



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR
ENCAMINADA A LA CONFIRMACIÓN DEL GÉNERO *SALMONELLA* EN
AISLADOS DE MANIPULADORES DE LA AGROINDUSTRIA DEL AGUACATE
EN MICHOACÁN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q.F.B. JUVENTINO AGUILAR VALLE

ASESOR:

D.C. RAFAEL ORTÍZ ALVARADO

MORELIA MICHOACÁN, JUNIO DEL 2010



ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE SIGLAS.....	vi
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Aguacate.....	5
3.2 Municipios Productores de Aguacate	5
3.3 Protocolo para la Producción de Aguacate.....	8
3.4 Comité Estatal de Sanidad Vegetal	8
3.5 Organización para Exportar Aguacate (APEAM).....	11
3.6 Exportación de Aguacate por la APEAM	11
4. IMPORTANCIA DE LA INOCUIDAD ALIMENTARIA	15
5. NORMATIVIDAD NACIONAL.....	17
6. MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	18
7. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.....	23
7.1 Características.....	23
7.2 Identificación presuntiva	24
7.3 Características de relevamiento	24
7.4 Implicaciones en salud pública	25
8. TRIBU SALMONELLEAE	27
8.1 Clasificación.....	27

8.2 Incidencia y fuentes de salmonelosis	30
9. JUSTIFICACION.	31
10. HIPÓTESIS	32
11. OBJETIVO GENERAL	33
12. OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
13. MATERIALES Y MÉTODOS	34
13.1 Medios de cultivo	34
13.2 Extracción del RNA.....	34
13.3 Reacción en cadena de la polimerasa	36
13.4 Sistema de amplificación (Retrotranscripción).....	36
13.5 Secuencia génica.....	37
14. RESULTADOS	39
15. DISCUSIÓN.....	45
16. CONCLUSIONES.....	47
17. GLOSARIO.....	48
18. BIBLIOGRAFIA	51
ANEXO.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución municipal de la superficie con aguacate en Michoacán...	7
Tabla 2. Muestreos de fruto de aguacate ‘Hass’ realizados por las Juntas Locales de Sanidad Vegetal (JLSV) de Michoacán y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para detectar barrenadores del hueso.....	10
Tabla 3. Evolución de la exportación de aguacate ‘Hass’ de México a los EE.UU.....	12
Tabla 4. Municipios de Michoacán que exportaron aguacate ‘Hass’ a los EE.UU. en la temporada 2003-04.....	13
Tabla 5. Clasificación en tribus de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	27
Tabla 6. Características claves para la identificación de <i>Salmonella</i>	29
Tabla 7. Clasificación del género <i>Salmonella</i>	30
Tabla 8. Secuencia peptídica del gen <i>hilA</i> de <i>Salmonella</i>	39
Tabla 9. Secuencia nucleotídica del gen <i>hilA</i> de <i>Salmonella</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	3
Figura 2. Localización de los 20 municipios productores de aguacate del estado de Michoacán.....	6
Figura 3. Proceso por el cual los alimentos pueden ser contaminados por los manipuladores y provocar diversas enfermedades.....	19
Figura 4. Pasos para la obtención del aguacate para su comercialización a partir de la cosecha.....	23
Figura 5. Sitios anatómicos de la toma de muestra.....	37
Figura 6. Muestras positivas para el producto de amplificación del gen HIA provenientes de las cepas de Salmonella.....	46

ABREVIATURAS

°C= grados centígrados.

cDNA= DNA complementario

dNTP= Desoxinucleótidos trifosfato, (sustrato para polimerizar nuevo ADN)

g= gramo

ha= hectárea

lbs= libras

min= minuto

ml= mililitro

mmol= milimol

Mm= milimolar

nm= nanómetros

pb= pares de bases

pmol= picomol

rpm= revoluciones por minuto

seg= segundo

sp= sin especie

T= temperatura

v= voltios

µg= microgramos

µL= microlitros

µm= micrómetros

µmol= micromol

%= por ciento/porcentaje

SIGLAS

APEAM: Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, A.C.

APROAM: Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate de Uruapan Michoacán.

CDC: Centers for Disease Control (Centro para el Control de Enfermedad)

CESV: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Michoacán.

CIALIM: Consultores en Inocuidad Alimentaria, S.C.

CONAPO: Consejo Nacional de Población.

ETAs: Enfermedades Transmitidas por Alimentos.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos)

JLSV: Juntas Locales de Sanidad Vegetal.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

OCDE: Organización de Cooperación para el Desarrollo Económico.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

1. RESUMEN

IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR ENCAMINADA A LA CONFIRMACIÓN DEL GÉNERO *SALMONELLA* EN AISLADOS DE MANIPULADORES DE LA AGROINDUSTRIA DEL AGUACATE EN MICHOACAN.

El aguacate es un fruto ampliamente consumido a nivel mundial; el principal origen de este, es el estado de Michoacán, por lo que representa una fuente principal de ingreso económico estatal. Dicho fruto se explota y se recolecta por la agroindustria michoacana y se pone dentro de los mercados nacionales e internacionales, por lo que es necesario llevar un monitoreo efectivo para que dicho alimento logre estar libre de agentes patógenos. Por ésta razón es necesario implementar técnicas de identificación con la sensibilidad y especificidad que permitan la confirmación de éstos agentes. En el presente trabajo se muestran los resultados experimentales sobre la identificación y verificación de la incidencia del género *Salmonella* sp. en aislados provenientes de los manipuladores del corte del aguacate de distintas empresas localizadas en la región de Uruapan en el estado de Michoacán. Para esto se realizó un monitoreo en 14 empresas especializadas en la cosecha del aguacate, seleccionando cuatro trabajadores del corte del aguacate por cada empresa, tomándose las muestras de tres distintos sitios anatómicos de la mano, las muestras fueron transportadas y procesadas en la Cd. de Morelia. La identificación del enteropatógeno *Salmonella* se realizó utilizando medios de cultivo selectivos para la obtención de colonias aisladas y, posteriormente, se practicó para cada muestra positiva una técnica de biología molecular (**RT-PCR**), en la cual se realizó la detección del *gen hilA* específico de este enteropatógeno. Obteniendo la identificación positiva por esta técnica de biología molecular para cada una de las colonias aisladas e identificadas como miembros del género *Salmonella*, se logra poner de manifiesto la utilidad de este tipo de herramientas moleculares dentro del campo de la inocuidad alimentaria en un sector vital para esta región michoacana (agroindustria del aguacate), permitiendo al mismo tiempo la implementación de técnicas complementarias a la identificación clásica de patógenos en alimentos y aumentando la especificidad y sensibilidad de las herramientas actuales en microbiología.

2. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de biología molecular han sido uno de los avances con mayor impacto, tanto en investigación básica como en ciencias aplicadas, en los últimos años debido a su gran sensibilidad y especificidad, permitiendo un conocimiento cada vez más profundo de diversas especies patógenas, facilitando en gran medida su identificación.

Una de las técnicas más utilizadas en este campo es la **Reacción en Cadena de la Polimerasa**, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una cantidad mínima (una única copia de ese fragmento original). Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.¹⁹ La técnica como su nombre indica, se basa en la enzima ADNpolimerasa que sintetiza una cadena de ADN complementaria (ADNc) a otra que sirve de molde. Los únicos elementos que necesita son nucleótidos (dNTP's) y dos pequeñas cadenas de ADN complementarias al molde que se desea copiar y que lo flanquean, llamadas cebadores o *primers* en inglés, a partir de los cuales la polimerasa elonga la cadena.²⁰

La PCR se puede resumir en tres pasos esenciales:

Desnaturalización

Se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (**94-95°C**) de la muestra la forma más habitual.

Alineamiento/Unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a **50-65°C**, permitiendo así el alineamiento. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

Extensión/Elongación de la cadena

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-

hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C (comúnmente 72°C).¹⁰ Estos tres pasos se esquematizan en la figura 1.

Existen variantes de la PCR, que pueden utilizarse en distintos estudios; en este caso se utilizó un tipo llamado RT-PCR (**PCR en Transcriptasa reversa**), la cual sigue el mismo proceso de la PCR clásica, con la excepción de que en ésta el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, esto para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).²⁵

Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.¹⁹ Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños.¹⁰

Estos métodos moleculares han permitido acortar el tiempo necesario para obtener resultados mucho más fiables en la detección de agentes etiológicos y de sus genotipos de virulencia y resistencia. Hasta hace un tiempo, en muchos casos de infecciones por virus o bacterias, resultaba muy difícil hacer un diagnóstico definitivo basándose en la demostración directa de la presencia del patógeno, por cultivo o técnicas más convencionales. Es fundamental también para poder llevar a cabo una vigilancia epidemiológica efectiva, la detección e identificación rápida de los patógenos implicados en las enfermedades transmisibles. Debido a esto, es necesario estandarizar técnicas de detección para mejorar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que estos producen en el ámbito nacional, regional o mundial. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser identificadas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. La temprana detección de los microorganismos, previene la aparición de muchos brotes y permite establecer controles previos al desarrollo de enfermedad.²⁰

Las características de las técnicas de biología molecular (RT-PCR), nos ha impulsado a implementarlas en la detección de agentes patógenos dentro de la agroindustria del aguacate en el estado de Michoacán, ya que éste fruto tiene gran demanda y es muy consumido a nivel mundial, además de que representa un gran ingreso económico a nivel estatal y nacional.

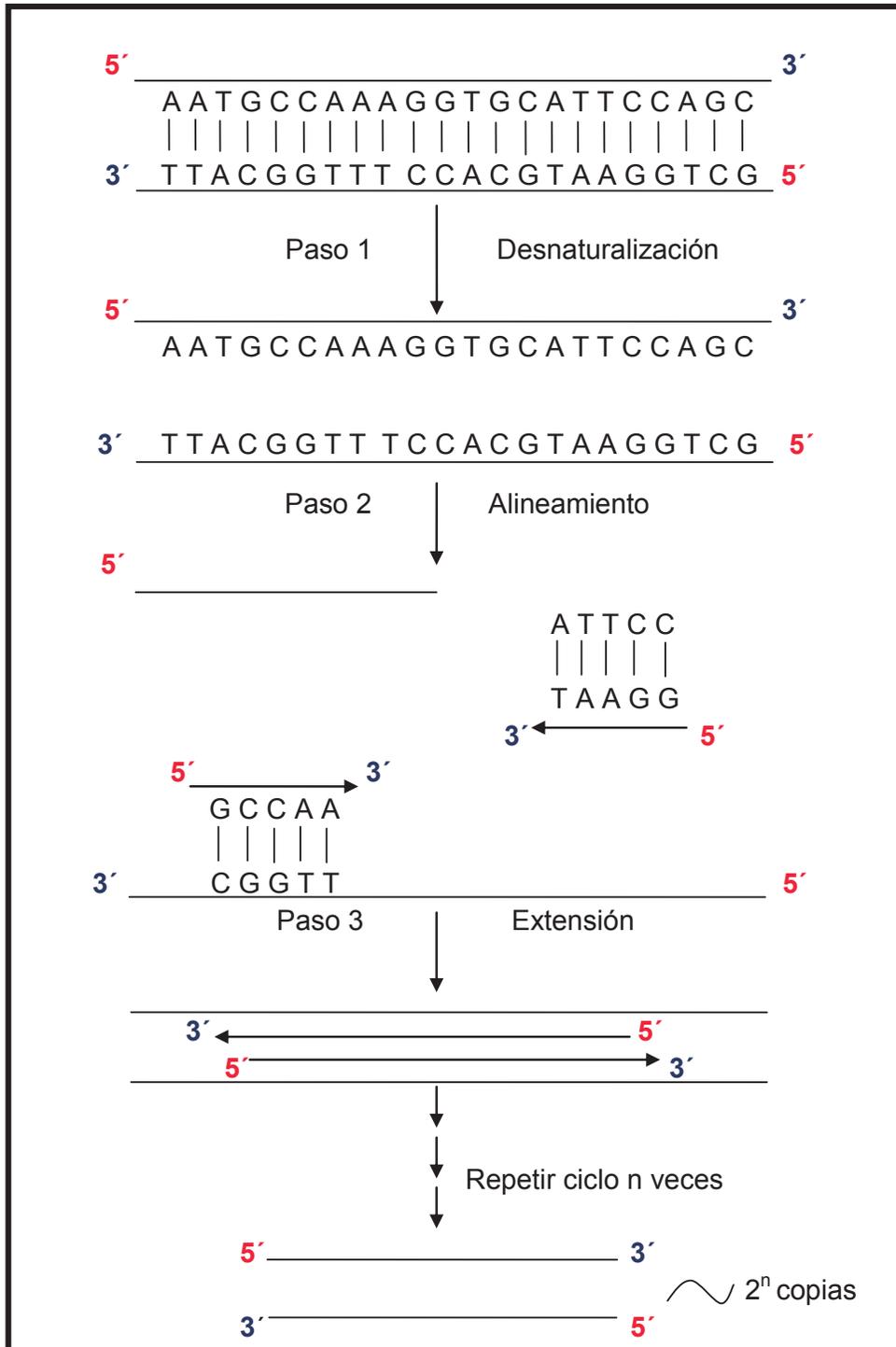


Figura 1. El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los tres pasos en el ciclo son: 1.- desnaturalización, 2.- apareamiento (alineamiento), y 3.- elongación (extensión).²⁰

3. ANTECEDENTES

3.1 Aguacate

Aguacate es el nombre común con que se conoce a la planta de la familia de las lauráceas; deriva del náhuatl *ahuácatl*, que significa testículo, probablemente por la forma colgante del fruto. La *Persea americana cultivar Hass*, nombre científico de la principal especie cultivada, es originaria de las zonas altas del centro y del este de México, así como de las partes altas de Guatemala.

