

00528
10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACION DE *Salmonella sp.* EN LA
SUPERFICIE DEL MANGO POR PCR MULTIPLE

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GABRIELA PATRICIA BALTIERRA MENA

MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
VOCAL: Prof. Ma. del Carmen Wachter Rodarte
SECRETARIO: Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López
1er. SUPLENTE: Prof. Luciano Hernández Gómez
2do. SUPLENTE: Prof. Martha Giles Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
UNAM, Facultad de Química. Departamento de Alimentos y
Biotecnología, Edificio E, Laboratorio 324

ASESOR DEL TEMA:

Ma. del Carmen Wachter
Dra. Ma. Del Carmen Wachter R.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Francisco Ruiz Terán
Dr. Francisco Ruiz Terán

SUSTENTE:

Gabriela P. Baltierra Mena
Gabriela P. Baltierra Mena

B

A MI MADRE

Por su lucha, entrega, apoyo incondicional, amor y sabios consejos, pero sobre todo por ser la persona que más amo.

A MI PADRE

Por enseñarme a ser fuerte
Y por que siempre estará presente.

A DIOS

Por regalarme la vida.

A la Dra. Carmen Wachter por creer en mí y confiarme su proyecto, por ayudarme a crecer intelectualmente y por el apoyo que siempre me brindó.

Al Dr. Francisco Ruíz por su apoyo, certeros consejos y por ser parte de la realización de esta tesis.

A la Dra. Gloria Díaz por su gran apoyo y consejos durante la realización y terminación de esta tesis, pero sobre todo por esa gran amistad.

A mis hermanos Isis, Cris y Leo por esas horas de alegría, risas y llanto que hemos compartido. Gracias por creer en mí. Los quiero mucho.

A Andrés por su gran amor, por ser parte de mi vida y por apoyarme siempre de manera incondicional.

A mi tía Paty por ser como una madre.

A mi tía Mary por su amor, apoyo moral y académico.

A Vale por ser mi gran amiga, por acompañarme siempre en mis penas y por demostrarme que la distancia no acaba con la amistad.

A mis amigos de la Facultad, Mariana, Vane y Joha que hicieron que las horas difíciles y cansadas fueran divertidas.

Al maestro Agustín por siempre darme ánimos en los momentos difíciles.

A mis compañeros del laboratorio 324 y a Alicia por su amistad y compañía en esas largas jornadas.

A los compañeros y profesores del laboratorio 312 por su ayuda en la realización de esta tesis.

A la Dra. Andrea Trejo por su gran aportación y colaboración en el muestreo de los mangos.



Al Dr. Eslava por habernos proporcionado amablemente las cepas control y por su participación en la identificación de microorganismos por el método Vitek, y por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Biserka Sveshtarova y la Profesora Beatriz Serrano por sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis.

A todos aquellos que de alguna forma u otra forman parte de esta tesis. Gracias.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT, DGAPA, UNAM Proyecto No.IN211301



ÍNDICE	
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 MANGO	
1.1.1 ASPECTOS GENERALES	3
1.1.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES	6
1.1.3 DAÑOS PRE-COSECHA Y POSTCOSECHA	9
1.1.3.1 Quemadura por látex	
1.1.3.2 Abrusiones de la piel	
1.1.3.3 Daño por frío	
1.1.3.4 Daño por calor	
1.1.3.5 Descomposición interna de la pulpa	
1.1.3.6 Semilla gelatinosa	
1.1.3.7 Punta blanda	
1.1.4 ALMACENAMIENTO POST-COSECHA	11
1.1.4.1 Almacenamiento a bajas temperaturas	
1.1.4.2 Atmósferas controladas	
1.1.4.3 Almacenamiento Hipobárico	
1.1.4.4 Uso de revestimientos, encerados y películas de encubrimiento	
1.1.4.5 Uso de radiación ionizante	
1.1.4.6 Tratamiento térmico	
1.1.4.7 Uso de otras sustancias químicas	
1.1.5 PROBLEMAS POST-COSECHA	14
1.1.6 MICROORGANISMOS EN EL MANGO	14



1.2	SALMONELLA	
1.2.1	ASPECTOS GENERALES	16
1.2.1.1	Resistencia a antibióticos	
1.2.2	MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	23
1.2.2.1	Adherencia e Invasión	
1.2.2.2	Crecimiento y supervivencia en las células huésped	
1.2.2.3	Islas de patogenicidad	
1.2.3	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA	32
1.3	PCR	
1.3.1	DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO	34
1.3.1.2	Mecanismos de amplificación	
1.3.1.3	Componentes de la reacción	
1.3.1.4	Controles	
1.3.2	PCR MÚLTIPLE	
2.	OBJETIVOS	40
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1	MICROORGANISMOS UTILIZADOS	
3.1.1	Microorganismo del experimento	
3.1.2	Microorganismos utilizados para determinar la especificidad del método.	
3.2	MUESTRA	
3.3	ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA UTILIZANDO CEPAS PURAS DE MICROORGANISMOS DE DIFERENTES GÉNEROS	
3.3.1	Método de extracción de las cepas puras	



- 3.4 PCR
 - 3.4.1 Condiciones de amplificación de la PCR.
 - 3.4.2 Detección de los productos de la PCR.
- 3.5 SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA
 - 3.5.1 Preparación del inóculo
 - 3.5.2 Inoculación del microorganismo
 - 3.5.3 Lavado de la superficie de los mangos para recuperar los microorganismos.
 - 3.5.4 Método tradicional
 - 3.5.5 Extracción de DNA de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango
- 3.6 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES DE LA REACCIÓN DE LA PCR EN EL EXTRACTO DEL MANGO
- 3.7 ENRIQUECIMIENTO
 - 3.7.1 Cepa pura
 - 3.7.2 Microorganismos extraídos del mango
- 3.8 INOCULACIÓN DE LOS MANGOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM
 - 3.8.1 Inóculo grande
 - 3.8.2 Inóculo pequeño
- 3.9 DETECCIÓN DE *SALMONELLA* EN MUESTRAS DE MANGO DE DIFERENTES REGIONES DEL PAÍS.
- 3.10 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE LA SUPERFICIE DEL MANGO.

4. RESULTADOS

52

- 4.1 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO
- 4.2 EXTRACCIÓN DE DNA
- 4.3 INHIBIDORES DE LA PCR



- 4.4 SELECCIÓN DEL MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO
- 4.5 SENSIBILIDAD DEL MÉTODO
- 4.6 DETECCIÓN DE *SALMONELLA* EN MUESTRAS DE MANGO DE DIFERENTES REGIONES DEL PAÍS
 - 4.6.1 Sinaloa
 - 4.6.2 Oaxaca
 - 4.6.3 Veracruz, Ver.
 - 4.6.4 Poza Rica, Ver.
 - 4.6.5 Guerrero
 - 4.6.6 Aislamiento de la cepa

CONCLUSIONES 70

RECOMENDACIONES 70

APÉNDICES 71

BIBLIOGRAFÍA 73



LISTA DE TABLAS

Tabla 3. Dilución de extracto de mango utilizado para detectar la presencia de inhibidores de la PCR	47
Tabla 4. Comparación del método tradicional con la PCR en las muestras de mango inoculadas con 10^4 UFC/mango y 1 UFC/mango	60
Tabla 4.1 Resultado del muestreo realizado en diferentes regiones del país.	66

LISTA DE FIGURAS

Fig.1.1 Principales exportadores de mango, 1998 Fuente: SAGARPA y PROEXIN	6
Fig.1.2 Mecanismo de invasión de <i>Salmonella</i> en la célula huésped	25
Fig.1.3 Sitios de acción de las islas de patogenicidad de <i>S.enterica</i>	31
Fig.1.4 La reacción en cadena de la polimerasa y mecanismos de amplificación	37
Fig.3.1 Diagrama general de la experimentación	41
Fig.3.2 Diagrama de extracción de DNA de microorganismos en la superficie del mango	48
Fig.4.1 Especificidad del método	53
Fig.4.2 Extracción de DNA de la superficie del mango	54
Fig.4.3 Reacción de la PCR con diferentes diluciones del extracto del mango con buffer TES	56



Fig.4.4 Reacción de la PCR a partir de medios de enriquecimiento inoculados con <i>Salmonella</i> Typhimurium, después de 24h de incubación a 37°C	58
Fig.4.5 Reacción de la PCR a partir de medios de enriquecimiento inoculados con <i>Salmonella</i> Typhimurium extraída de la superficie del mango, con diferentes horas de incubación a 37°C.	58
Fig. 4.6. Sensibilidad del método al utilizar mangos inoculados con 10 ⁴ UFC/ml	60
Fig. 4.7 Sensibilidad del método al utilizar mangos inoculados con 1 UFC/ml	60
Fig.4.8 Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de mango del estado de Sinaloa	62
Fig.4.9 Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de mango del estado de Oaxaca	63
Fig.4.10 Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de mango del estado de Veracruz	63
Fig.4.11 Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de mango del estado de Poza Rica, Ver.	64
Fig.4.12 Presencia de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de mango del estado de Guerrero	65
Fig. 4.13 Reacción de PCR con cepas aisladas de la superficie del mango.	69
Fig. 4.14 Curva patrón de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	71



RESUMEN

México es uno de los principales exportadores de mango a nivel mundial; sin embargo en los últimos años se han presentado problemas comerciales relacionados con la inocuidad de productos frescos que han afectado el mercado de exportación. En el año 2000 se reportó en Estados Unidos un brote de salmonelosis a partir de mangos y esta bacteria se ha encontrado también en otros productos ácidos. Los métodos tradicionales utilizados para su identificación son demasiado largos y poco sensibles, por lo que es necesario el uso de técnicas más rápidas, sensibles y específicas para la detección de *Salmonella*.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que se utiliza para el desarrollo de métodos que cumplen con las expectativas deseadas de acuerdo a la rapidez, sensibilidad y especificidad. El uso de estos métodos rápidos ha ido en aumento en los últimos años, ya que ha sido un excelente auxiliar en problemas donde los microorganismos se encuentran en los alimentos en bajas concentraciones.

El objetivo de éste trabajo fue establecer una técnica capaz de detectar cuentas bajas de *Salmonella* en la superficie del mango y determinar la incidencia de esta bacteria en la superficie de diferentes muestras comerciales de mango.

Se estableció un método de PCR múltiple, utilizando tres pares de primers que amplifican el sitio *phoP/phoQ* de bacterias coliformes patógenas *Hin* y *H-Li* específicos para *Salmonella*, que codifican regiones del gene de la flagelina.



Se demostró la especificidad del método, confirmando la amplificación selectiva para *Salmonella spp.* Se detectó la presencia de un inhibidor en el extracto del mango, por lo cual fue necesario llevar a cabo un enriquecimiento previo de las muestras analizadas. Se demostró que la mayor sensibilidad se obtiene después de 5 horas de enriquecimiento en caldo BHI para detectar un inóculo de 1 UFC/ mango. El método de la PCR fue más sensible con respecto al tradicional, en la relación de 10 a 1, para la detección de *Salmonella* en el mango.

El muestreo de mangos se realizó de 5 sitios de diferente procedencia (bodegas de la Central de Abastos). Se detectó la presencia de *Salmonella sp.* en 3 de ellos. No fue posible el aislamiento de las cepas de *Salmonella*, por lo que será necesario utilizar otros métodos para determinar si estaban muertas o en estado viable no cultivable.



1. ANTECEDENTES

1.1 MANGO

1.1.1 ASPECTOS GENERALES

El mango es uno de los frutales más importantes de los países tropicales y recibe el nombre científico de *Mangifera indica* L., pertenece a la familia de las *Anacardiáceas*, que a su vez forma parte del orden de las *Terebintales* (Ibar, 1979). La especie *Mangifera indica* es de origen indio-birmano (Norte de la India) o malayo y fue trasladada por los portugueses al Brasil, de donde se extendió por todo Centroamérica (Ibar, 1979).

