 Consulta: 13 de mayo del 2018. Disponible en: <http://www.primuslabs.com>
- Promexico (2018) inversión y comercio, pasos para exportar. Consulta: 11 de mayo del 2018 Disponible en: <https://www.publimetro.com.mx/mx/noticias/2018/03/13/ninos-117-alimentos-intoxicacion.html> 26/04/18
- Rabins Leonal, Bhattacharya S., Kumar Ajay A., J.V. Vijayan. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* from fresh vegetables marketed in Puducherry. *International Journal of Current Research*. 2016, 10, 40598-40603.
- Riveros Maribel, Barletta Francesca, Cabello Martín, Durand David, Mercado Erik H., Contreras Carmen, Rivera Fulton P., Mosquito Susan, Lluque Ángela, Ochoa Theresa J. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli*, difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea, *Revista Peruana Medicina Experimental, Salud Publica*. 2011, 28, 21-28.
- Rodríguez Ángeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Salud Publica*, México. , 2002, 44, 464-475.
- Rojas-Herrera Rafael Antonio, González-Flores Tania. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, *bioquima, media graphic artemisa en línea*. 2006, Volumen 31, No. 2 Abril-Junio 2006. p. 69-76.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2013. Consulta: 8 diciembre 2017. Disponible en: www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119
- SAGARPA (2017) Consulta: 3 de mayo del 2018 Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/senasica/Paginas/default.aspx> SAGARPA 2016

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA (2017)), Planeación agrícola nacional 2017-2030, fresa mexicana., Consulta: 18 diciembre 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- SAGARPA, (2017), Planeación agrícola nacional 2017-2030, Primera edición, © Documento Reproducido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consulta: 3 febrero 2018 Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- SAGARPA (2017), Sistema de Información Comercial Vía Internet (SIAVI) 2017, Consulta: 18 diciembre 2017. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_00134_14.aspx
- SAGARPA (2018) BLOGS 2016. Consulta: 11 de mayo del 2018 Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/la-inocuidad-alimentaria-es-la-base-de-nuestra-salud> Sagarpa blog 2016
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA (2018)), Sistema de Información Comercial Vía Internet (SIAVI), (2017), Consulta: 18 diciembre 2017. Disponible en: <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Sánchez, R. G. La red de valor fresa. Fundación Produce, 1aEd. Morelia, Michoacán, México: Laser Impresores, 2008. 17-108 pp.
- SE (2018) programas y acciones de normatividad 2018 Consulta: 14 de mayo del 2018. Disponible en: www.gob.mx/se/acciones-y-programas/competitividad-y-normatividad-normalizacion
- Shaw Angela Laury, Svoboda Amanda, Jie Beatrice, Nonnecke Gail, Mendonca Aubrey. Survival of *Escherichia coli* on strawberries grown under greenhouse conditions, Food Microbiology. 2015, 46, 200 - 203. Available from: DOI: 10.1016/j.fm.2014.06.027.
- Shaw, A. L., Svoboda, A., Jie, B., Nonnecke, G., & Mendonca, A. Survival of *Escherichia coli* on strawberries grown under greenhouse conditions. Food Microbiology. 2015, 46, 200-203.
- SIAP (2018), Producción de fresa a nivel nacional situación a 31 de enero 2018, Consulta: 12 enero 2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>,
- SINAVE (2017) Consulta: 3 de mayo del 2018 Disponible en: [alertas .gob.mx](http://alertas.gob.mx) SENASICA Profeco, cofepris 4/05/18

- Soto Varela Zamira, Pérez Lavallo Liliana, Estrada Alvarado Dalidier. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia, artículo de revisión, Salud Uninorte. Barranquilla, Colombia. 2016, 32, 105-122
- Touati Abdelaziz, Mairi Assia, Baloul Yanis, Lalaoui Rym, Bakour Sofiane, Thighilt Lilia, Gharout Alima, Rolain Jean-Marc. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria, Journal of global antimicrobial resistance. 2017. Available from: DOI:10.1016/j.jgar.2017.02.006
- Venezuela Elvia Michelle, Adriana Milla, Nectarina Rodolfo, Mirian Michelle, Jesús Luigi, Numeran Carreño, Marcos de Donato. Identificación de *Escherichia coli* entero patógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Biomédica. 2016 366 118-27
- Vidal Graniel Jorge e. *Escherichia coli* entero patógena (EPEC): una causa frecuente de diarrea infantil, salud en tabasco, abril, año/vol. 9, número 001 secretaría de salud del estado de tabasco, Villa Hermosa, México: pp. 2003 188-193.
- Villarreal, J L, Soto Z, Pereira N, Varela P, Jaramillo R, Mendoza E, Villanueva D.et ALL alone (2008) Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Salmonella spp. En leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. Salud. Universidad. Norte. 2008, 24, 2, 216-225.
- Von Sperling M. Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal. Biological Wastewater Treatment. IWA, Publishing London. 2007, vol 1.
- WHO (2015) Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria”, Consulta: 21 de octubre del 2017. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO_FOS_15.02_spa.pdf?ua=1
- Zhang S, Yang G, Ye Q, Wu Q, Zhang J and Huang Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. Frontiers. Microbiology. 2018, 9, 289. Available from: DOI: 10.3389/fmicb.2018.00289
- Zorrilla, A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev. Cubana Investigación. Biomedicina. 2002, 21, 3, 178-85.