Otro aspecto relevante es que no hay sólo un aguacate, sino diferentes variedades con formas, colores, texturas y sabores propios. De las tres especies primigenias (mexicana, guatemalteca y antillana) se derivan variedades adaptadas a cada condición de cultivo, dando frutos con sabores, texturas, colores y olores variados. Hay quienes prefieren el sabor más fuerte de la variedad criolla, el aguacate pequeño de cáscara negra, o la abundante pulpa de sabor más suave del Hass, o la facilidad de pelar de la variedad fuerte.

El aguacate es uno de los muchos regalos que México ha dado al mundo. Su sabor, textura y propiedades alimenticias han cautivado a innumerables países que con gusto lo han adoptado, como Francia y otros tan lejanos como Japón. Y es que el mexicanísimo aguacate lleva conquistando paladares de todo el mundo desde hace 500 años.²¹

3.2 Municipios Productores de Aguacate

La franja Aguacatera del estado de Michoacán es una región volcánica reciente que ocupa 7,752 kilómetros cuadrados y representa el 12.9% de la superficie estatal. El clima relevante es templado, húmedo y sub-húmedo, con temperatura media de 8 a 21 grados centígrados y una precipitación anual de 1200 a 1600 mm. También tiene una zona de transición (sub tropical) entre trópico-seco y zona templada (APROAM, 2005).

Actualmente existen 20 municipios productores de aguacate en Michoacán (Fig. 2) y suman 85,709.32 ha. Las localidades de Nuevo Zirosto y San Andrés Coru en ocasiones son consideradas como municipios aunque en realidad pertenecen a los Municipios de Uruapan y Ziracuaretiro, respectivamente (Tabla 1).¹⁷

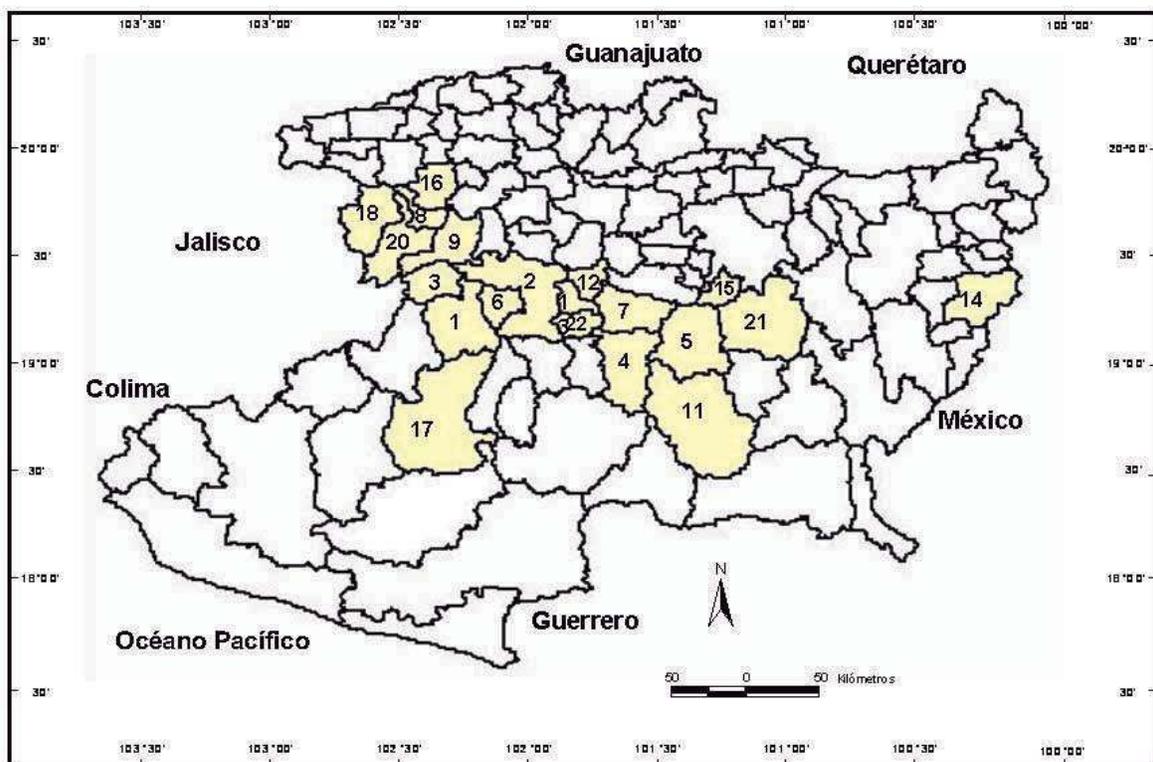


Figura 2. Localización de los 20 municipios productores de aguacate del estado de Michoacán.¹⁸

Número en Fig. 2	Municipio	Superficie (ha)	% del Total
1	Tancítaro	15,177.00	17.7
2	Uruapan	14,878.00	17.4
3	Peribán de Ramos	12,839.00	15.0
4	Ario de Rosales	8,000.00	9.3
5	Tacámbaro	7,401.50	8.6
6	Nuevo Parangaricutiro	5,688.00	6.6
7	Salvador Escalante	5,291.00	6.2
8	Tingüindín	3,684.00	4.3
9	Los Reyes	2,849.00	3.3
10	Nuevo Zirosto (Uruapan)	1,720.00	2.0
11	Turicato	1,455.00	1.7
12	Tingambato	1,415.00	1.7
13	Ziracuaretiro	1,120.00	1.3
14	Zitácuaro	995.00	1.2
15	Acuitzio	690.00	0.8
16	Tangamandapio	575.00	0.7
17	Apatzingán	448.82	0.5
18	Cotija	410.00	0.5
19	San Andrés Corú (Ziracuaretiro)	318.00	0.4
20	Tocumbo	285.00	0.3
21	Villa Madero	262.00	0.3
22	Taretan de Michoacán	208.00	0.2
	Total	85,709.32	100

Tabla 1. Distribución municipal de la superficie con aguacate en Michoacán.¹⁸

3.3 Protocolo para la Producción de Aguacate

Los Municipios autorizados para exportar aguacate a los Estados Unidos y otros países tienen que seguir un programa de trabajo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-066-FITO-2002. Esta norma fue actualizada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de mayo 2002 y establece las especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate. La norma mencionada aplica tanto para el mercado nacional como para exportación e incluye la definición de zonas libres de plagas cuarentenarias tales como el barrenador pequeño del hueso (*Conotrachelus aguacatae* y *C. persea*), barrenador grande del hueso (*Heilipus laurii*), barrenador de ramas (*Copíurus aguacatae*) y la palomilla barrenadora del hueso (*Stenoma catenifer*). De acuerdo a la actualización de la NOM-066-FITO-2002 los municipios de Michoacán declarados libres de barrenadores del hueso eran: Uruapan, Peribán de Ramos, Tancítaro, Salvador Escalante, Nuevo Parangaricutiro, Ario de Rosales y Taretan de Michoacán. En Enero 2004 se incorporaron los municipios de Los Reyes y Apatzingán y en Agosto del mismo año se incluyó a Tacámbaro. De la misma manera, en Enero 2005 se declararon libres de barrenadores a los municipios de Acuitzio y Tingüindín. En Michoacán no se ha encontrado el barrenador grande del hueso (*Heilipus laurii*), ni la palomilla barrenadora del hueso (*Stenoma catenifer*).

3.4 Comité Estatal de Sanidad Vegetal

El Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Michoacán (CESV) es un organismo auxiliar de coordinación estatal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el desarrollo de campañas fitosanitarias, programas y/o acciones de sanidad vegetal. Otros organismos auxiliares son las Juntas Locales de Sanidad Vegetal (JLSV), que en Michoacán son 16, son coordinadas por el CESV y son organizaciones de productores de aguacate que fungen como auxiliares de la SAGARPA en el desarrollo de actividades fitosanitarias. Las JLSV agrupan al total de productores de aguacate de cada municipio. El personal técnico de los organismos auxiliares, junto con los productores de aguacate, verifican el cumplimiento de las norma fitosanitaria haciendo muestreos y emitiendo recomendaciones con relación a la presencia de plagas de interés cuarentenario (*Conotrachelus aguacatae*, *C. persea* y *Capturas aguacatae*). También, verifican el uso de insecticidas autorizados en el programa de trabajo y la limpieza de los huertos en general.¹⁷

El seguimiento de los protocolos de producción y manejo de los huertos de aguacate ha dado resultados satisfactorios. Desde 1997, las JLSV y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) realizan muestreos de frutos en los huertos, empacadoras y en la frontera con los

EE.UU. para detectar la presencia de plagas cuarentenarias (barrenadores de hueso). Desde entonces y hasta la temporada 2003-04 se han muestreado más de 15 millones de frutos con resultados negativos (Tabla 2). Adicionalmente, los productores de aguacate tienen que seguir la norma mexicana NMX-FF-016-SCFI-2006, la cual establece: **a)** Requisitos mínimos generales: los frutos deben haber alcanzado al menos 21.5% de materia seca en la pulpa, ser cortados con gancho con red, pedúnculo cortado al ras y evitar contacto con el suelo; Que se transporten del huerto a la empacadora en cajas limpias y en camiones cubiertos con lona; **b)** Calidad del fruto (Suprema, Calidad I y Calidad II), de acuerdo a la tolerancia en la presencia de daños visibles en la epidermis causados por roña, viruela o clavo, trips, granizo, rozaduras, quemadura de sol, heladas y daño mecánico o causado por larvas; **c)** Calibre del fruto: Súper extra (> 266 g), Extra (211-265 g), Primera (171-210 g), Mediano (136-170 g), Comercial (85-135 g) y Canica (< 85 g), y **d)** Etiquetado y envase.

Para asegurar la calidad del fruto en poscosecha y proporcionar un fruto de máxima calidad al consumidor, en Michoacán se ha tomado el acuerdo de realizar la cosecha cuando el fruto haya alcanzado un mínimo de 23% de materia seca.