El fruto del mango es una drupa que puede contener uno o más embriones. Los llamados de tipo indio (de la India) son monoembrionicos y entre ellos se encuentran la mayoría de los cultivares comerciales. Los frutos varían en peso desde 200 g hasta unos de 2 Kg.; en forma, desde redonda hasta ovoide, y en color, entre verde, amarillo y distintas tonalidades del rosa, rojo y violeta.

Tiene un valor alimenticio con un contenido de azúcar entre el 10 y el 20% y un contenido de proteína alrededor del 0.5%, además de ser una fuente de vitamina C (Saúco, 1990). La fruta madura contiene cerca de 11.8% de carbohidratos, 4800IU de vitamina A, 13mg/100g de ácido ascórbico, y gran cantidad de β -Carotenos (Kaira, 1995).

Los cultivares de mango pueden agruparse en 3 grupos principales:



Cultivares Indios: Son monoembriónicos (semilla con un solo embrión), susceptibles a la antracnosis y deterioro interno. La longitud de las fibras y el color de la piel son muy variables, teniendo algunos una piel bastante roja. La mayoría son dulces con un contenido de ácidos bajo.

Cultivares Indochinos y Filipinos: Son poliembriónicos (semilla con varios embriones), relativamente resistentes a la antracnosis, dulces y sin fibra. La epidermis es verde amarillenta. Carabao es el cultivar más importante en Filipinas, y se exportan en cantidades considerables a Japón.

Cultivares de Florida: El Haden se desarrolló en Florida como planta de semilla del cv. indio Mulgoba en 1910. Las siguientes características lo han hecho muy popular en el comercio internacional: color rojo atractivo de la piel, alta resistencia de la piel, lo cual es muy importante para el transporte a larga distancia y contenido en ácidos relativamente alto. Desde 1940 se han desarrollado en Florida un grupo de cultivos con características similares. Algunos ejemplos son Tommy Atkins, Zill, Torbet, Kensington, Irwin, Haden Glenn, Lippens, Van Dyke, Sensation, Osteen, Keitt. El orden de maduración es aproximadamente el mismo en diferentes zonas de cultivo (www.crfg.org, www.infoagro.com).

Los principales cultivares que se comercializan en México son "Haden", Irwin, "Kent", "Manila", "Palmer", "Sensation", "Tommy Atkins", "Van Dyke" y "Ataulfo" (www.rajans.com).



Mango Manila

Es de origen mexicano, descendiente del cultivar de Hawai de tipo filipino. Es un fruto que madura tempranamente, es susceptible a la antracnosis y en su mayoría se cultiva en Veracruz. Su temporada comienza a finales de abril y termina en agosto. El fruto tiene una forma alargada plana, color amarillo, tamaño pequeño no mayor a 300g y de sabor dulce (Morton, 1987).



Mango Manila

Mango Ataúfio

Es originario de un cultivar de Hawai, que a su vez desciende directamente del mango Manila. Su temporada comienza a finales de abril y se extiende hasta agosto. La fruta es pequeña, plana, de forma alargada, con un peso aproximado entre 150 y 300g, su color va de amarillo verdoso a amarillo oro cuando está maduro, su sabor es muy dulce y casi no tiene fibra (Morton, 1987).

La India contribuye con cerca de un 64% de la producción mundial, pero también existen otros países productores, entre los que se encuentran México (como tercer lugar), Pakistán, Brasil, Filipinas y Tailandia (Kalra, 1995). México ocupa el tercer lugar en producción de mango a nivel mundial, mientras que en la exportación el producto nacional representa una tercera parte del comercio en el mundo. La importancia del mango en México se debe a que en nuestro país se dedica un mayor porcentaje de su producción a la exportación (Fig.1.1).

En México el mango tiene una oferta estacional bien definida en el mercado; los estados productores de mango son: Nayarit (16.7%), Chiapas (15.2%), Veracruz (12.9%), Sinaloa (12.5%), Guerrero (12.2%), Oaxaca (11.9%), Michoacán (7.9%) y Colima



(1.3%). El 80% de la producción nacional se obtiene desde fines de abril hasta principio de septiembre (www.sagarpa.com.mx).

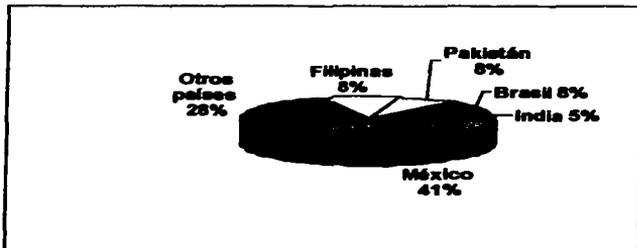


Fig.1.1 Principales exportadoras de mango, 1998
Fuente: SAGARPA y PROEXIN

1.1.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES

El mango es una especie afectada por el ataque de numerosas plagas y enfermedades, citándose en el orden de 87 patógenos, más de 350 especies de insectos, ocho especies de arañas y 13 especies de nemátodos. No todos tienen la misma importancia y así destacan como enfermedades de mayor difusión mundial la antracnosis, tanto en pre como en post-cosecha, el oidio y las manchas negras bacterianas (Sauco, 1990).

1.1.2.1 PLAGAS O PESTES

En esta clasificación se encuentran la mosca de la fruta (Karlis, 1995), Trips *Selenothrips rubrocinctus* Girad (Thysanoptera:



Terebrantia) (Mora, 1997) y los insectos escamosos (*Pulvinaria polygonata*, *Aspidiatius destructor*, *Ceroplastis* sp. y *Rastococcus* sp.).

1.1.2.2 ENFERMEDADES

El mango sufre severas enfermedades en todas las etapas de su vida. Todas las partes de las plantas son atacadas por numerosos patógenos, hongos, bacterias y algas. Estas enfermedades pueden causar las mayores pérdidas a nivel económico.

1.1.2.2.1 Antracnosis. Es producida por el hongo *Glomerella cingulata*, la enfermedad se manifiesta cuando ocurren condiciones climáticas no favorables como lo son una elevada humedad, lluvias frecuentes y temperaturas entre 24-32° C; los síntomas son diversos, en los que se incluye marchites de la panícula, manchas en las hojas, frutos y pudrición de los mismos.

1.1.2.2.2 Manchas negras bacterianas. También llamada mancha bacteriana o cáncer bacteriano, favorecida en condiciones climáticas calientes y húmedas, es causada por la bacteria *Xanthomonas campestris* cepa *Mangiferae indica*. Los principales síntomas en las hojas son pequeñas lesiones acuosas que con el tiempo forman manchas negras irregulares con halos amarillos. El centro de cada lesión es oscuro y frecuentemente se quiebra formando cánceres en forma de estrellas. La exposición de la pulpa subyacente atrae a los insectos, produciéndose una invasión posterior de otros microorganismos.

1.1.2.2.3 Moho arenoso (oidio). Esta enfermedad es causada por *Oidium mangiferae* y se desarrolla mejor a 20-25 °C. Sus síntomas son la aparición de parches de crecimiento blancos pulverulentos en la plantas y en la panícula. También afecta a las flores y lleva a una caída prematura del fruto, reduciendo considerablemente la cosecha.

1.1.2.2.4 Pudrición de la cicatriz del pedúnculo o muerte negra (Stem-end rot). De esta enfermedad es responsable el hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Durante la floración y formación del fruto, la colonización del hongo aumenta conforme las flores mueren y se empiezan a formar frutos. Esta enfermedad afecta áreas dañadas mecánicamente del pedúnculo o de la piel. El hongo crece a partir del pedúnculo formando lesiones negras circulares alrededor del mismo (Johnson, 1993).

1.1.2.2.5 Pudrición por hongo negro. Esta enfermedad es causada por *Aspergillus niger* v. Tieghem y otros *Aspergillus* spp. Los frutos afectados muestran amarillamiento en la base del fruto y manchas gris-verdosas de forma irregular que se vuelven negras o forman lesiones negras (Pathak, 1980).

1.1.2.2.6 Sarina o verrugosis (mango scab). Los hongos responsables de esta enfermedad son *Elsinoe mangiferae* y *Sphaceloma mangiferae*, los cuales atacan a las hojas, flores, frutos y varas. En etapas tempranas, esta enfermedad se parece a la antracnosis. Las lesiones del fruto se cubren con un tejido esponjoso de color café.

1.1.2.2.7 Pudrición por *Rhizopus*. Esta enfermedad es causada por *Rhizopus arrhizus* el cual produce una separación de la



cáscara y desarrollo de una mancha blanca con espora de cabezas negras (www.scisoc.org).

1.1.2.2.8 Polvo de hollin (sooty mould). Esta enfermedad es causada por varios individuos del hongo *Meliola spp.*, en especial del hongo *Meliola mangiferae*. La enfermedad en el campo se reconoce por la presencia de una cubierta negra aterciopelada en la superficie de las hojas, y en casos severos, los árboles se vuelven completamente negros (www.rajans.com).

1.1.3 DAÑOS PRE-COSECHA Y POSTCOSECHA

El mango puede tener desordenes fisiológicos y daños físicos antes de la cosecha, los cuales aparecen de manera inesperada.

1.1.3.1 QUEMADURA POR LÁTEX. Color pardo-negro a negro de la piel debido al daño químico y fisiológico del exudado que emana al cortar el pedúnculo.

1.1.3.2 ABRASIONES DE LA PIEL. Las abrasiones debidas al roce entre frutas o contra superficies rugosas produce cambios de color de la piel y una pérdida acelerada de agua.

1.1.3.3 DAÑO POR FRÍO. Los síntomas incluyen maduración heterogénea, desarrollo pobre de color y sabor, picado de la superficie, color grisáceo de la piel parecido al escaldado, aumento de la susceptibilidad a las pudriciones y, en casos severos, pardeamiento de la pulpa. La incidencia y severidad de esta fisiopatía dependen del cultivar, estado de madurez, (los mangos más maduros son menos susceptibles) la temperatura y duración de la exposición.



1.1.3.4 DAÑO POR CALOR. La exposición a temperaturas superiores a 30 °C (86°F) por períodos mayores a 10 días provoca maduración heterogénea, moteado de la piel y sabor intenso. Cuando se excede el tiempo y/o la temperatura recomendados para el control de insectos y/o pudriciones se presentan también daños por calor (escaldado de la piel, moteado y maduración heterogénea); por ejemplo, en el tratamiento diseñado para el control de insectos, cuando la fruta se sumerge por más del tiempo recomendado (65-90 minutos, dependiendo del tamaño del mango) o el agua está a más de 46.4°C (115.5°F), que es la temperatura recomendada.

1.1.3.5 DESCOMPOSICIÓN INTERNA DE LA PULPA, AHUECAMIENTO DE LA ZONA PRÓXIMA A LA CICATRIZ DEL PEDÚNCULO. Se caracteriza por la descomposición de la pulpa y el desarrollo de cavidades internas entre la semilla y el pedúnculo. Esta fisiopatía es más frecuente en mangos madurados en el árbol.

1.1.3.6 SEMILLA GELATINOSA, MADURACIÓN PREMATURA. Desintegración de la pulpa que rodea a la semilla en forma de una masa gelatinosa.

1.1.3.7 PUNTA BLANDA. Ablandamiento del tejido del ápice o punta floral. La pulpa luce sobre madura y puede alterar su color y volverse esponjosa. Esta fisiopatía puede estar relacionada con deficiencia de calcio.

1.1.4 ALMACENAMIENTO POST-COSECHA

Muchos factores como la maduración, el método de cosecha, el empaquetamiento, el transporte y las enfermedades entre otros, afectan la estabilidad del mango. Debido a que éste tiene la capacidad de responder metabólicamente al ambiente en donde se encuentra almacenado, se han diseñado métodos para extender la vida de anaquel y reducir las pérdidas. Éstos se clasifican en métodos físicos y químicos (Kalra, 1995).