ANEXOS

Figura 3.- Placa demostrativa de Coliformes en ARBV (Bioser ©, 2018)

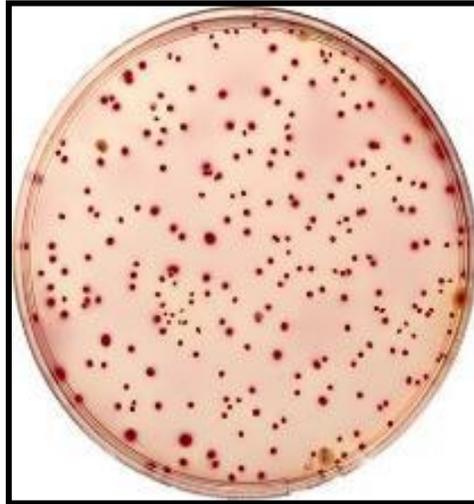


Figura 4.- Placa demostrativa de Coliformes

Figura 3. - Crecimiento bacteriano presentado en Agar Sulfito Bismuto: Crecimiento bacteriano de coloración café obscura, tornándose Negro, con brillo metálico, de forma cóncava, irregular.



Figura 5.- Crecimiento bacteriano en agar Sulfito Bismuto.

Figura 4.- Crecimiento bacteriano en agar Salmonella Shigella: Crecimiento microbiano de coloración rosa, forma cóncava, circular, con bordes definidos.



Figura 6.- Crecimiento bacteriano en agar SS

Figura 5.- Crecimiento bacteriano en agar Verde Brillante: Crecimiento de colonia de color blanco amarillo verdoso, cóncavo, de forma circular, con bordes definidos, sobre fondo de color amarillo verdoso.

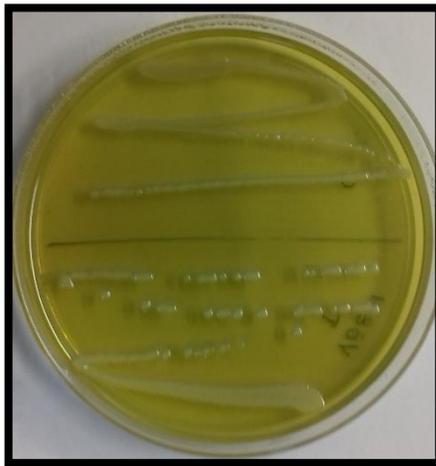


Figura 7.- Crecimiento bacteriano en agar Verde Brillante.

Figura 6. Crecimiento bacteriano en agar XLD: Crecimiento bacteriano blanco cremoso, circular puntiforme, cóncava, sobre fondo de color amarillo anaranjado.



Figura 8.- Crecimiento bacteriano en agar XLD.

Figura 7.- Crecimiento bacteriano en medio caldo EC. con Mug TM Media®, generación de bacterias fermentadoras de lactosa, cambio de caldo cristalino a generar turbidez en el caldo, formación de gas en campana de durham, fluorescencia expuesta a luz ultravioleta.



Figura 9.- Crecimiento bacteriano en caldo EC. con Mug.

Figura 10.- Crecimiento de bacterias coliformes en ARBV, colonias biconvexas de 2 a 5 mm, de coloración roja violeta.

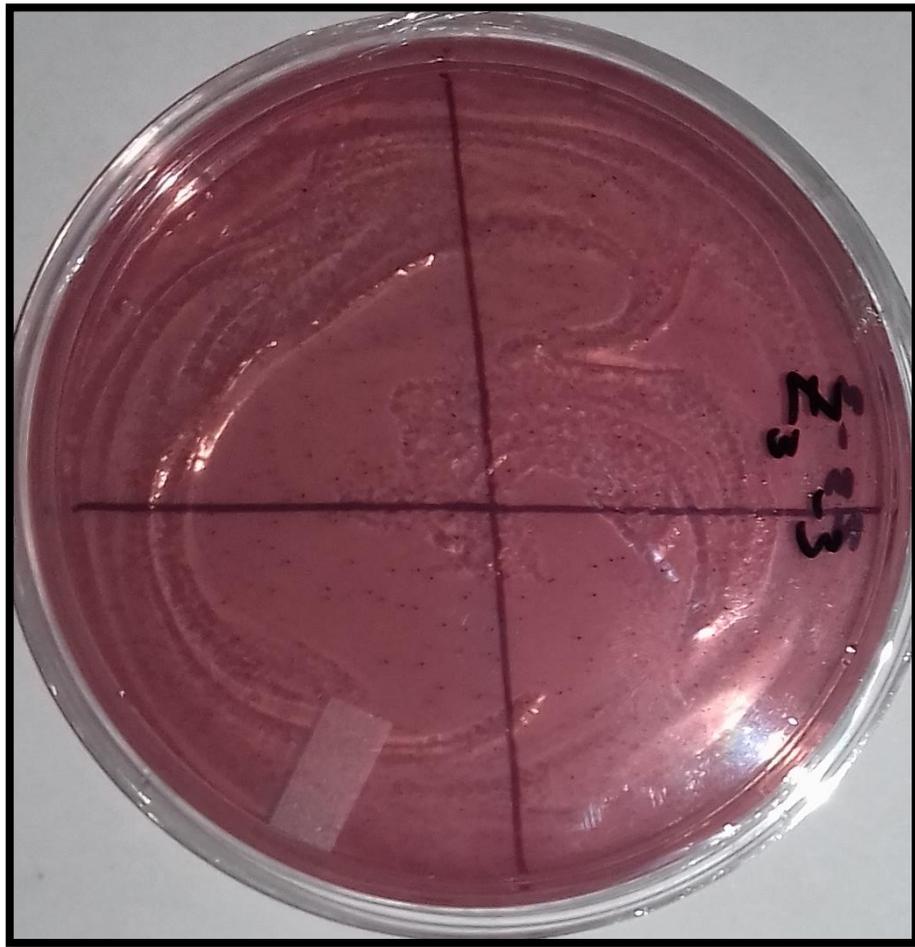


Figura 8.- CT en ARBV.