Desde sus primeras incursiones al mercado de los EE.UU., México implemento un sistema de verificación y certificación de calidad para todo el aguacate que se exporte. Los normas internacionales de calidad que se siguen son el Codex Alimentarius y las propuestas de calidad de la Organización de Cooperación para el Desarrollo Económico (OCDE), así como en las normas mexicanas NOM-128-SCFI-1998 y la NMX-FF-016-SCFI-2002.¹⁷

Frutos muestreados

En huertos

Temporada	Por JLSV	Por USDA	Sumas	En empacadora JLSV + USDA	En frontera (USDA)	Total	Resultados
1997 / 1998	1,026,000	129,305	1,155,305	416,700	10,440	1,582,445	Negativos
1998 / 1999	898,221	223,250	1,121,471	210,375	16,860	1,348,706	Negativos
1999 / 2000	982,859	384,575	1,367,434	162,375	20,070	1,549,879	Negativos
2000 / 2001	651,514	558,300	1,209,814	171,000	17,280	1,398,094	Negativos
2001 / 2002	937,847	678,609	1,616,456	347,475	41,250	2,005,181	Negativos
2002 / 2003	1,795,612	954,264	2,749,876	545,591	50,490	3,345,957	Negativos
2003 / 2004	1,785,044	1,275,738	3,060,782	816,402	71,310	3,948,494	Negativos
Sumas	8,077,097	4,204,041	12,281,138	2,669,918	227,700	15,178,756	Negativos

Tabla 2. Muestreos de fruto de aguacate 'Hass' realizados por las Juntas Locales de Sanidad Vegetal (JLSV) de Michoacán y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para detectar barrenadores del hueso.¹⁷

3.5 Organización para Exportar Aguacate (APEAM).

El 4 de Julio de 1997 se constituyó la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, A.C. (APEAM) y es la asociación cúpula de la industria del aguacate de Michoacán. La Mesa Directiva de la APEAM está compuesta por siete miembros productores y siete miembros empacadores que representan a 1500 productores y 18 empacadoras certificadas por la SAGARPA y el USDA. Los objetivos de la APEAM son: **i)** Posicionar el aguacate 'Hass' mexicano en los mercados internacionales, **ii)** Fomentar la imagen corporativa de la APEAM, **iii)** Ofrecer un producto con calidad suprema en los mercados internacionales, **iv)** Competitividad en los mercados internacionales, y **v)** Realizar campañas de promoción.

3.6 Exportación de Aguacate por la APEAM

Exportación a los Estados Unidos de América

La APEAM está integrada por 1,385 productores (35% más que en la temporada 2003-04), 18 empacadoras de exportación de aguacate (4 más que el año pasado), 21,598 hectáreas de producción (31% más que la temporada pasada), 2,027 huertos (38% más que el año pasado), Nueve municipios (dos más que la temporada pasada: Apatzingán y Los Reyes), Siete Juntas Locales de Sanidad Vegetal y el Comité Estatal de Sanidad Vegetal, SAGARPA-SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria)-DGSV (Dirección General de Sanidad Vegetal) y el USDA (Tabla 3).

La exportación de aguacate 'Hass' a los EE.UU. ha pasado de 6,031 toneladas en la temporada 1997-98 a 42,607 toneladas en la temporada 2003-04 (tabla 3). El valor de las exportaciones fue 93.7 millones de dólares. El precio pagado al productor durante toda la temporada fue de USD \$1.10 por kilogramo.

En la temporada 2003-04 se exportó a los EE.UU. aguacate 'Hass' procedente de siete municipios. Tancítaro destacó por la superficie incluida (8,478 ha); también sobresalió Ario de Rosales por incrementar 110% su participación hacia la exportación (Tabla 4).¹⁷

Exportación a otros países

En adición a la exportación a los EE.UU., en la temporada 2003-04 la APEAM atendió la exportación de más de 60 mil toneladas de aguacate a Japón, diversos países de América y a la Unión Europea.

MERCADO JAPONÉS. Este mercado se convirtió en el segundo más importante para México. La demanda ha tenido un crecimiento explosivo ya que en 10 años se incrementó de 2,270 ton a casi 25 mil toneladas en la temporada 2003-04. El aguacate mexicano es líder en calidad y el número de exportadores es limitado. Japón es casi el único mercado ya que Hong Kong importa moderadamente.

MERCADO DE LA UNIÓN EUROPEA. Este mercado es importante para México. Sin embargo los volúmenes exportados desde 1991 (8,946 ton) han presentado importantes altibajos. En la temporada 2003-04 sólo se exportaron 16,420 ton. El precio por caja de 4 kg fluctuó de 4 a 11 Euros. El aguacate mexicano tiene que competir con el procedente de Israel, España, Kenya, Argentina, Perú, Chile y Sudáfrica.

MERCADO DE CANADÁ. Canadá es el cuarto importador de aguacate mexicano y en la temporada 2003-04 se exportaron más de 12 mil toneladas de aguacate 'Hass' a este país. Para incrementar las exportaciones a Canadá se requiere un plan de trabajo riguroso, apoyado por la APEAM y el gobierno federal. El enfoque principal sería el de ofrecerle a los importadores y distribuidores incentivos a cambio del consumo del aguacate mexicano. Dichos incentivos podrían ser campañas publicitarias, calidad controlada del fruto, representación de la industria en Canadá para apoyar cualquier esfuerzo enfocado al éxito, y respuesta inmediata en caso necesario.

Actualmente se exporta el 13.2% de la producción total, convirtiendo a México en el primer exportador de aguacate 'Hass' en el mundo.¹⁷

Temporada							
Concepto	97-98	98-99	99-00	00-01	01-02	02-03	03-04
Productores	60	201	388	578	715	1,033	1,385
Huertos	61	252	497	794	995	1,466	2,027
Hectáreas	1,499.00	4,285.90	6,757.96	9,861.64	11,897.01	16,430.68	21,597.25
Empacadoras	5	14	12	10	10	14	18
Toneladas	6,031.70	9,768.50	11,729.40	10,221.10	24,477.70	29,912.50	42,607.20
Embarques	348	562	669	576	1,375	1,683	2,377

Tabla 3. Evolución de la exportación de aguacate ‘Hass’ de México a los EE.UU.¹⁷

Municipio	Superficie (ha)	Huertos	Productores	Incremento (%)
Tancítaro	8,478.19	809	532	19
Uruapan	3,995.17	403	301	33
Salvador Escalante	2,073.77	197	103	43
Nuevo Parangaricutiro	2,258.73	282	196	28
Peribán de Ramos	1,511.87	127	107	13
Ario de Rosales	2,592.02	203	144	110
Taretan	687.50	6	2	2
Total	21,597.25	2,027	1,385	35.4

Tabla 4. Municipios de Michoacán que exportaron aguacate 'Hass' a los EE.UU. en la temporada 2003-04.¹⁷

4. IMPORTANCIA DE LA INOCUIDAD ALIMENTARIA

Diariamente, miles de personas en el mundo consumen alimentos de diferente clase, por lo que la inocuidad de estos es de gran importancia. Deben estar libres de agentes causantes de las denominadas Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs). Tales agentes pueden ser físicos (compuestos radiactivos), químicos (metales pesados y organofosforados) y biológicos. En el caso de los agentes biológicos, las bacterias son muy importantes, por la gran diversidad de ellas que se puede encontrar en materias primas y productos terminados y por la variedad de enfermedades que las bacterias patógenas pueden producir y que en algunos casos dejan secuelas.²³

El concepto más aceptado sobre bioseguridad alimentaria es el propuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) quien lo define como: "Situación en la que toda la población, en todo el momento, goza de acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen las necesidades alimenticias adecuadas para llevar a cabo una vida activa y sana".

Para asegurar que la calidad e inocuidad de los suministros alimentarios no se vean comprometidas, los gobiernos, la industria alimentaria y los consumidores tienen que desempeñar sus respectivas funciones eficazmente y de forma concertada, reduciendo además al mínimo las pérdidas dentro del sistema alimentario. Esta seguridad de alimentos se podrá garantizar mediante la responsabilidad compartida y coordinada entre el incremento de la producción agrícola, el mejoramiento de la distribución y manejo de los recursos, además de la provisión de los servicios básicos de urbanización, salud y educación, considerando como prioridad resolver las necesidades de los pequeños productores rurales, que les permita elevar a corto, mediano y largo plazo la productividad de sus cultivos y al mismo tiempo, involucrarlos en programas permanentes de uso, manejo y conservación de los recursos naturales renovables y no renovables.

Los problemas de seguridad alimentaria en México tienen que ver más bien con la carencia de derechos de acceso a una cantidad suficiente de alimentos inocuos y nutritivos. Se estima que el 5% de la población nacional presenta desnutrición variada. De acuerdo a los datos reportados por el Consejo Nacional de Población (CONAPO). El porcentaje de ruralidad en México es del 26%; de estas familias, el 49% de hogares están bajo la línea de pobreza y un 24% de indigencia, las cuales están clasificadas como de muy alta marginación, siendo en estas comunidades donde primordialmente se presentan casos de inseguridad alimentaria.²²

Dentro de la solución a los problemas de seguridad alimentaria, las regiones marginadas presentan ciertas características que complican más cualquier tipo de acción encaminada a resolver ésta. Tales características son: dificultad para hacer llegar los servicios y las acciones institucionales, debido a su localización geográfica, al estado de sus caminos y servicios y, principalmente, al desconocimiento de sus pobladores sobre tales servicios y acciones; también las comunidades requieren acompañamiento para la organización de su demanda y el desarrollo de sus capacidades para el mejoramiento integral; finalmente, la oferta de apoyos asistenciales y de servicios es poca y, muy frecuentemente, de baja calidad.²²

Por tradición y ubicación estratégica, en México se ha impulsado fuertemente el desarrollo y tecnificación del sector alimentario, marcado por situaciones como la llegada de corporativos internacionales, así como el surgimiento y consolidación de grandes grupos industriales (Maseca, Bimbo, entre otros); lo anterior acompañado de estrategias del gobierno mexicano, que buscan impulsar el desarrollo e innovación tecnológica de las micro, pequeñas y medianas empresas en este sector. Estas últimas actualmente representan alrededor del 98% de los establecimientos productivos, por lo que es imperativo aprovechar las ventajas competitivas y comparativas identificadas.

México también cuenta con una amplia diversidad de climas y condiciones favorables para la producción primaria, por lo que juega un papel fundamental como productor/proveedor de una gran cantidad y variedad de frutas y hortalizas a nivel internacional que se consumen principalmente en fresco.

Por lo anterior el comercio de productos a los mercados externos representa una gran oportunidad para el sector alimentario mexicano y también un gran reto, ya que se requiere de la integración de nuevos y mejores procesos productivos a la planta productiva nacional. Cabe resaltar que, el principal destino de los alimentos de exportación producidos en México, aproximadamente el 86%, se comercializa con los Estados Unidos de América y el restante, en orden de importancia, se distribuye en Europa y Asia.

En la última década y a raíz del surgimiento de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina y la fiebre aviar, ambas transmitidas por alimentos; se ha identificado un incremento importante en el surgimiento de normativas y regulaciones en materia de calidad e inocuidad de productos alimenticios, dichas iniciativas han surgido como una necesidad de los países principalmente desarrollados, para asegurar la calidad de los alimentos locales e importados, teniendo como principal fin proteger la salud de su población.²⁴

Es posible realizar diversas clasificaciones en materia de normativas de calidad e inocuidad en alimentos, con base en: Región o país de surgimiento, Alcance o temas abarcados, Partes interesadas, reconocimiento o “prestigio”, Privadas, Públicas, Nacionales, Internacionales, Obligatorias, Voluntarias, etc.²⁴

5. NORMATIVIDAD NACIONAL

El Gobierno Mexicano, al comprender la necesidad de prevenir la contaminación de los alimentos, crea dentro del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, que desarrolla y ejecuta durante varios años esquemas de aplicación voluntaria sobre temas de inocuidad, dada la falta de un marco legal y normativo en el país. Gracias a este esfuerzo, en julio de 2007, modificaciones en las leyes Federales de Sanidad Vegetal, Salud Animal, así como Pesca, se confirieron a la Secretaría de Agricultura, atribuciones legales sobre Sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de vegetales, anteriormente definidos como Buenas Prácticas Agrícolas.