1.1.4.1 ALMACENAMIENTO A BAJAS TEMPERATURAS

Debido a que el mango es una fruta tropical, es sensible al frío; por lo que el almacenarlo a bajas temperaturas reduce el rango de respiración y baja la posibilidad de producción de etileno, lo que ayuda a retardar su maduración (Kalra, 1995). El problema de este método es que el almacenamiento prolongado a bajas temperaturas afecta la maduración de la fruta y en condiciones extremas éste puede sufrir daño por frío. Se considera que la temperatura óptima para su almacenamiento está entre 12 y 13°C (Mitra, 1997).

1.1.4.2 ATMÓSFERAS CONTROLADAS

Uno de los métodos utilizados para mantener la calidad del mango es el uso de atmósferas controladas, las cuales usan concentraciones de CO₂ mayores que las del aire y de O₂ menores, lo que provoca el incremento de la respiración y de los niveles de etanol así como la disminución de la producción de etileno. En México se han probado atmósferas modificadas que contienen baja cantidad de O₂ (<1%) y alta de CO₂ (70-80%) para el control de la mosca de la fruta, las cuales han resultado

excelentes si se utilizan alternativamente tratamientos químicos y tratamientos hidrotérmicos (Mitra, 1997).

1.1.4.3 ALMACENAMIENTO HIPOBÁRICO

El almacenamiento hipobárico consiste en almacenar la fruta a condiciones bajas de presión. Se han hecho estudios en donde se ha encontrado que presiones entre 76-152mm de Hg a 13°C con 98-100% de humedad relativa por tres semanas, aumentan de manera considerable la aceptación de la fruta ya que retarda la maduración y por lo tanto aumentan su vida de anaquel (Mitra, 1997).

1.1.4.4 USO DE REVESTIMIENTOS, ENCERADOS Y PELÍCULAS DE ENCUBRIMIENTO

Se han reportado el uso de recubrimientos y encerados para alargar la vida de anaquel del mango, ya que éstos modifican la atmósfera y ayudan a disminuir la pérdida del agua. Los recubrimientos de aceite disminuyen la respiración más que las ceras ya que se crea un ambiente con condiciones anaeróbicas severas capaces de dañar la fruta, aunque ambos disminuyen la pérdida de agua (Mitra, 1997).

1.1.4.5 USO DE RADIACIÓN IONIZANTE

Los mangos son irradiados para su desinfección y para retardar el proceso de maduración y crecimiento fisiológico. Las dosis de irradiación reportadas varían enormemente, así como los efectos de la irradiación sobre la fruta. Las dosis requeridas para la desinfección oscilan entre los 75 Gy para el control de la mosca de la fruta y 300 Gy para esterilizar otros insectos. Sin embargo, muchos de estos estudios de irradiación de frutas y hortalizas, enfocados en alargar la vida de anaquel del mango, que utilizan

dosis entre 1000 a 3000 Gy, generalmente tienen resultados adversos (Mitchell, 1992).

1.1.4.6 TRATAMIENTO TÉRMICO

El tratamiento térmico ha sido desarrollado para garantizar la seguridad contra insectos, plagas y controlar las enfermedades post-cosecha. Se ha utilizado regularmente en la maduración de las frutas y en el control de la pérdida por pudrición durante el almacenamiento. Se ha reportado la utilización de este método para controlar la aparición de la antracnosis en diferentes tipos de mangos con temperaturas entre 50-55°C (Kalra, 1995).

El cambio que produce el tratamiento hidrotérmico (inmersión en agua caliente) en la fruta ayuda a tener un buen control tanto de insectos como de enfermedades (Mitra, 1997).

1.1.4.7 USO DE OTRAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

Varias sustancias químicas han sido utilizadas para apresurar o postergar la maduración, reducir pérdidas y para mejorar o conservar el color, calidad y durabilidad de las frutas por un mayor periodo de tiempo (Kalra, 1995).

Existen algunos reportes de sustancias químicas utilizadas para la conservación de la fruta post-cosecha, como son la aplicación del ácido giberélico en forma de spray que ayuda a retardar la maduración y tratamientos con calcio que ayudan a reducir el incremento de temperatura (Mitra, 1997).

1.1.5 PROBLEMAS POST-COSECHA

El mayor daño que puede sufrir el fruto es debido a daños mecánicos, el cual se refiere a las lesiones que sufre el fruto por mal manejo durante la cosecha y el almacenamiento. Los frutos con daños mecánicos se deterioran rápidamente, ya que las áreas dañadas son susceptibles de infecciones microbianas. Entre los daños mecánicos se incluyen, entre otros: abrasiones de la piel cuando se producen cambios de color y una pérdida acelerada de agua debido al roce entre frutas o contra superficies rugosas (Khader, 2000).

Para reducir los altos porcentajes de rechazo de producto en el mercado en la planta de empaque se debe evitar el traslado de frutos con manchas de antracnosis, golpes, rasguños, deformaciones, manchas de látex, daños de insectos, pasados o faltos de maduración o peso, así como semilla negra.

1.1.6 MICROORGANISMOS EN EL MANGO

No se conoce mucho acerca de los microorganismos que se encuentran presentes en el mango; pero actualmente se han relacionado casos de gastroenteritis con el consumo de éste. El abono con sustancias de mala calidad y el riego con aguas contaminadas constituyen un factor de riesgo en el producto final, la post-recolección y la manipulación del mango debe ser extremadamente cuidadosa para evitar causar daños en la piel, que lo hacen extremadamente susceptibles a las pudriciones y al ataque de patógenos (Saúco, 1990).

Lo poco que se conoce de los microorganismos presentes en el mango lo describe O'Connor, *et al* (1995) quien realizó un estudio de cuenta de coliformes en muestras de mangos frescos, en puré y rebanados. El mayor porcentaje de los coliformes encontrados (71%) fueron identificados como *Klebsiella pneumoniae*, la siguiente especie con mayor prevalencia fue *Enterobacter cloacae* (7 cepas aisladas); otros microorganismos aislados aunque con mucha menor frecuencia (2 cepas aisladas) fueron *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter agglomerans* y *Rahnella aquatilis*.

En enero de 2000 ocurrió un brote de salmonelosis en Estados Unidos que involucraba como vehículo a mangos provenientes de Brasil. Al llevar a cabo investigaciones se encontró que los tanques utilizados para llevar a cabo el tratamiento térmico para el control de la mosca de la fruta no se encontraban tapados, de manera que los sapos y pájaros que se encontraban alrededor defecaban en el agua. Cuando los mangos eran introducidos dentro del agua fría absorbían el agua y los microorganismos patógenos que se encontraban ahí, como *Salmonella* (Ackerman, 2002).

1.2 SALMONELLA

1.2.1 ASPECTOS GENERALES

Cerca del siglo XIX, patólogos franceses documentaron la primera asociación de úlceras intestinales humanas con un agente contagioso, la cual posteriormente fue llamada fiebre tifoidea; posteriormente en Europa se aislaron y caracterizaron bacilos que resultaron responsables de la fiebre tifoidea y se desarrollaron pruebas serodiagnósticas para poder detectar el agente de la enfermedad. Durante el primer cuarto del siglo XX ocurrieron grandes avances para la detección de antígenos somáticos y flagelares de *Salmonella*, pero no fue hasta 1928 cuando por primera vez White y subsecuentemente Kauffman (1941) crean el esquema Kauffmann-White, el cual incluye mas de 2,400 serovariedades (Doyle, 2001).

Salmonella spp. pertenece a la familia Enterobacteriaceae que incluye bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, móviles a base de flagelos peritricicos (aunque existen algunas serovariedades no flagelares), quimioorganotróficos y pueden metabolizar los nutrientes tanto por vía respiratoria como fermentativa.

Salmonella es oxidasa y catalasa negativa, cataboliza la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas, crece en citrato como única fuente de carbono, generalmente produce ácido sulfhídrico, no hidroliza la urea, no utiliza el malonato de sodio, no licua la gelatina, no se desarrolla en presencia de cianuro de potasio y descarboxila la arginina, la ornitina y la lisina (Doyle, 2001). Produce ácido en el medio de tartrato de Jordan, fermenta

el ducitol, y el inositol es utilizado por numerosas cepas. No fermenta la sacarosa, la salicina, la rafinosa o la lactosa (Jay, 1992).

Son bacterias que se desarrollan en aerobiosis, pero pueden hacerlo también en condiciones de anaerobiosis. No requieren de elementos nutricionales complejos para crecer y multiplicarse; se obtiene un buen desarrollo en medios simples de cultivo con glucosa como fuente de carbono y de sales de amonio como fuente de nitrógeno.

Su temperatura óptima de desarrollo es de 37°C pero tienen márgenes muy amplios, ya que algunas pueden crecer en temperaturas elevadas (<54°C) y otras pueden tener propiedades psicrótrofas y por lo tanto la habilidad de crecer en los alimentos en almacenamiento de 2 a 4°C. El pH óptimo de crecimiento varía entre 6.5 y 7.5. Un pH inferior a 4.5 y superior a 9.5 es señalado como limitante para su desarrollo.

La actividad de agua (Aw) más baja que aún permite el desarrollo de *Salmonella* es menor o igual a 0.93. Aunque *Salmonella* sp. es generalmente inhibida en presencia de 3 a 4% NaCl, la tolerancia de la bacteria aumenta con el incremento de temperatura en el rango de 10 a 30°C (Doyle, 2001).

La presencia de ácidos tales como fórmico, acético, propiónico, butírico y otros en los alimentos, exhiben un efecto inhibitorio. La toxicidad de los ácidos orgánicos hacia la *S. Typhimurium* disminuye conforme se incrementa la longitud de la cadena; el orden de efectividad observado ha sido: ácido fórmico > acético > propiónico > butírico > ácido clorhídrico, por lo que se dice que un

aumento en la longitud de la molécula de tales sustancias naturales, se traduce en una disminución en el efecto inhibitorio (Fernández, 1981).

Los antígenos de la superficie de *Salmonella* son utilizados para su serotipificación. Estos están localizados de la siguiente manera: en la membrana externa se encuentran los antígenos somáticos (O), los antígenos flagelares (H) se encuentran extendidos fuera de la pared celular y son los responsables de la movilidad, y el polisacárido capsular, que constituye el antígeno Vi (Doyle, 2001).

El género incluye más de 2,500 serovariedades, de las cuales la mayoría pueden causar gastroenteritis (Hoit, 1994) con mayor incidencia en las épocas del año cuyas condiciones ambientales favorecen su desarrollo. Esta variación estacional se ha observado en todo el mundo, siendo mayor en los meses de julio a noviembre y se le asocia a temporadas de lluvia y calor (Poppe, 1991).

La designación de los serotipos (más de 2000) se había dado de manera incorrecta debido a que se designaban como especies. En la actualidad la nomenclatura ha cambiado; ahora es clasificada como *Salmonella enterica* e identificada por su serovariedad (por ejemplo, *Salmonella typhimurium* se convierte a *S. enterica* serovar Typhimurium). Por conveniencia, la designación de la especie (*enterica*) es generalmente eliminada y solamente se escribe como *Salmonella Typhimurium*. (IFT, 2000)

Salmonella está ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentran normalmente en el tracto intestinal de portadores animales y humanos. Estos las excretan con las heces y de este

modo puede contaminar todo el objeto con las que entren en contacto (Eley, 1992).

Las infecciones por *Salmonella* pueden tener serias complicaciones clínicas, las cuales se manifiestan de cuatro formas diferentes:

1. Portador. Es aquel que se encuentra convalciente o asintomático.
2. Fiebre tifoidea o paratifoidea. Es una enfermedad de humanos asociada con *S.typhi* y *S.paratyphi*, las cuales están perfectamente adaptadas para evitar la invasión y sobrevivencia de las células hospederas. Las manifestaciones clínicas son periodos de incubación de 7 a 28 días e incluyen anorexia, dolor de cabeza, dolor abdominal, fiebre y diarrea que pueden durar semanas, y postración; el daño provocado por la bacteria es a nivel sistémico.
3. Septicemia. Periodo febril breve o localización.
4. Gastroenteritis. Es el síndrome más común que resulta en enterocolitis, la cual aparece de 8 a 72 h después del contacto con el patógeno invasivo, los síntomas que se presentan son diarrea sin sangre, dolor abdominal, mialgia, fiebre, nauseas, vómito, postración (Doyle, 2001).

Durante mucho tiempo se creyó que la dosis infectiva era de 10⁵ bacterias por gramo de alimento para causar enfermedades, pero se ha demostrado que de 1 a 10 células pueden causar la infección (Doyle, 2001)



1.2.1.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La excesiva administración de agentes antimicrobianos en hospitales y otros centros, además de la automedicación, han contribuido significativamente a la resistencia antibacteriana a los antibióticos. Es común el uso de agentes antimicrobianos en los animales para diferentes propósitos (terapia, profilaxis y aumento del ganado) en donde los residuos son desechados al ambiente lo que conlleva al aumento de la resistencia bacteriana. Es por ello que se ha desarrollado una nueva licencia, para el uso de apramicin y quinolonas

La aparición de la serovar Typhimurium DT104 en la década de los 80's comprobó la gran resistencia que pueden llegar a desarrollar, ya que se vio que esta cepa es cinco veces mas resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclina, gentamicina, trimetoprim y fluroquinolonas.

Actualmente el uso de agentes antimicrobianos en alimentos está muy controlado, debido a que cada vez es mas frecuente el aislamiento de cepas con mayor resistencia a antibióticos a los cuales antes eran sensibles. En junio 2000, la WHO realizó un foro de los riesgos que se corren en el uso de agentes antimicrobianos en alimentos, en donde se publicaron una serie de recomendaciones para la responsabilidad del uso de los mismos (Doyle, 2001).

El interés general por llegar a un control efectivo de la salmonelosis se refleja en los numerosos estudios que constantemente se llevan a cabo para conocer la incidencia de *Salmonella* en los alimentos que se preparan, importan o

consumen en cada país. El porcentaje de contaminación que se obtiene varía con el tipo de alimento en cuestión, con las condiciones sanitarias con que se manipulan, y desde luego, con la calidad del trabajo del laboratorio desarrollado e inclusive con el número y tipo de muestras analizadas.

La salmonelosis en el hombre es una enfermedad importante transmitida por alimentos, los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas, lo que convierte a *Salmonella* en un problema grave no sólo en salud pública, sino también económico.

La salmonelosis tiene una gran importancia económica en el ámbito mundial; ha tenido repercusión dentro de la avicultura desde principio de la década de los cincuenta; causando pérdidas a la industria del pavo, pollo de engorda y huevo, ya que da lugar a brotes con alta mortalidad y morbilidad, provocando además productos finalmente contaminados, capaces de producir salmonelosis en humanos.

Actualmente, la velocidad de contaminación de la carne cruda por *Salmonella* es verdaderamente alta. Un producto no congelado, inadecuadamente cocinado o un fallo en el proceso de cocción de la carne congelada o parcialmente descongelada puede permitir la supervivencia de *Salmonella*. A temperatura ambiente, o mayor, puede ocurrir la multiplicación de estos patógenos en los alimentos cocinados. Incluso, aunque la carne normalmente se calienta lo suficiente como para destruir *Salmonella*, aún existe la posibilidad de que estos microorganismos, procedentes de la carne cruda, puedan difundirse a los productos cocinados por medio de las manos de los manipuladores, los utensilios cortantes u otros

equipos y superficies. Además los manipuladores del alimento pueden infectarse, y aquéllos que sufren diarrea pueden excretar un gran número de *Salmonella* (Board, 1988).

En los últimos años las infecciones en humanos por los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* se han incrementado en ambos lados del océano Atlántico, según datos del Centro de Vigilancia de *Salmonella* de la OMS hay un incremento en América, Europa y quizá en África. Los aislamientos de *S. Enteritidis* se han incrementado en 24 (69%) de 35 países entre 1977 y 1987, aunque la razón de este incremento global no es clara, investigaciones llevadas a cabo en diversos países sugieren que está relacionado con el consumo de huevo y aves (CDC, 1988, 1990, 1991).

En los años recientes se han relacionado las frutas y verduras como vehículos de la salmonelosis en humanos. Muchas de éstas provienen de lugares de climas tropicales y subtropicales donde no tienen las condiciones higiénicas adecuadas durante la producción, cosecha y distribución, por lo que se facilita la contaminación. La contaminación se puede dar de manera más específica por la fertilización de las cosechas con aguas sucias potencialmente contaminadas con cepas de *Salmonella* sp. resistentes a antibióticos. El riego de los campos y el lavado de la fruta con aguas contaminadas y la constante manipulación del producto por los trabajadores, lleva a que el alimento no sea seguro para su consumo (Doyle, 2001).

En 1985 en Estados Unidos se produjeron más de 16,000 casos confirmados por cultivos de gastroenteritis por *S. Typhimurium* producidos por la ingestión de leche pasteurizada de dos marcas.

Las estimaciones del número real de afectados oscilan entre 168,791 y 197,581. Este fue el brote más importante registrado en el mundo.

En Cuba en 1988 el 7.2% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) correspondió a salmonelosis. En Argentina fueron estudiados 35 brotes de ETA por *S. Enteritidis* en el periodo de 1986 hasta el 1er. Cuatrimestre de 1990, fueron afectados más de 2,500 personas. Los alimentos identificados en el 83% de los brotes contenían mayonesa casera.

En México se producen anualmente 40,000 casos de salmonelosis confirmados (Quevedo, 1990). En estudios realizados entre los 80's y 90's se encontró que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los serotipos más frecuentemente aislados en alimentos (Gutiérrez, 1994).

En mayo del 2001 se reportó un brote de salmonelosis en Estados Unidos que fue atribuido al consumo de melones mexicanos donde hubo varios enfermos y dos muertos. El serotipo encontrado fue *Salmonella* Poona (www.fda.gov).

1.2.2 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

1.2.2.1 ADHERENCIA E INVASIÓN

El establecimiento de *Salmonella* para poder causar la infección se lleva a cabo por medio de dos pasos fundamentales, primero la unión con la célula (colonización) y después la entrada a ésta. La invasión se da primero en las células epiteliales del intestino (enterocitos), después en las células M especializadas y termina

en los fragmentos de Peyer. *Salmonella* debe competir con la microflora natural situada en la pared luminal intestinal y evadir ser capturada por las secreciones de inmunoglobulina A que también se pueden encontrar presentes en las células epiteliales.

La adherencia a los enterocitos se lleva a cabo mediante la interacción de fimbrias, adhesinas, hemaglutininas y polipéptidos con las glicoproteínas receptoras de las células huésped localizadas en el microvello o glicocálix de la superficie intestinal.

En los estudios que se han realizado acerca de la estructura que forma la bacteria para poder introducirse a la célula, se ha encontrado que se desarrollan apéndices proteicos en la superficie de *Salmonella* al contacto con las células epiteliales, los cuales miden de 0.3 a 1.0 nm de largo y 60 nm de diámetro (mucho más gruesos que los flagelos). Estos apéndices son de vida corta y desaparecen con la aparición de los ruffles en la membrana y la colonización de las células epiteliales.

Los genes *inv* (invasión) de *Salmonella* spp. controlan los cambios en los enterocitos, en las células M, el flujo de Ca^{2+} y los rearrreglos del citoesqueleto en la células huésped. El citoesqueleto de las células eucariontes se encuentra organizado por redes soportadas por filamentos de actina u otros elementos de proteína que definen la polaridad basal y controlan el movimiento de los organelos intracelulares. Cuando *Salmonella* ataca el microvello del epitelio del intestino y tiene contacto intracelular se activa la producción de apéndices proteicos en su superficie, que le ayuda a adherirse a las células. Entonces se promueve el flujo luminal del calcio y se liberan proteínas de invasión (SipA, y SipC) que catalizan la polimerización de F-actina en microfilamentos y la

formación de ruffles en la membrana en el momento que la bacteria se aproxima a invadir a la célula. En ese momento otra proteína de invasión (SopE2) activa la cascada de señales de transducción relacionadas con los arreglos del citoesqueleto.

Cuando se completa la introducción de *Salmonella* en las células epiteliales la tirosina fosfatasa (SptP) lleva a cabo la reversión de los microfilamentos de actina a su estado basal y la desaparición de la membrana ruffles. En ese momento ocurre la diarrea como respuesta de los enterocitos y las células M a la invasión bacteriana. En la figura 1.2 se aprecia la manera como *Salmonella* invade la célula hospedera y la forma que utiliza para internarse en ella

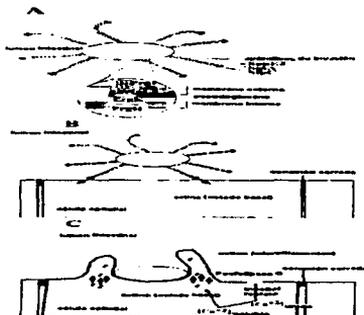


Fig. 1.2 Mecanismo de invasión de *Salmonella* en la célula huésped

A) Complejo de invasión de *Salmonella* B) Aproximación por efecto de las proteínas SipA, SipC y SopE2 para introducir los apéndices de invasión dentro del citoplasma de la célula huésped. C) Polimerización de los microfilamentos de actina con SipA y SipC y activación de las transducción de señales de la célula huésped (e.g., activación de la fosfolipasa C, flujo de Ca^{2+}) (Doyle, 2001).

1.2.2.2 CRECIMIENTO Y SOBREVIVENCIA EN LAS CÉLULAS HUÉSPED.

Una vez dentro de la célula, *Salmonella* comienza a replicarse en las vacuolas endocíticas después de 4 horas de haberse internado. Las vacuolas infectadas se mueven hacia el polo basal de la célula, donde las *Salmonellas* son puestas en libertad dentro de la lámina propia. Durante esta proliferación *Salmonella* también induce la formación de estructuras filamentosas estables en el citosol de la célula epitelial.

Para poder sobrevivir dentro de los fagocitos, las células han desarrollado diferentes estrategias incluyendo algunas como: 1)escape de los fagosomas 2)inhibición de acidificación por fagosomas 3)prevención de la fusión de los fagosomas con los lisosomas 4)resistencia al ambiente tóxico del fagolisosoma.

El *phoP/phoQ* es un regulador de dos componentes que capacita a *Salmonella* para sobrevivir en ambientes hostiles de fagocitos, como la alta acidificación dentro de los fagolisosomas, y la acción de las defensinas. Las defensinas son péptidos catiónicos específicos, pequeños que se insertan en el exterior de la membrana bacteriana, creando canales en el interior que incrementan la permeabilidad de los iones y precipitan la muerte celular. El gen *phoP/phoQ* es parte de la cascada transcripcional de activadores y represores necesarios para la expresión de genes esenciales para la sobrevivencia de la célula bacteriana dentro del macrófago. PhoQ es una quinasa que sensa los ambientes hostiles en el ambiente fagolisosomal por medio de una cadena corta de 20 a 487 de residuos de aminoácidos que se extienden dentro del espacio periplásmico de la célula de *Salmonella*.

PhoP es una proteína activadora de los genes *pag*, dentro de los que se encuentran *pagA*, *pagB*, *pagC*, *psiD* y de *pagD* a *pagP*. Algunos genes como *pag A* y *psiD* no están involucrados en la virulencia de *Salmonella*; pero otros como *pag C* codifican una proteína de membrana externa que promueve la sobrevivencia dentro del macrófago. PhoP puede expresar y reprimir diferentes genes. Los genes *pag* son expresados bajo condiciones ambientales adversas, pH bajo y fase estacionaria mientras que los genes *pgr* son reprimidos por *phoP/phoQ* y sólo se inducen bajo condiciones en las cuales no hay estrés, por lo que las condiciones que activan a los genes *pag* generalmente reprimen la expresión de los *pgr*. El operón *pgrh* (SPI1) juega un papel determinante en la exportación de las proteínas de la bacteria que son necesarias para invadir las células epiteliales. Además *pgr* ayuda a que actúen otras proteínas que son requeridas para la formación de ruffles de membrana del macrófago, incrementar la pinocitosis y la formación de fagosomas espaciosos dentro del macrófago, en los que la acidificación es lenta, lo que ayuda a la sobrevivencia de la bacteria. Solamente un número muy limitado de genes activados por *phoP* forman parte de la virulencia de *Salmonella* (Doyle, 2001).