El objetivo es brindar a los productores un marco general de requisitos para reducir los riesgos de contaminación a lo largo de todas las etapas de producción primaria, con el fin de fortalecer el sistema de abastecimiento alimentario bajo formas de producción más seguras. En México como en otras regiones de Latinoamérica, se han incrementado considerablemente el número de certificaciones independientes y privadas en temas de calidad e inocuidad alimentaria. La gran oferta de Sistemas de Certificación puede llegar a confundir al Productor/Empacador sobre la elección del sistema que más le conviene. En ese sentido, es importante que los interesados se informen e identifiquen el Sistema que cumple con las especificaciones de su cliente y preferentemente cuente con reconocimiento y prestigio internacional. La firma Consultores en Inocuidad, S.C. (CIALIM) se concibe como una propuesta de generación de valor al sector productivo, poniendo a disposición la experiencia de actores que han jugado un papel fundamental en el desarrollo de iniciativas nacionales e internacionales en materia de Calidad e Inocuidad del sector agroalimentario.

A través de los años, hemos identificado los principales requisitos de acceso a mercados internacionales, así como aquellas regulaciones solicitadas por nuestros principales socios comerciales; es por ello que se vuelve prioritaria la incorporación de mejores prácticas en los sistemas productivos y que éstas, se encuentren alineadas a las actuales condiciones de mercado.²⁴

6. MANIPULADORES DE ALIMENTOS

La higiene de los alimentos es una responsabilidad de todas aquellas personas que están relacionadas directa o indirectamente con los alimentos. Un manipulador de alimentos es aquel que produce, transporta, cosecha, comercializa, cocina y sirve los alimentos. Su desempeño está relacionado directamente con la buena calidad de los alimentos, y si desconoce la forma correcta de *manipularlos higiénicamente*, las personas que van a consumir los alimentos que preparó corren el **riesgo de enfermarse**. Existen dos clases de manipuladores de alimentos, los de alto riesgo y bajo riesgo:

Los manipuladores de alto riesgo son aquellos que mantienen contacto directo con los alimentos que no sufren un tratamiento posterior antes de llegar al consumidor. También son aquellas personas que intervienen en la elaboración de alimentos.

Los de bajo riesgo mantienen contacto con el alimento que sufrirá un proceso de elaboración posterior antes de llegar al consumidor.

Ser manipulador de alto riesgo no supone un riesgo de enfermar, sino que supone ser más responsable. *La salud de los consumidores se encuentra en las manos de los manipuladores.*

Una enfermedad alimentaria se transmite cuando se consume un alimento contaminado, el cual se genera debido a una **mala manipulación** (Fig. 3).

Los gérmenes llegan a los alimentos de diversas formas, pues estos se encuentran en todas partes. Algunos de estos gérmenes son perjudiciales para el hombre puesto que causan enfermedades. A éstos se les llama *Gérmenes Patógenos*.

Las bacterias también se encuentran en personas y animales. En las personas los gérmenes o bacterias se pueden encontrar en las manos, boca, nariz, aparato digestivo, y en las heces, etc. La persona que tiene bacterias patógenas se llama *portador* y puede ser un portador sano o enfermo.

El portador sano no presenta síntomas de enfermedad y no sabe que es portador. Por ello todo manipulador debe poner en práctica rigurosas medidas de higiene en todo momento para no contaminar los alimentos. Los alimentos generalmente se contaminan por dos vías:

La directa. Del portador (sano o enfermo) al alimento.

La indirecta. Del portador (sano o enfermo) a un intermediario, insectos, utensilios de cocina y de éste último al alimento.⁴

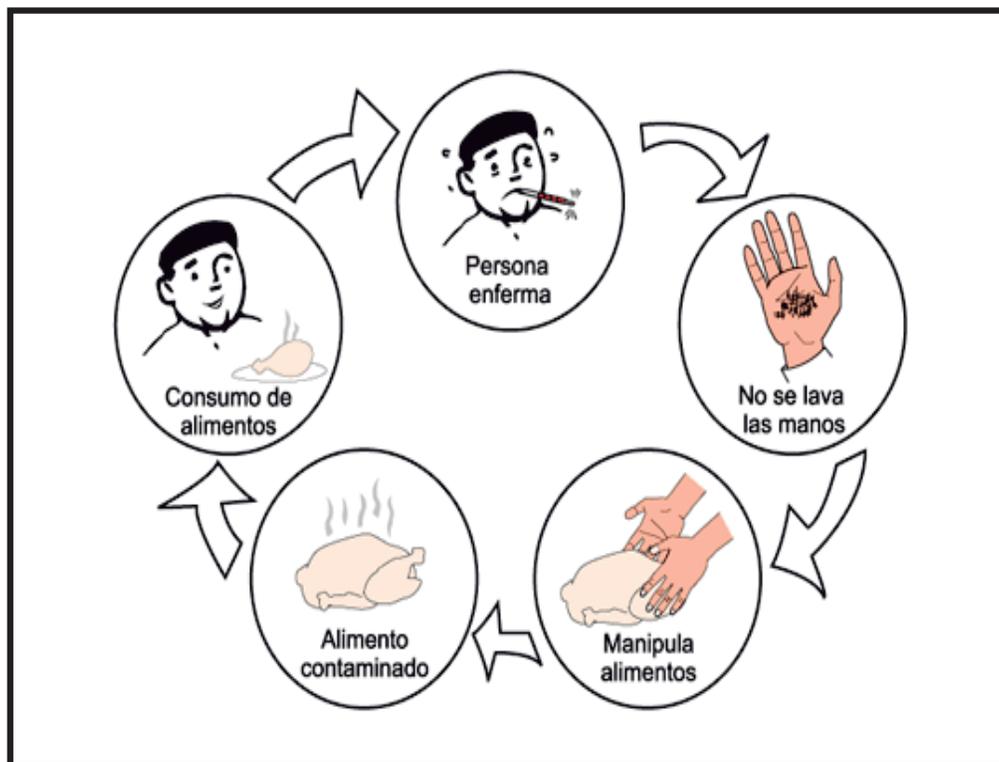


Figura 3. Proceso por el cual los alimentos pueden ser contaminados por los manipuladores y provocar diversas enfermedades.⁴

La Secretaría de Salud reconoce que el personal manipulador de alimentos, aquel que por su actividad laboral participa en la obtención y elaboración de los mismos, es el pilar fundamental de las buenas prácticas de higiene y sanidad, y es el recurso más valioso para la obtención de alimentos seguros e inocuos.

La Norma Oficial Mexicana **NOM-120-SSA1-1994**, BIENES Y SERVICIOS. PRÁCTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD PARA EL PROCESO DE ALIMENTOS, BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS Y ALCOHÓLICAS, incluye requisitos necesarios para ser aplicados en los establecimientos dedicados a la obtención, elaboración, fabricación, mezclado, acondicionamiento, envasado, conservación, almacenamiento, distribución, manipulación y transporte de alimentos y bebidas, así como de sus materias primas y aditivos, a fin de reducir los riesgos para la salud de la población consumidora.¹⁵

La Ley define como manipulador de alimentos 'toda aquella persona que por su actividad laboral tiene contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio (Fig. 4). Formación específica e higiene son dos de los pilares fundamentales en la manipulación de alimentos

Algunos de los requisitos para este tipo de profesionales hacen referencia a la formación en higiene alimentaria. En este contexto, las empresas del sector alimentario deben garantizar, mediante programas de formación continuada adecuados a su actividad, que los manipuladores de alimentos dispongan de los conocimientos necesarios para desarrollar unas correctas prácticas de manipulación. Estos programas de formación los debe impartir una entidad autorizada por la autoridad sanitaria competente que puede ser, en su caso, la propia empresa.

Además, se deben cumplir las normas de higiene en cuanto a actitudes, hábitos y comportamiento. Así, las manos son el vehículo principal de transmisión, por lo que se han de lavar tan a menudo como sea necesario y en un lugar especialmente preparado para este fin. Se deben lavar entre la manipulación de diferentes tipos de alimentos o alimentos crudos y cocinados, después de manipular desperdicios o basuras, después de tocar utensilios sucios o ajenos a la actividad desarrollada, después de un periodo de descanso y muy especialmente después de comer o fumar y por supuesto tras usar el WC o sonarse la nariz y siempre antes de incorporarse al puesto de trabajo.¹⁴

Estas normas de higiene incluyen no fumar, comer ni masticar chicle mientras se manipulan alimentos, y tampoco estornudar o toser sobre ellos: la saliva es un excelente vehículo de transmisión de microorganismos. Tampoco deben llevarse anillos o pulseras durante el desarrollo de la actividad, ya que se

evitará que puedan entrar en contacto directo con los alimentos y contaminarlos.

Una herida o corte que pueda ponerse en contacto directa o indirectamente con los alimentos es un peligroso foco de contaminación por lo que siempre ha de ser desinfectado y protegido con un vendaje impermeable apropiado. Por último, debe evitarse la presencia no justificada de personas ajenas a la actividad de la empresa en los locales donde ésta se desarrolle y en cualquier caso estas personas deberán en todo momento respetar las normas relativas a la higiene.

Si se sufre cualquier enfermedad susceptible de contaminar o ser transmitida a través de los alimentos (heridas infectadas, infecciones de la piel, diarrea o trastornos gastrointestinales, entre otros), debe informarse a los responsables para valorar el riesgo y establecer las pautas que se seguirán.

Es importante mantener un grado elevado de aseo personal, llevar una vestimenta limpia y de uso exclusivo y utilizar cubrecabezas y calzado adecuado. En este sentido, debe ponerse especial cuidado con la higiene de manos, uñas, nariz, boca, pelo y piel ya que estas zonas transmiten fácilmente microorganismos. La indumentaria, que será preferiblemente de color claro, debe estar permanentemente limpia y cambiarse tantas veces como sea necesario, incluso a lo largo de una misma jornada de trabajo. Será además de uso exclusivo para esta actividad y es recomendable que no disponga de bolsillos.

El calzado, además de ser el adecuado y de fácil limpieza y desinfección, deberá tener suela antideslizante para evitar posibles resbalones y accidentes. En algunos casos y debido al alto riesgo sanitario generado por la actividad, será necesario el uso de mascarillas y/o guantes higiénicos. Conocer y cumplir las instrucciones de trabajo establecidas por la empresa es clave para garantizar la seguridad y salubridad de los alimentos. Las empresas del sector pueden establecer además otras normas de trabajo siempre y cuando tengan como objetivo asegurar la calidad de sus productos.¹⁴

Dentro de la industria agroalimentaria se encuentra una gran cantidad de microorganismos que son considerados agentes patógenos capaces de transmitir enfermedades por medio de los alimentos, dentro de éstos patógenos destaca la familia *Enterobacteriaceae* (como el género *Salmonella*), la cual es muy conocida y tratada dentro del área de diagnóstico e identificación, ya que es causante de diversas patologías en la salud pública.