Otro factor de virulencia de *Salmonella* son los sideróforos (regulados por el gen *fur*) los cuales recuperan el hierro del tejido hospedero para manejar las funciones celulares, como la cadena de transporte de electrones y enzimas que utilizan como cofactores el hierro. *Salmonella* spp. debe competir con el huésped por la transferrina, lactoferrina y ferritina para disponer del hierro. *Salmonella* toma el hierro trivalente y forma un complejo fierro-sideróforo con un receptor de proteína de membrana externa que induce a la respuesta de concentraciones limitantes de hierro

intracelular. El complejo entonces es transportado hacia el citoplasma de la bacteria donde el férrico es reducido a ferroso. La baja afinidad del sideróforo por el Fe^{2+} lo pone en libertad en el citoplasma de la bacteria para subsecuentemente utilizarlo en funciones metabólicas. En estudios recientes se ha visto que no sólo los sideróforos pueden adquirir el hierro de la célula huésped, ya que existe un nuevo operón regulador *fur* localizado en SPI1 (isla de patogenicidad de *Salmonella* 1) que puede competir con queladores para el hierro.

La enterotoxina diarreica es otro factor de virulencia, ya que al ser puesta en libertad dentro del citoplasma de la célula infectada se precipita la activación de la adenil ciclasa, localizada en el epitelio de la membrana celular que incrementa la concentración de AMP cíclico de la célula huésped. Esto trae como consecuencia un abundante flujo de fluido dentro del lumen por la secreción de iones Cl^{-} en la mucosa intestinal y la depresión de la absorción de Na^{2+} en el intestino. La enterotoxina de *Salmonella* es una proteína termolábil que es codificada por el gen *stx*, el cual regula la síntesis de tres proteínas de 45, 26 y 12 kDa. Además de la enterotoxina, *Salmonella* genera proteína citotóxica termolábil que puede inhibir la síntesis de proteínas y lisa la célula huésped.

Existen otros tres factores de virulencia que se pueden localizar dentro o en la superficie externa de la membrana externa de *Salmonella*. El primero de ellos es el polisacárido capsular, que constituye el antígeno Vi (virulencia) que se encuentra presente en cepas de la serovariedad Typhi y en pocas cepas de la serovariedad Paratyphi C. La presencia del antígeno Vi causa un aumento significativo en la virulencia. Los genes que se

encuentran relacionados con la formación del antígeno VI son *viaA* y *viaB*.

El papel que juega el lipopolisacárido es el de repeler el ataque lítico del complemento. Las porinas, que son proteínas de membrana externa que regulan el flujo de nutrientes, antibióticos y otras moléculas pequeñas, además de proteger contra las defensas inmunológicas se han relacionado con la virulencia (Doyle, 2001).

Actualmente se sabe que los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran dentro de islas de patogenicidad. Hasta el momento se conocen cinco diferentes islas que contienen los genes que actúan en los pasos de invasión en la célula huésped; por lo tanto, es necesario conocerlas para comprender el mecanismo de la misma.

1.2.2.3 ISLAS DE PATOGENICIDAD

Los sistemas de secreción tipo III son aparatos utilizados por las bacterias gram negativas para liberar las proteínas dentro del citosol de la célula huésped (Groisman, 2000). La isla de patogenicidad *inv* está formada por 30 genes, de los cuales muchos codifican para enzimas y para activadores transcripcionales responsables de la regulación, expresión y translocación de efectores importantes como SipA en la superficie de la célula hospedera. Otros de estos genes codifican componentes del aparato de secreción tipo III, que son componentes que están relacionados en el ensamblaje de los apéndices proteicos y la inserción de las proteínas de invasión en las células (Doyle, 2001).

La isla de patogenicidad SPI2 codifica para factores necesarios para la sobrevivencia intracelular y crecimiento en las células epiteliales y macrófagos y se encuentra designada por *Spi/Ssa*. El efector *SpiC* que produce *Salmonella* es exportado a través del sistema de secreción tipo III al citosol de la célula hospedera y ayuda a inhibir la fusión endosoma-endosoma y previene la fusión entre el fagosoma y el lisosoma.

Al caracterizar la segunda isla de patogenicidad de *Salmonella* (SP12) se han identificado genes necesarios para exportar de la membrana proteínas de fusión *SipB* (Doyle, 2001). SPI2 es expresada solamente durante el crecimiento de la bacteria en la célula huésped y no cuando *Salmonella* es cultivada en condiciones de laboratorio (Groisman, 2000).

La tercera isla de patogenicidad (SPI3) es también requerida para el crecimiento intracelular de *Salmonella* spp. dentro del macrófago. Los genes *mgtCB*, que se encuentran dentro de SPI3 son requeridos para el crecimiento bajo condiciones limitadas de magnesio y son esenciales para el crecimiento intracelular (Doyle, 2001).

En estudios recientes se han encontrado dos islas de patogenicidad adicionales en *Salmonella* y en una de ellas (SPI4) uno de los 18 genes que se requiere para la sobrevivencia dentro del macrófago (Groisman, 2000).

La última isla de patogenicidad SPI5 parece ser la responsable de la capacidad de *Salmonella* a inducir la diarrea. En SPI5 se encuentran los genes *pipABCD* y *soxB*, los cuales están

implicados en la secreción intestinal y la respuesta inflamatoria, pero no son parte esencial de la infección sistémica (Doyle, 2001).

En la figura 1.3 se puede apreciar el sitio de acción de las diferentes islas de patogenicidad de *S. enterica*.

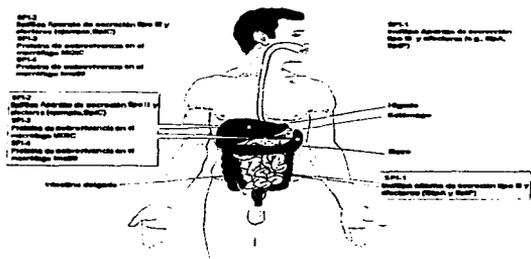


Fig. 1.3 Sitios de acción de las islas de patogenicidad de *S. enterica* (Groisman, 2000). Además de los genes *inv* y del sistema *phoP/phoQ* que codifican para la invasividad y resistencia de las condiciones antibacterianas dentro del fagocito, *Salmonella* también presenta otros genes de virulencia como son los plásmidos de virulencia (*spv*), los cuales son estructuras del DNA citoplasmático largo que replican en sincronía con cromosomas de la bacteria; estos organelos contiene genes de virulencia de tamaño entre 30 a 60 Mda y se presentan con frecuencia de una a dos copias por cromosoma. Estos plásmidos de virulencia son capaces de transportar cepas y rápidamente multiplicarlas en la célula huésped y detener los mecanismos de defensa, *Salmonella* induce la lisis del macrófago y produce la respuesta inflamatoria.

1.2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA*

La identificación de *Salmonella* se puede llevar a cabo por diversos métodos. El que se realiza de manera más frecuente es el método tradicional, el que comúnmente consta de cinco pasos. Estos incluyen: 1) pre-enriquecimiento de la muestra en caldos nutritivos, como puede ser el caldo lactosado 2) enriquecimiento en caldos selectivos como el caldo selenito-cistina y el caldo tetracionato que permiten que crezca *Salmonella*, pero reprimen el crecimiento de otras bacterias competitivas 3) El aislamiento de *Salmonella* por estria en placas de agar de medios selectivos como: agar entérico Hektoen, XLD, agar sulfito bismuto, y agar Mc Conkey 4) La caracterización bioquímica de las cepas aisladas con dos agares (TSI y LIA) y por último 5) la confirmación serológica y bioquímica de las cepas aislada. La confirmación serológica se lleva a cabo con ensayos de pruebas de aglutinación con antisueros específicos para los antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H) y antígeno capsular (Vi). (www.cfsan.fda.gov)

Se han desarrollado métodos más eficientes que el tradicional para la detección de *Salmonella* en alimentos los cuales son llamados métodos rápidos. En general hay 3 diferentes formatos; el primero puede basarse en características bioquímicas, de conductancia o de impedancia que se comercializan como kits bioquímicos y sistemas automatizados.

Otros ensayos son basados en el DNA, entre los cuales tenemos la PCR y los bacteriófagos. Entre los genes que se han utilizado para la detección de *Salmonella* en alimentos están *invA* (genes de invasión) (Rahn K. *et al.*, 1992), *Hin* (derivado de la

secuencia *hin/H2* que corresponde a genes de la fase 2 flagelar) y *H-Li* (genes flagelares) (Way *et al*, 1993), genes *rtb* (genes responsables de la biosíntesis de unidades repetidas del antígeno O del LPS) y *agfA* (genes de fimbrias) (Olsen.J.E *et al*, 1995), *fljC* y *fljB* (genes relacionados con la 2ª. fase del complejo del antígeno H) (Echeita,M.A, 1998), *hilA* (regulador transcripcional de varios genes de invasión) y *sirA* (regulador global de genes de invasión) (Guo X, *et al*, 2000).

El tercer tipo de formato se basa en la alta especificidad de la unión antígeno-anticuerpo, (especialmente los monoclonados); los cuales se dividen en 5 tipos de ensayo:

- 1) LA (aglutinación en látex)- Es aquella en la que el anticuerpo se encuentra dentro de cuentas de látex o de partículas de oro coloidal. Esta prueba resulta positiva cuando ocurre una precipitación en presencia del antígeno.
- 2) PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN- Es cuando la muestra es enriquecida en la matriz de un gel junto con el anticuerpo; la respuesta positiva se da con la formación de una línea visible de precipitación.
- 3) ELISA (ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada). Este es un ensayo que se lleva a cabo con anticuerpos. Generalmente se le denomina ensayo "sandwich" debido a que se utilizan dos anticuerpos. El primero captura el antígeno de un medio de enriquecimiento y se encuentra unido a una matriz sólida y el segundo es conjugado con la enzima y se usa para la detección.

4) INMUNOPRECIPITACIÓN O INMUNOCROMATOGRAFIA (ensayo de anticuerpos). Este es un "sandwich" de enzimas conjugadas; en donde la detección del anticuerpo es por medio de la coloración de cuentas o coloides. Se utiliza 0.1ml de alícuota de la muestra enriquecida la cual es colocada en series de cámaras, el resultado se obtiene después de 10 minutos

5) Las partículas magnéticas de anticuerpos dobles o gotas son también usadas en la tecnología separación inmunomagnética (IMS) la cual consiste en la captura de patógenos en el medio de enriquecimiento. IMS es análogo del enriquecimiento selectivo pero en lugar del usar antibióticos que pueden causar estrés en la célula, el anticuerpo es usado para capturar el antígeno, el cual es mucho más suave. Cuando se captura el antígeno puede ser plaqueado o probado en otros ensayos. (www.cfsan.fda.gov)

1.3. PCR

1.3.1 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas en biología molecular ya que es rápida, relativamente barata y simple de interpretar. La PCR repite muchas veces la síntesis del DNA en escala logarítmica y es capaz de replicar secuencias específicas de DNA en una mezcla de millones de secuencias diferentes. Por esto la misión del PCR es la amplificación infinitesimal de pequeños fragmentos de DNA y este proceso puede ser específico para una secuencia.