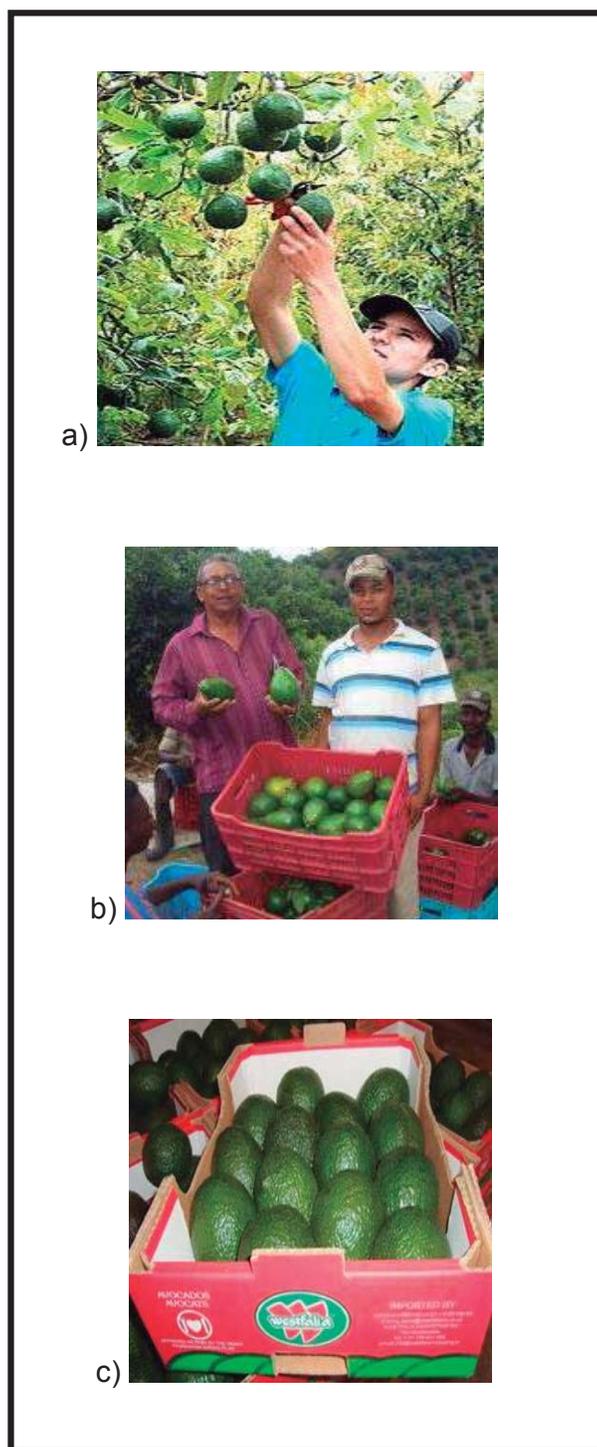


Figura 4. Pasos para la obtención del aguacate para su comercialización a partir de la cosecha: a) corte, b) recolección, c) presentación final.

7. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

Los bacilos Gram negativos pertenecientes a *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos recuperados con mayor frecuencia en muestras clínicas. Distribuidos en la naturaleza de forma amplia, éstos microorganismos se encuentran en el suelo y en el agua, sobre las plantas y como lo indica su nombre dentro del tracto intestinal de humanos y animales.⁹

Es una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos. Sucumben con relativa facilidad a desinfectantes comunes, incluido el cloro. Con frecuencia se encuentran especies de *Enterobacteriaceae* en la bio-industria: para la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes, tratamientos médicos, producción de toxinas en el uso de cosméticos, fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica, etc.

7.1 Características

En la definición clásica de una *Enterobacteriaceae* se usan siete criterios básicos, adicional a la aparición de nuevos métodos taxonómicos para incluir a ciertos géneros que no cumplen con todos los siguientes criterios, pero que forman parte de esta familia:

- 1.- Son bacterias Gram negativas, la mayoría bacilos, otros cocobacilos y otros pleomórficos.
- 2.- No son exigentes, son de fácil cultivo.
- 3.- Son oxidasa negativo (excepto *Plesiomonas*, que es oxidasa positivo), es decir, carecen de la enzima citocromo oxidasa.
- 4.- Son capaces de reducir nitrato en nitrito.
- 5.- Son anaeróbicos facultativos.
- 6.- Son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas (en especial glucosa y lactosa), y oxidadores de una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas.
- 7.- Muchos géneros tienen un flagelo que sirve para desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles.⁷

Adicional a ello, las *Enterobacteriaceae* no forman esporas, algunas producen toxinas y pueden ser encapsuladas y son organismos catalasa positivos. Son quimioheterótrofos, y necesitan para su crecimiento compuestos simples de

carbono y nitrógeno, generalmente sólo con D-glucosa, aunque algunas requieren aminoácidos y vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es de entre 22°C y 37°C.

Las diferencias entre los nombres de los diversos géneros provienen de criterios más precisos, como la fermentación de los diferentes azúcares, la producción o no de azufre, la presencia de enzimas metabólicas (β -galactosidasa, desaminasas, descarboxilasas), etc. Los serotipos de importancia médica y sanitaria pueden distinguirse entre sí por la presencia o ausencia de antígenos en su constitución celular, tales como en el lipopolisacárido (antígeno O), el antígeno flagelar (antígeno H) o el antígeno capsular (antígeno K).⁷

7.2 Identificación presuntiva

1.- En muestras que no sean heces, una tinción de Gram puede revelar células basillares y cocobacilares gramnegativas cortas y gordas (0.5-2 μ m ancho y 2-4 μ m largo), pero esto no logra una diferenciación de especies.

2.- Características morfológicas de la colonia en un medio sólido, eje: mucoides o secas, relativamente grandes, gris opaco en agar sangre, para *K. pneumoniae*; hemólisis en agar sangre para *Proteus*; colonias rojas en agar MacConkey o brillo verde metálico sobre agar eosina azul de metileno (EMB).

3.- La diferenciación de *Enterobacteriaceae* se basa principalmente en la presencia o ausencia de enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano, las cuales dirigen el metabolismo de las bacterias a lo largo de uno o más caminos que pueden ser detectados por medios especiales usados en las técnicas de cultivo in vitro.

7.3 Características de relevamiento

La identificación definitiva de los miembros de *Enterobacteriaceae* requiere de una batería de pruebas bioquímicas, con las cuales además puede evitarse tiempo considerable y una probable identificación errónea. Con pocas excepciones, todos los miembros de ésta familia demuestran las siguientes características:

- 1.- Fermentadores de glucosa.
- 2.- Citocromo oxidasa negativa.
- 3.- Reducción de nitrato a nitrito.⁹

7.4 Implicaciones en salud pública

La presencia de *Enterobacteriaceae* dentro del organismo es anormal y determina la aparición de infecciones, cuya gravedad depende del punto de entrada. Introducidas por los alimentos, provocan problemas intestinales al adherirse y atravesar la barrera de la mucosa gastrointestinal, manifestada por diarreas y deshidratación. Ciertas especies provocan patologías específicas:

La especie *Salmonella typhi* es responsable de la fiebre tifoidea.

La especie *Shigella dysenteriae* es el agente responsable de la disentería bacilar.

La especie *Escherichia coli enterotóxica* es responsable de la gastroenteritis infantil.

La especie *Yersinia pestis* es responsable de la peste.

La especie *Serratia marcescens* usualmente causa infecciones nosocomiales como resultado de tratamiento en un hospital.

Las *Enterobacteriaceae* incluyen a organismos que resultan patógenos para el ser humano como la *Escherichia coli* o la *Salmonella*, especialmente importantes en la mortalidad infantil en países en desarrollo y patógenos para las plantas como *Erwinia*, en la mayor parte de los casos causando infecciones oportunistas. Todos los bacilos de *Enterobacteriaceae* son resistentes a antimicrobianos comunes, tales como la penicilina, la metilina y la clindamicina, entre otros.¹²

La clasificación de ésta familia se realiza en “tribus”, término propuesto por Ewing en 1972, lo cual posee ciertas ventajas para la enseñanza y aprendizaje. El concepto de tribu proporciona, tanto a estudiantes como a practicantes, un método conveniente para agrupar, dentro de una familia, los géneros principales que comparten reacciones bioquímicas parecidas y que poseen importancia diagnóstica similar (Tabla 5).⁹

TRIBUS
Tribu I: <i>Escherichiae</i>
Tribu II: <i>Edwardsiellae</i>
Tribu III: <i>Salmonelleae</i>
Tribu IV: <i>Citrobactereae</i>
Tribu V: <i>Klebsielleae</i>
Tribu VI: <i>Proteeae</i>
Tribu VII: <i>Yersinieae</i>

Tabla 5. Clasificación en tribus de la familia *Enterobacteriaceae*.⁹

8. TRIBU *SALMONELLEAE*

Consta de un solo género, *Salmonella*, denominado así en honor al microbiólogo D.E. Salmon. Las salmonelas tienen antígenos somáticos (O), que son lipopolisacáridos, y flagelares (H) que son proteínas. *S. typhi* también tiene un antígeno capsular o virulento (Vi). Desde el punto de vista bioquímico, en general son a la vez lactosa y sacarosa negativas.

8.1 Clasificación

Las salmonelas son un grupo complejo de *Enterobacteriaceae*, con más de 2200 serotipos descritos en el esquema de Kauffman-white, en el cual, las salmonelas se agrupan (A, B, C y siguientes) sobre la base del antígeno somático O y se subdividen en serotipos (1,2 y siguientes) por su antígeno flagelar H (es decir A1, A2, B1, B2).

Antes de 1983 se utilizaban tres especies de *Salmonella* para informar resultados positivos: *S. choleraesius*, *S. typhi* y *S. enteritidis* (más de 2200 serotipos). Actualmente se consideran todas las primeras especies de *Salmonella* y *Arizona* como la misma especie, pero pueden ser separadas en tres subgrupos distintos (Tabla 7).

A partir de 1983, los CDC (Centers for Disease Control) cambiaron el método para informar los resultados de los serotipos, de modo que todos los microorganismos identificados como *Salmonella* se informan por género y serotipo, omitiendo la referencia a especies.

En la práctica diaria, los aislamientos desconocidos de muestras clínicas que son bioquímicamente sugestivos de especies de *Salmonella* se confirman usando antisueros policlonales que contienen anticuerpos contra todos los subgrupos mayores. Los subcultivos de aislamientos confirmados son transmitidos a los laboratorios de salud pública donde se hacen las designaciones de serotipos basadas en reacciones serológicas a determinantes O y H.

En la figura 6 se muestra claramente las pruebas claves que se realizan para la identificación de *Salmonella* con respecto a los demás géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.⁹

Tribu III: <i>Salmonelleae</i>	KIA	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOV	LIS	ARG	ORN	ONPG
Género: <i>Salmonella</i>	Alc/A	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-

Tabla 6. Características claves para la identificación de *Salmonella*.⁹

KIA: agar hierro de kliegler

H₂S: sulfuro de hidrogeno

RM: rojo de metilo

VP: Voges-Proskauer

IND: indol

CIT: Citrato

PAD: fenilalalina desaminasa

URE: urea

MOV: movilidad

LIS: lisina

ARG: arginina

ORN: ornitina

ONPG: o-nitrofenil-β D-galactopiranósido

<p>Subgrupo 1</p> <p><i>S. typhi</i></p> <p><i>S. choleraesuis</i></p> <p><i>S. paratyphi</i></p> <p><i>S. gallinarum</i></p> <p><i>S. pullorum</i></p>
<p>Subgrupo 2</p> <p><i>S. salamae</i></p>
<p>Subgrupo 3a</p> <p><i>S. arizonae</i></p>
<p>Subgrupo 3b</p> <p><i>S. diarizonae</i></p>
<p>Subgrupo 4</p> <p><i>S. houtenae</i></p>
<p>Subgrupo 5</p> <p><i>S. bongori</i></p>
<p>Subgrupo 6</p> <p><i>S. choleraesuis</i> subesp. Indica</p>

Tabla 7. Clasificación del género *Salmonella*.⁹

8.2 Incidencia y fuentes de salmonelosis

Las infecciones humanas producidas por salmonelas en general son causadas por ingestión de comida, agua o leche contaminada por excrementos humanos o animales. Las salmonelas son en principio patógenas de animales pequeños (aves de corral, vacas, cerdos, mascotas, pájaros, ovejas, focas, monos, lagartos y serpientes), los cuales son las principales fuentes de salmonelosis no tifoideas en humanos.

Un hecho interesante es que los humanos son el único reservorio conocido de *S. typhi*. Aunque la incidencia de fiebre tifoidea ha declinado en los países desarrollados, continúan ocurriendo epidemias esporádicamente. En EUA se comunican alrededor de 400 casos, en contraste, se producen unos 50,000 casos de salmonelosis no tifoidea cada año.

Alrededor de la mitad de las epidemias se deben a aves de corral y productos contaminados de las mismas (huevos de gallina). El Acta de Inspección de Productos derivados de Huevo exige la pasteurización de la totalidad de los productos de huevo y la inspección, supervisada por el estado, de grietas en la cáscara de los huevos.

S. typhimurium es el serotipo reportado con mayor frecuencia (20%) de los aislamientos informados a los CDC.

Desde 1976 a 1991 los aislamientos de *S. enteritidis* en los EUA incrementaron de un 5 al 20% y en 1989 y 1990 superó la tasa de aislamiento de *S. typhimurium*.

La mayor epidemia de salmonelosis en la historia de los EUA (16,000 casos confirmados que indicaban 150,000-200,000 personas infectadas realmente) ocurrió en 1985 en Illinois y estados aledaños, la cual fue rastreada hasta una válvula defectuosa de una importante firma comercial proveedora de leche.

En los EUA han ocurrido varias epidemias de *S. enteritidis* desde 1990 asociadas con cáscaras de huevo, estimándose que un 0,01% de las mismas están contaminadas con dicho microorganismo.

Estos brotes sirven como una advertencia constante de que la moderna tecnología no es inmune a los azotes de enfermedades infecciosas que pueden generar epidemias explosivas y muy diseminadas.

Las salmonelosis también han sido asociadas con el contacto directo o indirecto con reptiles (lagartos, serpientes y tortugas). A principios de 1970, pequeñas tortugas mascotas fueron una importante fuente de infecciones por *Salmonella* en los EUA, lo que provocó que en 1975 La Food and Drug Administration (FDA) prohibieron la distribución y venta de las mismas.⁹

9. JUSTIFICACION

En los últimos años el aguacate ha tenido gran demanda y utilización entre la sociedad globalizada, éste producto agrícola posee un gran sabor y atributos organolépticos y nutricionales, que lo ha colocado como un ingrediente en múltiples cocinas internacionales. Así surge la necesidad de poder certificar los procesos de la agroindustria del mismo, en donde un punto importante es la inocuidad alimentaria en los procesos del cultivo, cosecha y poscosecha del aguacate, lográndose la certificación de los procesos. De verificar la misma, puede garantizarse que el producto (aguacate) sea un alimento seguro, libre de cualquier agente contaminante y tenga un gran impacto económico y aceptación social.

Además de lo económico, se debe cumplir con los requerimientos en el sector salud a nivel internacional y mantener al producto libre de organismos patógenos para las personas que lo consumen. En ésta investigación se realiza el monitoreo de enteropatógenos, como es el caso de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual es responsable de diversas infecciones gastrointestinales en el humano, entre las principales la enteritis, o salmonelosis para el caso de *Salmonella*, ya que una fuente de transmisión común es por medio de los alimentos contaminados. Entonces debemos entender que es necesario verificar la inocuidad de los mismos y, en caso de contener éstos microorganismos, excluirlos del producto (aguacate).

El monitoreo se realiza en los manipuladores del corte del aguacate, ya que ellos son los que tienen un contacto directo con el fruto después del árbol, y si éstos presentan alguna incidencia de *Salmonella* en sus manos o instrumentos de corte, es indicativo de que el fruto también es posible que lo contenga, por lo que se deberá tratar inmediatamente tal anomalía ya que se tiene por objetivo eliminar la presencia de los diversos microorganismos patógenos (como lo es *Salmonella*) y lograr tanto la certificación de la empresa para poder exportar el aguacate, así como la reducción en la incidencia de problemas gastrointestinales provocados por dichos patógenos.

10. HIPÓTESIS

Se evaluará la presencia del género *Salmonella sp.* en manipuladores de alimentos de la agroindustria aguacatera, y se compara la eficacia del método de identificación molecular contra la metodología clásica (medio de cultivo) para este género de enterobacteria, esperando un mejor resultado con los métodos moleculares debido a su especificidad y sensibilidad respecto a las herramientas clásicas.

11. OBJETIVO GENERAL

Implementación de técnicas de identificación molecular de microorganismos patógenos y verificar la incidencia de *Salmonella* sp. en los manipuladores del corte del aguacate de distintas empresas en la región de Uruapan, Michoacán.

12. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Verificar la presencia de *Salmonella* en los manipuladores del corte del aguacate.
- b) Identificar al género *Salmonella* por métodos moleculares en aislados obtenidos a partir de manipuladores del corte de aguacate.

13. MATERIALES Y MÉTODOS

Se eligieron 14 empresas de la Cd de Uruapan para muestrear, de las cuales fueron escogidos cuatro individuos, mismos que fueron tomados al azar, por lo tanto se obtuvieron 56 muestras en total para procesar. De cada individuo, se tomaron tres muestras de los siguientes sitios anatómicos de la mano y antebrazo: a) Interdigital, b) palma de la mano y c) pliegue de la mano con el antebrazo (Fig. 5).

Para cada muestra obtenida del sitio anatómico, se utilizó un hisopo de Dacron, el cual fue esterilizado previamente en autoclave a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos en un volumen de 400 microlitros de solución de PBS (Buffer Salino de Fosfatos) a un pH de 7.2 de Sigma-Aldrich.

Para tomar las muestras se pidió a cada trabajador que se lavara las manos como normalmente lo realizan previo a comenzar la recolección del fruto del aguacate y todas las muestras fueron tomadas entre las 7 y las 10 horas a.m. (toma de muestra *In situ*) en las huertas de recolección, todas ellas certificadas como huertas de exportación.

El transporte de las muestras se realizó en una caja aislada térmicamente a una temperatura promedio de 20°C y su posterior almacenaje fue a 4°C en La Ciudad de Morelia durante una noche, para su posterior procesamiento en la mañana del día siguiente.

El total de cepas de *Salmonella* aisladas a partir de los recolectores de alimentos fueron incluidas en el presente estudio.

13.1 Medios de cultivo

AGAR VERDE BRILLANTE (DIBICO). Preparación: Rehidratar 58 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10-15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 min. Vaciar en cajas de Petri.

LURIA-BERTANI: Bacto Tryptone 10g, Extracto de lavadura 5g, NaCl 10g, en un volumen total de 1000 ml.

13.2 Extracción del RNA

- 1.- De todas las cepas identificadas como *Salmonella* sp. se tomó una sola colonia y se inoculó en 2ml de medio de cultivo Luria-Bertani.
- 2.- Se hirvieron por 10 min e inmediatamente se enfriaron en hielo por 5 min, después se centrifugaron 10 min a 10,000 rpm a 4°C.
- 3.- 4µl se usaron para la RT-PCR.

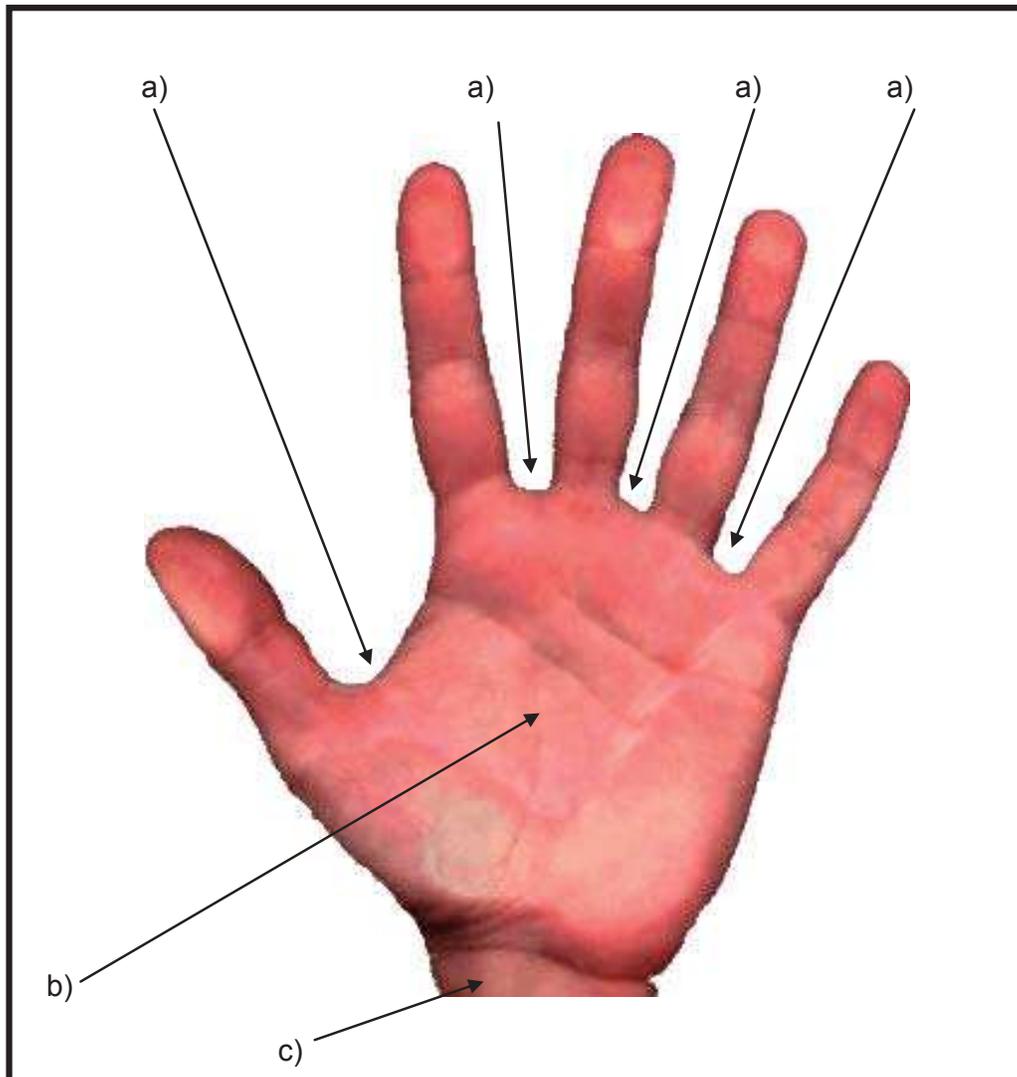


Figura 5. Sitios anatómicos de la mano donde se realizó la toma de muestra para la identificación de *Salmonella*, a) Interdigital, b) palma de la mano y c) pliegue de la mano con el antebrazo

13.3 Reacción en cadena de la polimerasa

1.- Se utilizaron los siguientes primers:

30-mer: 5'-CGGAACGTTATTTGCGCCATGCTGAGGTAG-3'

27-mer 5'-GCATGGATCCCCGCCGGCGAGATTGTG-3' ³

2.- El producto de amplificación es de 198 pb.

3.- El programa de amplificación en el Termociclador Eppendorf fue el siguiente:

3.1 95°C 5 min (temperatura de activación),

3.2 95°C 50 seg; 65°C 1min (temperatura de alineamiento).

3.3 71°C 1 min y una extensión de 8 min a 72°C durante 40 ciclos.

13.4 Sistema de amplificación (Retrotranscripción)

1.- La RT se efectuó a través de la SuperScript® II Reverse Transcriptase de Invitrogen.

2.- La PCR amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50µl, conteniendo 25pmol de cada primer, 50µmol de cada dNTP, 3mmol de MgCl₂, y 2 unidades de la Taq polimerasa de DNA de Invitrogen.

3.- El control negativo contenía exactamente la misma mezcla de la reacción anterior, excepto que el cDNA templado no fue incluido en este experimento.

4.- La electroforesis se realizó con una alícuota de cada tubo de reacción en agarosa de alta resolución (sigma-aldrich) a una concentración de 1.8% a un voltaje de 70v y teñido el gel durante 10min con bromuro de etidio (sigma-aldrich) a una concentración de 500µg/ml y visualizados en el transiluminador de luz ultravioleta (320 nm).