Todas las reacciones de PCR incluyen tres pasos principales:

1) Desnaturalización. La secuencia de DNA que será amplificada por PCR se conoce como templado, el cual generalmente es un fragmento de hebras dobles de DNA. Para que pueda actuar la Taq polimerasa y la reacción pueda comenzar es necesario primero que el templado esté desnaturalizado completamente en dos hebras sencillas. La mezcla de reacción debe ser inicialmente calentada lo suficiente para desnaturalizar hebras dobles de DNA. Éste se desnaturaliza a 94°C en un rango de 30 segundos a 1 minuto.

2) Alineación. Después de la desnaturalización la reacción se enfría rápidamente para evitar la realineación de las hebras de DNA. Al estar en tamaños suficientemente pequeños, los oligos se alinean rápidamente a las hebras sencillas de DNA, acomodándose en posiciones específicas de la secuencia del templado donde ellos actúan como primer para la Taq Polimerasa. Al hablar de "oligos" o "primer" o "cebadores", nos referimos a la formación del complejo primer-templado que dependen altamente de la temperatura. Un primer es un segmento corto de nucleótidos complementario a la sección de DNA que será amplificada en la reacción de la PCR. Los primers pueden ser específicos para una secuencia particular de nucleótidos de DNA o pueden ser "universales". Los primers universales son complementarios a secuencias de nucleótidos muy comunes en el DNA, por lo que son capaces de unirse a una gran variedad de templados de DNA.

La temperatura de alineación depende de la secuencia de los primers y de la fuerza iónica del buffer, generalmente se utilizan temperaturas entre 50 y 60°C y tiempos entre 30 segundos y 2 minutos. Al utilizar tiempos cortos de alineación se obtiene alta especificidad pero bajos rendimientos.

3). Polimerización. En este paso la enzima polimerasa incorpora nucleótidos dentro del DNA, produciendo una copia complementaria del templado en la región específica en donde los primers se alinearon. La Taq polimerasa actúa en temperaturas óptimas de 75-80°C aunque en los pasos de polimerización de los protocolos de PCR se utilizan temperaturas alrededor de 72-75°C

1.3.1.2 MECANISMOS DE AMPLIFICACIÓN

La PCR difiere de otras reacciones de síntesis de DNA en que se copia de manera repetitiva una secuencia definida y se produce una amplificación logarítmica. Esto se logra por el uso de dos primers diferentes los cuales son complementarios a las hebras del templado de DNA.

Primer ciclo. En el primer paso de polimerización se sintetiza una nueva hebra de DNA por cada primer, dando una secuencia de nucleótidos complementarios al templado original. La enzima polimerasa continuará extendiendo esta nueva hebra por la duración del paso de polimerización.

Segundo ciclo. El DNA es otra vez desnaturalizado, se alinean más primers y se crean nuevas hebras de DNA. El largo de la nueva hebra producida en este camino corresponde a la distancia entre los dos primers de PCR.

Tercer ciclo. Si la copia fue del 100% a 30 ciclos de PCR, entonces se podría dar un templado de 2^{30} , por lo que el templado de un DNA sencillo podría potencialmente ser amplificado aproximadamente a 10^9 moléculas.

En la figura 1.4 se muestra la manera que se lleva a cabo la reacción de PCR así como el mecanismo de amplificación que consta de 3 ciclos

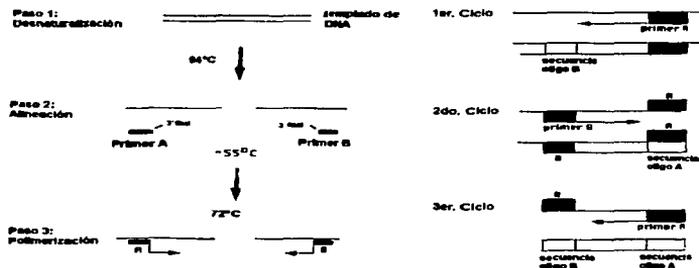


Fig. 1.4 La reacción en cadena de la polimerasa y mecanismos de amplificación (Eles, 1994).

1.3.1.3 COMPONENTES DE LA REACCIÓN

Los componentes esenciales de la PCR incluyen: el templado de DNA, dos oligos definidos que actúan como primers, y cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP'S) para la incorporación dentro de una nueva hebra de DNA, Taq polimerasa, magnesio (cofactor catiónico de la enzima) y buffer Tris con un pH y concentración de sal (la que se usa con mayor frecuencia el cloruro de potasio) apropiados.

La concentración de Mg^{2+} tiene efectos específicos en el primer. La Taq polimerasa requiere de iones libres de magnesio como cofactor, pero concentraciones altas inhiben la Taq polimerasa. La PCR podría contener entre 0.5 y 3.0 mM de magnesio.

Para la optimización de la PCR se necesitan concentraciones adecuadas de sus componentes como a continuación se señalan: concentración de dNTP'S entre 20 y 200 μ M, concentración de primers entre 100 y 500 μ M, de templado alrededor de 100ng por 50-100 μ l de reacción de la PCR y finalmente se recomienda un rango de concentración de la Taq polimerasa entre 1 y 2.5 unidades por 100 μ l de reacción ya que si ésta muy alta ocurrirá una amplificación no específica.

1.3.1.4 CONTROLES

La amplificación de PCR requiere de controles estrictos que puedan validar de manera segura el experimento; por lo que es necesario el uso de dos controles por cada corrida. El primer control es el negativo (no contiene DNA), lo que nos ayuda a confirmar que todas las soluciones y los aparatos utilizados en la reacción están libres de DNA. La contaminación de DNA aparece en los controles negativos como una banda equivalente en tamaño a la esperada entre los dos primers del templado de DNA.

El segundo control utilizado es el control positivo. Un buen control positivo en PCR no necesariamente produce una banda con alta intensidad en un gel teñido con bromuro de etidio. La amplificación debe ser consistente, debido a que este tipo de controles confirman la sensibilidad y la eficiencia de la reacción. La elección del control positivo depende de la naturaleza del material

al ser amplificado en la muestra de reacción. El control positivo podría derivarse de una de esas muestras (Eeles, 1994).

1.3.2 PCR MÚLTIPLE

Existen varios formatos de la PCR, aunque la esencia de la reacción es la misma. La PCR múltiple se lleva a cabo con dos o más series de primers funcionando simultáneamente en el mismo tubo de reacción. Por esto muchos genes pueden ser amplificados para detectar la presencia de varios genes o de múltiples microorganismos al mismo tiempo. Los pares de primers pueden ser seleccionados con estabilidades térmicas similares para que se puedan alternar las condiciones de reacción y no ocurran interacciones entre ellos (Patel, 1994).

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ◆ Identificar *Salmonella* sp. en la superficie del mango por el método de la PCR múltiple.

Objetivos particulares:

- ◆ Montar el método de la PCR múltiple para *Salmonella*.
- ◆ Implementar el método de extracción de DNA de los microorganismos presentes en la superficie del mango.
- ◆ Aplicar el método de la PCR múltiple para la detección de *Salmonella* en muestras de mango.

3. MATERIALES Y MÉTODOS
 DIAGRAMA GENERAL DE LA EXPERIMENTACIÓN

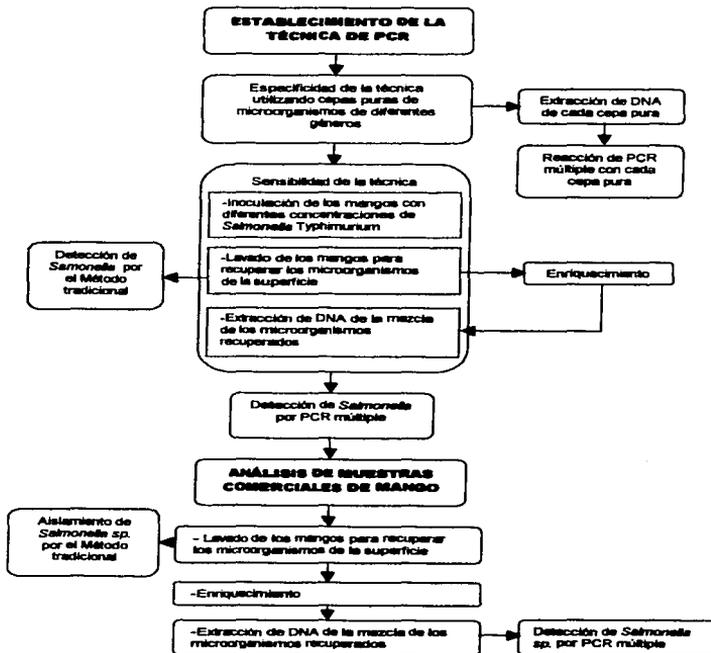


Fig.3.1 Diagrama general de la experimentación

3.1 Microorganismos utilizados

3.1.1 Microorganismo del experimento

Se utilizó *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, proporcionada por el cepario de la Facultad de Química. La cepa fue conservada en agar nutritivo a temperatura de 4 °C

3.1.2 Microorganismos utilizados para determinar la especificidad del método

En este trabajo se utilizaron 11 cepas puras proporcionadas por el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina.

3.2 Muestra

Los mangos provenían de diferentes bodegas de la Central de Abastos. Cada uno tenía un peso aproximado entre 500 g y 1 Kg

3.3 Especificidad de la técnica utilizando cepas puras de microorganismos de diferentes géneros.

3.3.1 Método de extracción de las cepas puras

La extracción del DNA de las 11 cepas puras se realizó siguiendo el procedimiento modificado de Lawson et al, 1989. Se resuspendieron las células del cultivo puro en un tubo eppendorf de 1.5 ml en el cual se agregaron 500 µl de buffer TES (0.05M tris, 0.05M NaCl, 0.005 EDTA, pH 8.0). Se adicionaron 15 µl de lisozima (10 mg/ml) (Sigma Lot. 69h7009) y se incubó a 37 °C por 30 minutos en un termostato. Se adicionaron 8 µl de Pronasa y 8 µl de Rnasa, ambos con una concentración de 10 mg/ml y se incubaron en un baño de agua Polyscience a 65 °C por una hora. Al término de este tiempo se

enfrió a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 600 μ l de una mezcla fenol/cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente con la mano. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Al terminar la centrifugación se forman tres fases. Se tomó la fase superior que es la que contiene el DNA y se pasó a otro tubo eppendorf limpio. A este tubo se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100% a -20 °C (J.T.Baker). Se agitó suavemente para mezclar el DNA con el etanol y se procedió a centrifugar (IEC Centra microcentrifuga) a 15000 rpm por 5 minutos. Se retiró el etanol por decantación y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 24 horas. Se resuspendió el pellet en 50 μ l de buffer TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0).

Se corrieron 4 μ l de la solución de DNA, 2 μ l de colorante, 2 μ l de buffer TBE en un gel de agarosa (Boehringer Mannheim) al 1% a 100 volts.

3.4 PCR

3.4.1 Condiciones de amplificación de la PCR

La secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de la PCR múltiple corresponden a: el primer par de primers, (*phoP*) se define a 299bp. El segundo par de primers es derivado de la región de 1.5Kb de la secuencia *hin/H2* de *Salmonella* Typhimurium y se define a 236pb. El tercer par de primers es *H-li*, el cual deriva de la misma región que el segundo par de primers pero su tamaño de la región que amplifica es de 173bp.



Con los DNA obtenidos de las cepas, se realizó la reacción de la PCR donde la mezcla de PCR contenía buffer 10X de reacción (50mM KCl , 10mM Tris-Cl (pH 8.3) , 1.5mM MgCl₂ , 0.01% (wt/vol) gelatina), 200 µg de dNTPs – Trifosfatos desoximucleótidos (Gibco), 2.5mM de MgCl₂ (Gibco), 50 ng de primer *phoP*, 100 ng del primer *Hin* y *H-li* (Operon Technologies), 1.25 U de Taq polimerasa (Perkin- Elmer), Templado de DNA y agua desionizada hasta un volumen final de 50 µl. La reacción de la PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones (Way *et al*, 1993); temperatura de desnaturalización a 94 °C por 2 minutos con la adición de 30 ciclos con temperatura de desnaturalización a 94 °C por 1.5 minutos, temperatura de alineación a 62 °C por 30 segundos y temperatura de extensión de 72 °C por 1.5 minutos. Al término de los ciclos las muestras son mantenidas a 72 °C por 7 minutos para completar la síntesis de todas las hebras.

Se realizaron dos tipos de controles en la reacción, el control positivo y negativo. En el control positivo se adicionó el DNA de la cepa pura (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) para confirmar que la reacción se había llevado a cabo; mientras que el control negativo contenía toda la mezcla de reacción pero sin la adición de DNA.

3.4.2 Detección de los productos de la PCR

Los productos de la PCR fueron analizados por gel de electroforesis. Diez microlitros de cada muestra, 2 µl de colorante, 2 µl de buffer de corrimiento TBE 1X fueron cargados en un gel de agarosa (Boehringer Mannheim) al 1.8% y corridos en buffer TBE 1X a 70 volts por 70 minutos (BIORAD), incluyendo marcadores de peso molecular de 100bp (Invitrogen), fragmentos de ØX174 RF DNA/*Hae*



III (Invitrogen) y 0.07-12.2 kbp (Roche). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados en Fluor-S (BIORAD).

3.5 Sensibilidad de la técnica

3.5.1 Preparación del inóculo

Se inoculó *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en 50 ml de caldo BHI (Infusión cerebro corazón) (Oxoid Lot10854353) y se incubó por 16 horas a 37 °C en una estufa felisa. Se leyó la absorbancia (espectrofotómetro Genesys a $\lambda = 540$ nm) y se determinó su concentración interpolando en una curva de DO y UFC/ml (Apéndice 1). Se colocaron 10 ml del inóculo en tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron en la centrifuga Beckman a 15000 r.p.m durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células, para lavarlas, en 10 ml de solución salina al 0.85% (cloruro de sodio Baker# 3624-01). Se resuspendió el pellet en 10 ml de solución salina al 0.85%. Se colocó 1ml del inóculo en 9ml de solución salina al 0.85% y se prepararon las diluciones que se deseaban inocular en la superficie del mango.

3.5.2 Inoculación del microorganismo

Se colocaron 100 ml del inóculo con la dilución establecida como gotas esparcidas en toda la superficie del mango que se encontraba dentro de una bolsa Ziploc. Se dejaron secar las gotas por 1 hora y media.

3.5.3. Lavado de la superficie de los mangos para recuperar los microorganismos.

Al mango inoculado (sección 3.5.2) se le agregaron 100ml de agua desionizada estéril. Se cerró la bolsa y se agitó en un vortex

Thermolyne frotando el mango simultáneamente con las manos desde el exterior de la bolsa. El líquido se filtró por un embudo con papel de filtración rápida y el filtrado se pasó por una membrana de 0.45 μ m en un equipo Millipore.

3.5.4 Método tradicional

La inoculación de los microorganismos y el lavado de los mangos se llevo a cabo como se explicó en los incisos 3.5.2. y 3.5.3 respectivamente. Se colocó la membrana de 0.45 μ m que contenía los microorganismos recuperados de la superficie del mango y se colocó en 50 ml de caldo BHI (Oxoid Lot. 10854353) y se incubó por 24 h a 37 °C. Se inocularon con 1ml de este cultivo Caldo Selenito Cistina (Oxoid Lot.216256) y Caldo Tetratronato (Oxoid Lot. 210652) y ambos se incubaron por 24 h a 37 °C. A partir de esto se sembraron en cajas de medios selectivos (Agar sulfito de Bismuto (Oxoid Lot.243425) y Agar Entérico Hektoen (Oxoid Lot. 244426) para llevar a cabo el aislamiento de la cepa, se incubaron por 24 h a 37 °C. Se tomaron las colonias con las características típicas de cepas de *Salmonella* para realizar las pruebas bioquímicas confirmativas y se inocularon por estría en los medios de agar tripe azúcar (Oxoid Lot. 243822) y agar lisina-hierro (Oxoid Lot.236866) por 24h a 37 °C.

3.5.5 Extracción de DNA de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango

El lavado de los mangos se realizó igual que en el inciso 3.5.3. Al término de la filtración, se retiró la membrana del equipo y se colocó en un tubo de centrifuga. Se congeló a -20 °C por 30 minutos. Se cortó la membrana en 4 partes y se regresaron al tubo de centrifuga; se adicionó 1ml de buffer TES y se agitó por 5 minutos en un vortex



Fisher en el número 8. Se colocó en un congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Después de ese tiempo, se transfirió a un congelador y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. El tubo se transfirió a un baño de agua y se calentó a $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Se agitó el tubo que contenía la membrana sumergida en el buffer por 30 segundos en el vortex no. 8. Se transfirió el líquido a un tubo eppendorff de 1.5 ml y se centrifugó a 15 000 rpm por 5 minutos. Se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorff y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agitó cuidadosamente con la mano y se centrifugó a 15 000rpm por 5 minutos. Se retiró el etanol por decantación y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet en 50 μl de buffer TE (Fig. 3.2).

3.6 Determinación de la presencia de inhibidores de la reacción de la PCR en el extracto de mango

Se realizó la reacción de la PCR con diferentes concentraciones de extracto de mango y de buffer TES, manteniendo constante la concentración de DNA extraído de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Tabla 3).

Tabla 3. Dilución de extracto de mango utilizado para detectar la presencia de inhibidores de la PCR

Compuestos						
Extracto de mango (μl)	20	16	12	8	4	0
Buffer TES (μl)	0	4	8	12	16	20
<i>Salmonella</i> (μl)	20	20	20	20	20	20

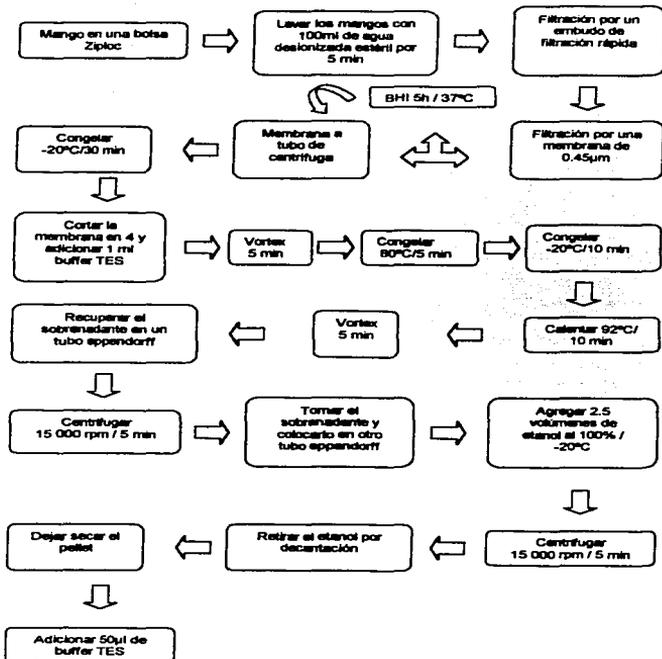


Fig.3.2 Diagrama de extracción de DNA de microorganismos en la superficie del mango

3.7 Enriquecimiento

3.7.1 Cepa pura

Se tomó 1 ml de inóculo (3.5.1) que contenía 10^2 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium, y se inocularon en cada medio que se probó: caldo lactosado (Oxoid), caldo selenito-cistina (Oxoid), caldo tetrationato (Oxoid), mezcla de caldo selenito-cistina y tetrationato y caldo BHI (Oxoid). Se incubaron por 24 h a 37 °C (estufa felisa). Se tomaron 5 ml de cada medio y se filtraron por una membrana de 0.45µm. La extracción de DNA de los microorganismos retenidos en estos filtros se llevó a cabo de acuerdo con el método presentado en la figura 3.2.

3.7.2 Microorganismos extraídos del mango

Se utilizaron dos diferentes inóculos (10^2 y 1 UFC/mango). La inoculación de los microorganismos se llevó a cabo como se explicó en el inciso 3.5.2. Se adicionaron 100 ml de agua desionizada estéril a la bolsa que contenía el mango inoculado y se lavó como el método mencionado en el punto 3.5.3. Las membranas que contenían los microorganismos del mango inoculados con 10^2 UFC/mango y 1 UFC/mango se colocaron en: 1) medio BHI (Oxoid) y se incubó a 37° C por 24 h, 2) medio BHI (Oxoid), incubó a 37 °C por 5 h, 3) mezcla de caldo selenito y tetrationato (Oxoid) incubados a 37 °C por 24 h. Al término del tiempo de incubación, se tomaron 5 ml de cada medio y se filtraron por membranas de 0.45µm. La extracción se realizó de acuerdo con la figura 3.2

3.8 Inoculación de los mangos con diferentes concentraciones de *Salmonella* Typhimurium.

3.8.1 Inóculo grande

Se colocaron 100 ml del inóculo preparado (3.5.1) con 10^5 UFC/ml como gotas esparcidas en toda la superficie del mango que se encontraba dentro de una bolsa. Se dejaron secar las gotas por 1 hora y media. Se adicionaron 100 ml de agua desionizada estéril a la bolsa que contenía el mango inoculado y se lavó como el método mencionado en el punto 3.5.3. Se realizó un control negativo de la muestra que consistió en el tratamiento del mango sin inóculo. Esto se realizó para confirmar que *Salmonella* detectada era la inoculada y no alguna que estuviera presente en el mango.

3.8.2 Inóculo pequeño

Se colocaron 100 ml del inóculo preparado (3.5.1) de 10UFC/ml como gotas esparcidas en toda la superficie del mango que se encontraba dentro de una bolsa. Se dejaron secar las gotas por 1 hora y media. Se adicionaron 100 ml de agua desionizada estéril a la bolsa que contenía el mango inoculado y se lavó como el método mencionado en el punto 3.5.3. Se realizó un control negativo de la muestra que consistió en el tratamiento del mango sin inóculo. Esto se realizó para confirmar que *Salmonella* detectada era la inoculada y no alguna que estuviera presente en el mango.

3.9 Detección de *Salmonella* en muestras comerciales de mango de diferentes regiones del país

El muestreo se realizó de acuerdo al método de la ICMSF (ICMSF, 1978) considerando al microorganismo como de riesgo moderado, directo de extensión amplia, suponiendo que las condiciones de almacenamiento del mango no cambian el riesgo (caso II); por lo que se utilizó un plan de dos fases ($n=10$, $c=0$). Esto significa que se tomaron 10 muestras y el lote no se acepta si alguna tiene *Salmonella*.

Las muestras se tomaron de 3 bodegas de la Central de Abastos (bodega 1, 2, 3) y en un mercado ambulante (bodega 4). Las bodegas 1 y 2 son del mismo dueño, mientras que la 3 y 4 pertenecen a personas distintas.

Las muestras fueron tomadas con un guante de látex de todas las partes de la caja (arriba, en medio y abajo) y fueron puestas en su bolsa correspondiente para posteriormente cerrarla.

3.10 Aislamiento de microorganismos de la superficie del mango

El aislamiento de las cepas de la superficie del mango se realizó siguiendo el método tradicional (sección 3.5.4). Las colonias aisladas se sembraron en placas de agar nutritivo (Oxoid) y después se identificaron mediante el método automatizado Vitek, utilizando las placas para bacterias Gram negativas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aunque el método utilizado para la PCR había sido previamente probado por Way *et. al.* 1993 con buenos resultados en la especificidad de los primers, se realizó la prueba de especificidad para que los primers no cruzaran con alguna otra bacteria que comúnmente presenta problemas para la identificación de *Salmonella*. Por lo tanto, lo primero que se aseguró fue la especificidad del método seleccionado.