13.5 Secuencia génica:

1	MPHFNPVPVS	NKKFVFDDFI	LNMDGSLLRS	EKKVNIPPKE	YAVLVILLEA	AGEIVS
61	LDQVWGDAEV	NEESLTRCIY	ALRRILSEDK	EHRYIETLYG	QGYRFNRPVV	VVSPAPQPT
121	THTLAILPFQ	MQDQVQSESL	HYSIVKGLSQ	YAPFGLSVLP	VTITKNCRSV	KDILELMDQL
181	RPDYYISGQM	IPDGNDNIVQ	IEIVRVKGYH	LLHQESIKLI	EHQPASLLQN	KIANLLLRICI
241	PGLRWDTKQI	SELNSIDSTM	VYLRGKHELN	QYTPYSLQQA	LKLLTQCVNM	SPNSIAPYCA
301	LAECYLSMAQ	MGIFDKQNAM	IKAKEHAIKA	TELDHNNPQA	LGLLGLINTI	HSEYIVGSLL
361	FKQANLLSPI	SADIKYYYGW	NLFMAGQLEE	ALQTINECLK	LDPTRAAAGI	TKLWITYYHT
421	GIDDAIRLGD	ELRSQHLQDN	PILLSMQVMF	LSLKKGHELA	RKLTKEISTQ	EITGLIAVNL
481	LYAEYCQNSE	RALPTIREFL	ESEQRIDNNP	GLLPLVLVAH	GEAIAEKMWN	KFKNEDNIWF
541	KRWKQDPRLI	KLR				

Tabla 8. Secuencia peptídica del gen *hilA* de *Salmonella*.Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez.

1 ATgCCACACT TCAACCCAgT ACCAgTATCA AACAAAAAT TCgTATTCgA CgACTTCATA
CTAAACATgg ACggATCACT ACTACgATCA gAAAAAAAAG TAAACATACC ACCAAAAgAA
TACgCAgTAC TAgTAATACT ACTAgAAgCA gCAggAgAAA TAgTATCA

2 CTAgACCAAg TATggggAgA CgCAGAAgTA AACgAAgAAT CACTAACACg ATgCATATAC
gCACTACgAC gAATACTATC AgAAgACAAA gAACACCgAT ACATAgAAAC ACTATACggA
CAAggATACC gATTCAACCg ACCAgTAgTA gTAgTATCAC CACCAgCACC
ACAACCAACA

3 ACACACACAC TAgCAATACT ACCATTCCAA ATgCAAgACC AAgTACAATC AgAATCACTA
CACTACTCAA TAgTAAAAgg ACTATCACAA TACgCACCAT TCggACTATC AgTACTACCA
gTAACAATAA CAAAAAAGTg CCgATCAgTA AAAGACATAC TAgAACTAAT ggACCAACTA

4 CgACCAgACT ACTACATATC AggACAAATg ATACCAgACg gAAACgACAA CATAgTACAA
ATAgAAATAg TAgAgTAAA AggATACCAC CTACTACACC AAgAATCAAT AAAACTAATA
gAACACCAAC CAgCATCACT ACTACAAAAC AAAATAgCAA ACCTACTACT
ACgATgCATA

5 CCAggACTAC gATgggACAC AAAACAAATA TCAGAACTAA ACTCAATAgA CTCAACAATg
gTATACCTAC gAggAAAACA CgAACTAAAC CAATACACAC CATACTCACT ACAACAAGCA
CTAAACTAC TAACACAATg CgTAAACATg TCACCAAAT CAATAgCACC
ATACTgCgCA

6 CTAgCAGAAAT gCTACCTATC AATggCACAA ATgggAATAT TCgACAAACA AAACgCAATg
ATAAAgCAA AAgAACACgC AATAAAgCA ACAGAACTAg ACCACAACAA CCCACAAGCA
CTAggACTAC TAggACTAAT AAACACAATA CACTCAGAAAT ACATAgTAgg
ATCACTACTA

7 TTCAAACAAg CAAACCTACT ATCACCAATA TCAGCAGACA TAAATACTA CTACggATgg
AACCTATTCA TggCAGgACA ACTAgAAgAA gCACTACAAA CAATAAACgA ATgCCTAAAA
CTAgACCCAA CACgAgCAgC AgCAggAATA ACAAACCTAT ggATAACATA
CTACCACACA

8 ggAATAgACg ACTAggAgAC gAACTACgAT CACAACACCT ACAAgACAAC CCAATACTAC
TATCAATgCA AgTAATgTTC CTATCACTAA AAggAAAAACA CgAACTAgCA CgAAAACTAA
CAAAAGAAAT ATCAACACAA gAAATAACAg gACTAATAgC AgTAAACCTA

9 CTATACgCAG AATACTgCCA AAACCTAgAA CgAgCACTAC CAACAATACg AgAATTCCTA
gAATCAGAAC AACgAATAgA CAACAACCCA ggACTACTAC CACTAgTACT AgTAgCACAC
ggAgAAgCAA TAgCAGAAAA AATgTggAAC AAATTCAAAA ACgAAgACAA
CATATggTTC

10 AAACgATggA AACAAgACCC ACgACTAATA AAACCTAgA

Tabla 9. Secuencia nucleotídica del gen *hilA* de *Salmonella*.

Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez.

14. RESULTADOS

El presente estudio se realizó para las siguientes compañías de corte especializado en fruto del aguacate, todas las empresas están ubicadas en la Cd. de Uruapan Michoacán. Como se mencionó en la metodología se practicó a cuatro trabajadores de cada compañía, utilizando para ello muestras provenientes de manos, y antebrazos lavados con agua tratada con hipoclorito de sodio a una concentración reportada del 1 al 2 % de cloro libre. Todas las muestras se tomaron in situ (lugar de cosecha certificada).

Después de terminado el proceso de identificación se obtuvieron los siguientes resultados, mismos que son reportados en UFC:

EMPRESA 1

ZONA	COLIFORMES TOTALES				SALMONELLA			
	RAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	10	18	10	8	NEG	2	NEG	NEG
Palma	19	19	8	9	NEG	3	NEG	NEG
Muñeca	19	19	14	8	NEG	2	NEG	NEG

EMPRESA 2

ZONA	COLIFORMES TOTALES				SALMONELLA			
	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	10	8	12	9	NEG	2	NEG	NEG
Palma	NEG	7	14	6	NEG	2	NEG	NEG
Muñeca	9	17	20	16	NEG	2	NEG	NEG

EMPRESA 3

COLIFORMES TOTALES

SALMONELLA

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	28	10	10	8	3	9	8	10
Palma	19	9	8	6	8	6	7	14
Muñeca	17	9	14	8	10	4	9	15

EMPRESA 4

COLIFORMES TOTALES

SALMONELLA

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	8	10	28	NEG	2	NEG	NEG	NEG
Palma	10	10	8	9	8	9	NEG	NEG
Muñeca	18	12	12	8	10	9	NEG	NEG

EMPRESA 5

COLIFORMES TOTALES

SALMONELLA

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	8	22	10	8	NEG	NEG	NEG	NEG
Palma	10	9	8	6	NEG	NEG	NEG	NEG
Muñeca	11	8	7	8	NEG	NEG	NEG	NEG

EMPRESA 6**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	12	11	9	14	8	8	NEG	NEG
Palma	15	14	12	16	7	12	NEG	NEG
Muñeca	18	19	14	16	8	8	NEG	NEG

EMPRESA 7**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	6	19	10	10	NEG	NEG	NEG	NEG
Palma	9	20	8	11	NEG	NEG	NEG	NEG
Muñeca	7	9	14	7	NEG	NEG	NEG	NEG

EMPRESA 8**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	9	12	12	9	8	8	5	NEG
Palma	10	14	8	7	7	5	4	NEG
Muñeca	8	20	10	8	8	8	8	NEG

EMPRESA 9**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	9	12	11	7	NEG	NEG	9	NEG
Palma	21	14	14	12	NEG	NEG	7	NEG
Muñeca	22	9	12	8	NEG	NEG	7	NEG

EMPRESA 10**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	12	70	56	17	NEG	NEG	NEG	NEG
Palma	10	35	29	32	NEG	NEG	NEG	NEG
Muñeca	14	19	17	28	NEG	NEG	NEG	NEG

EMPRESA 11**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	11	11	9	7	9	8	NEG	NEG
Palma	12	10	7	14	7	10	NEG	NEG
Muñeca	14	12	10	8	7	12	NEG	NEG

EMPRESA 12**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	15	12	17	18	9	NEG	NEG	NEG
Palma	NEG	14	19	17	19	NEG	NEG	NEG
Muñeca	29	19	20	18	11	NEG	NEG	NEG

EMPRESA 13**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	7	12	12	12	NEG	NEG	12	NEG
Palma	4	7	10	10	NEG	NEG	14	NEG
Muñeca	4	15	9	10	NEG	NEG	5	NEG

EMPRESA 14**COLIFORMES TOTALES****SALMONELLA**

ZONA	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4	TRAB1	TRAB2	TRAB3	TRAB4
Interdigital	9	9	10	17	NEG	NEG	NEG	NEG
Palma	8	10	11	17	NEG	NEG	NEG	NEG
Muñeca	18	19	19	29	NEG	NEG	NEG	NEG

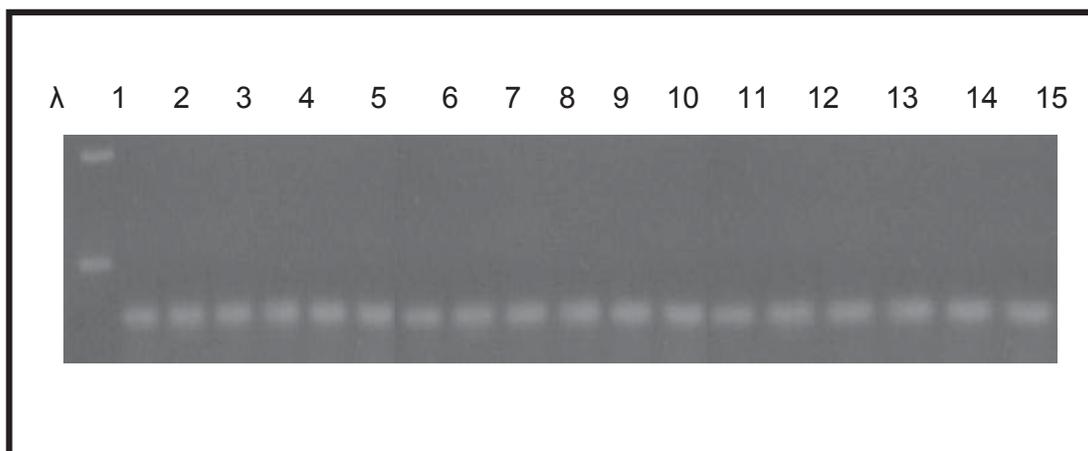


Figura 6. Muestras positivas para el producto de amplificación del gen *hilA* provenientes de las cepas de *Salmonella* aisladas a partir de los trabajadores en listados en la sección de resultados, carriles 2 al 15. El carril 1 corresponde al marcador de tamaños moleculares Lamda λ de Sigma-Aldrich.

15. DISCUSIÓN

Durante el proceso de infección de *Salmonella* son requeridos la expresión de genes específicos para la invasión en las células del hospedero. Algunos de esos genes son codificados en secuencias génicas específicas de factores de patogenicidad denominados isla 1(SPI-1)¹¹, el cual está presente en todas las cepas invasivas de *Salmonella*⁸ y ausente de los géneros como lo es *Escherichia*.^{2,11} La expresión de esos genes de invasión es activada por un gen denominado *hilA*, el cual también se encuentra codificado en la región SPI-1.¹ El gen *hilA*, es por tanto, un factor importante característico del proceso de patogénesis de *Salmonella*, el cual es requerido por la bacteria para la colonización extracelular en el compartimiento luminal del intestino del huésped.¹³

Así en el presente estudio la especificidad y sensibilidad de este par de primers mostrados y dirigidos contra el gen *hilA* de *Salmonella*, permite: **1)** Corroborar la identidad de aislados de esta enterobacteria y **2)** Permite así mismo su utilización en el campo práctico, como es el caso de la identificación de especies de *Salmonella* en muestras provenientes de humanos, involucrados en el proceso de la cosecha del aguacate. Los primers fueron originalmente diseñados con el objetivo de clonar un fragmento del gen *hilA* para de esta manera interrumpir este gen en el cromosoma bacteriano y elucidar la función específica de éste gen en especies de *Salmonella* con importancia clínica para los humanos.

El problema más común con el uso de métodos por PCR directas en la detección de un microorganismo en muestras provenientes de seres humanos es que algunas sustancias como ácidos grasos pueden funcionar como inhibidores de la PCR.⁵ Éste problema puede ser eliminado por la extracción de ácidos nucleicos a partir de medios de cultivos líquidos que sirven como enriquecimientos específicos para metodología de PCR (medio Luria Bertani).⁶ Existen otros métodos de extracción de DNA que permiten la detección directa tiempo y limita su disponibilidad y uso en campo (en la agroindustria del aguacate).

Así éste método expuesto en el presente trabajo permite corroborar la identidad de aislados de *Salmonella* a partir de muestras humanas. Éstos resultados de corroboración se pueden obtener en menos de 24 horas y mejorando la especificidad y sensibilidad respecto a métodos serológicos (comercialmente más caros).

En el presente estudio se ha usado una Taq polimerasa de tipo hot start RT-PCR, lo cual tiene como propósito el reducir amplificaciones inespecíficas.¹⁶

La metodología utilizada confirma que el gen *hilA* y los primers utilizados son específicos como blancos moleculares para la identificación del género *Salmonella* y los ensayos de PCR son promisorios para la implementación de éstas técnicas en el campo y permiten la detección de portadores de especies de *Salmonella*.

16. CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados mostrados en el presente trabajo demuestran que la sensibilidad y especificidad actual de las técnicas de RT-PCR permiten su utilización dentro del campo agroindustrial para la identificación en tiempo más reducido y con mayor precisión los diversos agentes patógenos, como lo es *Salmonella*.
- 2.- Los métodos moleculares son efectivos para la identificación de *Salmonella*, pero no reemplazan a las técnicas convencionales. Pueden funcionar como un complemento para realizar la detección y cuantificación de éste enteropatogeno y así obtener resultados en cuando a la identificación se refiere, lo que permite aumentar la competitividad de la agroindustria michoacana.
- 3.- Los oligonucleótidos específicos para secuencias genéticas de factores de invasión tisular en enterobacterias utilizados en ésta investigación permiten su uso en estrategias moleculares de identificación y su aplicación, en el área de inocuidad alimentaria tan importante en el sector agroalimentario nacional.
- 4.- Se necesita la implementación de estrategias novedosas y eficaces que permitan la identificación, con un margen adecuado de confiabilidad de riesgos en la bioseguridad alimentaria dentro de la agroindustria, la cual en un sector económico importante en el estado de Michoacán en el contexto nacional.

17. GLOSARIO

Aguacate Hass: fruto de *Persea americana* originada a partir de una semilla de raza guatemalteca en un huerto de Rudolph Gay Hass en la Habra, California en 1926; es la variedad más cultivada a nivel mundial.

Barrenador: un gusano proveniente de la mariposa, es la plaga más importante y hace que el fruto caiga, el cual presenta un agujero donde ha entrado el gusano.

Bioseguridad alimentaria: situación en la que toda la población, en todo el momento, goza de acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen las necesidades alimenticias adecuadas para llevar a cabo una vida activa y sana.

Cepas: es una variante genotípica de una especie o, incluso, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Contaminación: se considera contaminado el producto o materia prima que contenga microorganismos, hormonas, sustancias bacteriostáticas, plaguicidas, partículas radiactivas, materia extraña, así como cualquier otra sustancia en cantidades que rebasen los límites permisibles establecidos por la Secretaría de Salud.

Desinfección: reducción del número de microorganismos a un nivel que no da lugar a contaminación del alimento, mediante agentes químicos, métodos físicos o ambos, higiénicamente satisfactorios. Generalmente no mata las esporas.

Electroforesis: técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica.

Especificidad: dentro de biología molecular hace referencia a la especificidad que tienen los oligonucleótidos (5'—3') y (3'—5') para alinearse solamente dentro de una secuencia génica de ADN y generalmente esto está condicionado por la temperatura de alineamiento.

Exactitud: se refiere a que tan cerca del valor real se encuentra el valor medido. En términos estadísticos, la exactitud está relacionada con el **sesgo** de una estimación. Cuanto menor es el sesgo más exacta es una estimación.

Enteritis: es una condición que se produce cuando el revestimiento del intestino delgado se hincha y se inflama, generalmente causada por comer o beber sustancias contaminadas con bacterias o virus.

Fitosanitaria: Pertenece o relativo a la prevención y curación de las enfermedades de las plantas.

Higiene: todas las medidas necesarias para garantizar la sanidad e inocuidad de los productos en todas las fases del proceso de fabricación hasta su consumo final.

Hot start Taq polymerase: Grupo enzimático con función de polimerización de nucleótidos, los cuales para ser activados requieren de la elevación de la temperatura que generalmente ronda los 90 a 95°C.

Inocuidad: Es la condición de los alimentos que garantiza que no causaran daño al consumidor cuando se preparen y /o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan.

Limpieza: conjunto de procedimientos que tiene por objeto eliminar tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras materias objetables.

Manipulación: acción o modo de regular y dirigir materiales, productos, vehículos, equipo y máquinas durante las operaciones de proceso, con operaciones manuales.

Manipulador de alimentos: toda aquella persona que por su actividad laboral tiene contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio.

Microorganismos patógenos: microorganismos capaces de causar alguna enfermedad al ser humano.

PCR: técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde, lo que se conoce como amplificación.

Primers: oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos complementarios a la zona flanqueante de la región que se quiere amplificar, estos actúan como cebadores para la síntesis de ADN in vitro, la cual esta catalizada por la Taq polimerasa, los primers actúan como marcadores del sitio de inicio de la enzima.

Proceso: conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

Precisión: capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones. Esta cualidad debe evaluarse a corto plazo.

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* (por sus siglas en ingles), es una variante de PCR. En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa reversa, y el resultado, se amplifica en un PCR tradicional.

Secuencia génica: es una sucesión de bases nitrogenadas (A,G,C,T), representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda de amplicón, con la capacidad de codificar información.

Sector agroalimentario: sector industrial medular en las naciones que permite asegurar su soberanía alimentaria.

Sensibilidad: límite inferior que permite la detección de moléculas en una muestra, cuyas unidades pueden expresarse generalmente en el orden de gramos (μg , ng, pg, fg).

Taq polimerasa: enzima aislada del una bacteria (*Termophilus acuaticus*), que es capaz de incorporar nucleótidos libres en el extremo 3' del primer unido a la cadena principal; formando así una cadena complementaria, la enzima tiene la característica de soportar temperaturas elevadas y mantener una media de extensión de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C.

18. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C.A. (1995). *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expresion of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* 18, 715-727.
- 2.- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. & Adams, L.G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enteric*. *Infect Immun* 66, 4579-4587.
- 3.- Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002. Detection of *hilA* gene sequences in serovars of *Salmonella enteric* subspecies *enteric*. *Dec*;97(8):1153-6. Epub 2003 Jan 20.
- 4.- Centrolab. Control a manipuladores de alimentos. Medellin Colombia, 2008. Acceso 6 febrero 2010. Disponible en: http://www.centrolab.com.co/servicios/serv_alimentos.html (©2008 CENTROLAB - Derechos Reservados)
- 5.- Chiu, C.- H. & Ou, J. T. (1996). Rapid identification of *Salmonella serovars* in feces by espscific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34, 2619-2622.
- 6.- Dutta, S., Chatterjee, A., Dutta, P., Rajendran, K., Roy, S., Pramanik, K. C. & Bhattacharya, S, K. (2001). Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparision to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhea in Calcutta, India. *J Med Microbiol* 50, 667-674.
- 7.- Fox, A. Microbiología e Inmunología on-line, Bacteriología - Capítulo Once Enterobacteriaceae, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Helicobacter*. Departamento de Microbiología e Inmunología. University of South Carolina, EUA. Acceso 2 enero 2010. Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter11.htm>
- 8.- Galan, J.E. (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol*20, 263-271.
- 9.- Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., & Winn W. C. Diagnóstico Microbiológico; Texto y atlas a color; Quinta edicion, Editorial Medica Panamericana. 1999.
- 10.- Mathews, C. K., Van Holde, K.E. & Ahern, K.G. (2003). «6», *Bioquímica*, 3 edición, pp. 204 y ss. ISBN 84-7892-053-2.

- 11.- Mills, D.M., Bajaj, V. & Lee, C. A. (1995). A 40p kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15, 749-759.
- 12.- Montiel de M, M., Zambrano, J, L. & Castejón, O. Indicadores bacterianos de contaminación fecal y colifagos en el agua de la Laguna de Sinamaica, Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*. [online]. sep. 2005, vol. 13, no. 3. Acceso 9 marzo 2010. Disponible en: www2.scielo.org.ve/scielo.php?script... -
- 13.- Murray, R.A. & Lee, C.A. (2000). Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* to breach to intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect Immun* 68, 5050-5055.
- 14.- Pelayo, M. Requisitos y obligaciones del manipulador de alimentos. Vizcaya, España. *Consumer Eroski*, 6 de marzo 2008. Acceso 15 enero 2010. Disponible en: <http://www.consumer.es>
- 15.- Reyes A, B, R. Importancia Y Requerimientos de Higiene del Personal en la Obtención de Leche Cruda. Cofocalec, Guadalajara Jalisco, Mexico. Acceso 2 enero 2010. Disponible en: <http://www.cofocalec.org.mx>
- 16.- Roux, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. In *PCR Primers: a Laboratory Manual*, pp. 53-62. Edited by C. W. Dieffenbach & G. S. Dveksler. Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 17.- Salazar, G, S., Zamora, C, L. & Vega, L, R. J. Actualización sobre la Industria del Aguacate en Michoacán, México. *California Avocado Society 2004-05 Yearbook* 87: 45-54; Acceso 2 Enero 2010. Disponible en: <http://www.avocadosource.com>
- 18.- SAGARPA. 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Acceso 25 enero 2010. Disponible en: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>
- 19.- Sambrook, J. & Russel, D, W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. edición, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.
- 20.- Santos, E. PCR y Diagnóstico Molecular. Madrid España. *Lifescienceslab*, enero- febrero 2009. Acceso 9 marzo 2010. Disponible en: <http://www.lifescienceslab.com>
- 21.- Sarmiento, F, M. El aguacate. *Joya de México para el mundo*. México desconocido no. 308, octubre 2002. Acceso 6 febrero 2010. Disponible en: <http://www.mexicodesconocido.com.mx>

22.- Sóstenes E., Fuentes, V & Martínez, G, J, C. Revista turevista, Seguridad, calidad e inocuidad alimentaria para México. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. Universidad Autónoma de Tamaulipas Dirección General de Investigación y Posgrado, Noviembre 2006. Acceso 15 enero 2010. Disponible en: <http://www.turevista.uat.edu.mx>

23.- Vanegas, L, C. Importancia de patógenos emergentes en la inocuidad alimentaria. Revista IAlimentos, edición 5, pag 34, Bogota Colombia, agosto del 2008. Acceso 15 enero 2010. Disponible en: <http://www.revistaialimentos.com.co>

24.- Vélez, M, A., Tanya Hernández, M, T. & A. Villegas M, M, A. Inocuidad alimentaria en México. México, freshplaza, 22 septiembre 2009. Acceso 15 enero 2010. Disponible en: <http://www.freshplaza.es>

25.- Watson, J, D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene*, Fifth edition, San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.

ANEXO I

SITIOS ELECTRÓNICOS PARA CONSULTA DE NORMAS:

- 1.- NOM-066-FITO-2002: www.senasica.gob.mx/?doc=696 –
- 2.- NMX-FF-016-SCFI-2006: www.economia.gob.mx/work/normas/nmx/2006/ -
- 3.- NOM-128-SCFI-1998: faolex.fao.org/docs/texts/mex17968.doc –
- 4.- NMX-FF-016-SCFI-2002: vlex.com.mx/vid/vigencia-normas-mexicanas-scfi-27995028
- 5.- NOM-120-SSA1-1994: www.salud.gob.mx/unidades/.../nom/120ssa14.html