4.1 Especificidad del método

Se confirmó que los primers *Hin* y *H-li* (236 y 173 KDa) son específicos para *Salmonella*, ya que se obtuvieron las bandas características únicamente con esta especie (Figura 4.1, Carriles 4, 5, 6, 7 y 9). Aún aquellos microorganismos que son genéticamente similares (ej. *E.coli*) no dieron una respuesta positiva en la PCR con estos primers. El primer *Phop*, (región del gen *Phop/PhoQ*, la cual regula la expresión de genes que tienen que ver con la virulencia y la sobrevivencia en macrófagos de las enterobacterias) no es específico de *Salmonella* y lo presenta la cepa *E.coli* (carril 8). *Salmonella* Enteritidis (carril 5) solo dio respuesta positiva para uno de los primers (HIN). Esto se debe a que los primers utilizados fueron seleccionados de la región H2 de *Salmonella* Typhimurium, donde *Hin* es un fragmento de la fase 2, pero presente también en la fase 1, en cambio *H-li* se encuentra localizado solamente en la fase 1 (Way *et. al.* 1993). Esta cepa pudo presentar una pérdida del antígeno H.

4.2 Extracción de DNA

De los diferentes métodos probados para la extracción de DNA de la superficie del mango, el método descrito en materiales y métodos (Figura 3) fue utilizado para la extracción del DNA, el cual se visualizó en gel de agarosa al 1% sin necesidad de enriquecimiento previo de la muestra. En la figura 4.2 se muestra el DNA obtenido del método de extracción que se utilizó en este trabajo.



Fig. 4.1. Especificidad del método. Carril 1. Marcador de peso molecular. 2-*Leuconostoc*. 3-Control negativo de la reacción. 4-Control positivo de la reacción con *S.Typhimurium* ATCC 14028. 5-*S. Entitidis*. 6-*S. Typhimurium*. 7-*S. Newport*. 8-*E. coli*. 9-*S. Typhimurium*. 10-*E. aerogenes*. 11-*P. vulgans*. 12-*C. freundii*. 13-*S. sonnei* fase II. 14-*S. aureus*. 15-*P. aeruginosa*.



Fig. 4.2 Extracción de DNA de la superficie del mango. Camiles 1. Marcador de peso molecular. 2 y 3 DNA de la superficie del mango

4.3 Inhibidores de la PCR

Cuando se usaba como templado el DNA extraído de la superficie del mango, se observó que la reacción de la PCR daba negativa aún cuando había sido inoculado con altas concentraciones de células de *Salmonella*. Se supuso entonces que existía un inhibidor de la reacción de la PCR en este extracto. Para confirmar la presencia del mismo se realizó la reacción de la PCR con diferentes diluciones del extracto. Se obtuvieron bandas únicamente a partir de la dilución 1:0.25 (4 μ l del extracto: 16 μ l de buffer TES). Esto sugiere la presencia de un inhibidor en la superficie del mango, el cual es necesario que sea diluido para evitar la inhibición de la reacción. Por lo que se decidió hacer el enriquecimiento previo de la muestra con la finalidad de diluir el inhibidor.

Se han realizado estudios de los diferentes compuestos presentes en los alimentos que inhiben la reacción de la PCR. Ian en 1997 realizó una revisión sobre los diferentes compuestos

presentes en los alimentos que inhiben la reacción de la PCR. Entre los que se conocen se encuentran las proteínas desnaturalizadas presentes en los quesos, los polisacáridos y el glucógeno de la carne de ostra, así como también algunos compuestos orgánicos. Las termonucleasas, proteínas, y el Ca^{2+} de la leche inhiben la reacción de la PCR. No existen reportes sobre la presencia de inhibidores en el mango, pero cuando se requiere apresurar la maduración de los mangos se rocían con fosfato de calcio, por lo que éste podría ser el compuesto que inhibe la reacción. Cuando se cortan los mangos se libera látex en el sitio de corte y éste puede depositarse en la superficie, por lo que éste podría ser otra sustancia inhibidora.

Las ventajas de llevar a cabo un enriquecimiento previo son, además de la dilución de inhibidores, recuperar células dañadas, encontrar con mayor certeza bajos números de células y disminuir riesgos de amplificación de células muertas. En la figura 4.3, carril 6 se observa claramente que se requiere una dilución mínima de 4 veces del extracto para que la reacción no fuera inhibida.



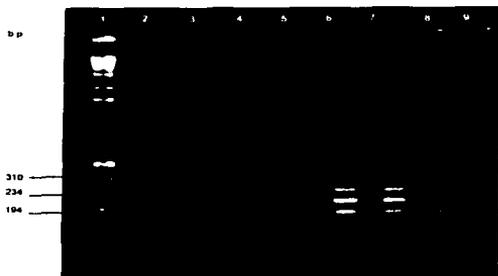


Fig.4.3. Reacción de la PCR con diferentes diluciones del extracto del mango con buffer TES. Carriles 1. Marcador de peso molecular. 2. Extracto sin diluir. 3. Dilución 1:4. 4. Dilución 1:1.5. 5. Dilución 1:0.5. 6. Dilución 1:0.25. 7. Muestra sin extracto. 8. Control positivo de la reacción. 9. Control negativo de la reacción.

4.4 Selección del medio de enriquecimiento.

No se detectaron diferencias significativas en la respuesta de la PCR al usar los medios caldo lactosado, caldo selenito-cistina, caldo tetratronato y caldo BHI (Fig.4.4). Se eligió el medio de BHI, ya que con el que se han reportado resultados satisfactorios en la literatura (Xuo *et. al.* 2000).

Se repitió el experimento inoculando los medios con extractos de la superficie del mango inoculado con diferentes concentraciones de *Salmonella Typhimurium*. En este caso las bandas obtenidas en la PCR algunas veces no eran muy claras y otras eran muy débiles (Fig. 4.5). Cuando se inocularon los mangos con 10^2 UFC/ml, se obtuvieron bandas más intensas a las 5h que a las 24h de incubación en medio BHI (carriles 4 y 5).

Es posible que un enriquecimiento rápido incrementa la concentración inicial de *Salmonella* sp. a concentraciones detectables (Knusston *et. al* 2002). Sin embargo, si se incuban un tiempo mayor *Salmonella* puede ser inhibida por la microbiota acompañante. La influencia de la microbiota natural en la respuesta de la PCR se observa claramente comparando la figura 4.4 con la 4.5. En la primera figura, la reacción de las bandas fue más fuerte, esto es cuando se inocula directamente el medio con la cepa y no con un extracto que contiene otros microorganismos (Fig.4.5). El enriquecimiento en BHI durante un tiempo menor (6 y 9 horas) dió buenos resultados en la detección de *Salmonella* Montevideo en superficie de tomates (Guo *et. al*.2000).

La influencia de la microbiota natural presente en una muestra en donde se busca un microorganismo específico fue estudiado por Knutsson *et al.* 2002 quienes observaron que la microbiota natural de la muestra de trabajo influye de manera negativa cuando se encuentra en mayor concentración con respecto al microorganismo buscado. Esto se refleja con respuestas débiles en la reacción de la PCR. En presencia de 10^6 UFC/ml de microbiota natural, la respuesta en la reacción es negativa.

Se observaron reacciones débiles con los caldos selenitocistina y tetracionato. Es posible que alguno de sus ingredientes inhiba la reacción de la PCR, y no que se trate de ausencia de microorganismos; ya que en el experimento previo (Fig.4.4) se confirmó que la cepa utilizada crecía bien en ambos medios. En la figura 4.5 se observa que el medio de enriquecimiento que muestra mejor respuesta y resolución de las bandas es el medio BHI con 5 horas de incubación.

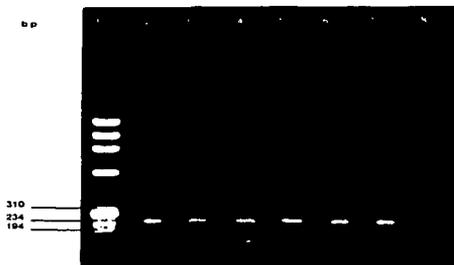


Fig. 4.4 Reacción de la PCR a partir de medios de enriquecimiento inoculados con *Salmonella Typhimurium*, después de 24h de incubación a 37°C. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2 Enriquecimiento en caldo lactosado. 3 Enriquecimiento el caldo selenito-cistina. 4 Enriquecimiento en Tetratonato. 5 Mezcla de selenito-cistina y tetratonato. 6 Caldo BHI. 7 Control positivo de la reacción. 8 Control negativo de la reacción.



Fig.4.5 Reacción de la PCR a partir de medios de enriquecimiento inoculados con *Salmonella Typhimurium* extraída de la superficie del mango, con diferentes horas de incubación a 37°C. Carriles 1. Marcador de peso molecular. 2 y 3 BHI con 24h de enriquecimiento con un inóculo de 10^7 UFC/mango. 4 y 5 BHI con 5h de enriquecimiento con un inóculo de 10^7 UFC/mango. 6 y 7 caldo selenito y tetratonato con inóculo de 10^7 UFC/mango. 8 BHI con 5h con inóculo de 1UFC/mango de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. 9 BHI con 24h de incubación con 1UFC/mango. 10. caldo selenito-cistina con 1UFC/mango. 11 Control positivo de la reacción. 12 Control negativo de la reacción.

4.5 Sensibilidad del método

Para determinar la sensibilidad se realizó la técnica con mangos inoculados con diferentes concentraciones de *Salmonella* Typhimurium y se compararon los resultados con los obtenidos con el método tradicional (Tabla 4). Al inocular la superficie de los mangos con 10^4 UFC/mango, se observó que los diez mangos dieron respuesta positiva tanto en la reacción de la PCR, como con el método tradicional; en el cual se recuperó *Salmonella* de todos los mangos inoculados. Por lo tanto, con esta concentración no hay ninguna diferencia en cuanto a la sensibilidad de ambos métodos (Fig.4.6). En cambio, al inocular la superficie de los mangos con un inóculo menor (1 UFC/mango), se observó una respuesta positiva en los diez mangos inoculados, a diferencia del método tradicional, con el que sólo se pudo recuperar la cepa en uno de los mangos. Éstos confirman la alta sensibilidad del método de la PCR con respecto al método tradicional (Tabla 4). El poder aislar *Salmonella* solamente de uno de los diez mangos trabajados, significa que la utilización del método tradicional (empleado normalmente) casi nunca detecta células de *Salmonella* presentes en baja concentración. En cambio la técnica propuesta de la PCR donde se detectan 1 UFC/mango después de un enriquecimiento de 5 horas a 37°C (Fig.4.7).

La sensibilidad del método es buena comparada con las reportadas en la literatura. Xuan *et. al.* 2000 obtuvieron una sensibilidad de 10^2 UFC/g después de un enriquecimiento de 6 h a 37°C en tomates inoculados artificialmente en la superficie con *S. Montevideo* en comparación con la empleada en este trabajo, que requiere de una hora menos y la sensibilidad es mayor.

Tabla 4. Comparación del método tradicional con la PCR en las muestras de mango inoculadas con 10^8 UFC/mango y 1 UFC/mango

Inóculo (UFC/ml)	Respuestas positivas con el método tradicional	Respuestas positivas con el método de PCR
10^8	10	10
1	1	10



Fig. 4.6. Sensibilidad del método al utilizar mangos inoculados con 10^8 UFC/ml. Carriles 1. Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mangos inoculados en la superficie del mango con 10^8 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. 12 control negativo del método. 13 control positivo de la reacción. 14 control negativo de la reacción

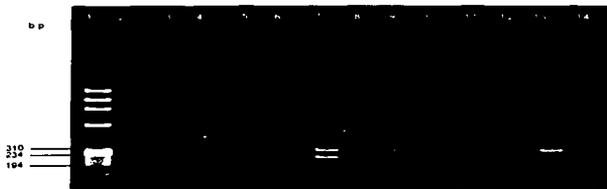


Fig. 4.7 Sensibilidad del método al utilizar mangos inoculados con 1 UFC/ml. Carriles 1. Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mangos inoculados en la superficie del mango con 1 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. 12 control negativo del método. 13 control positivo de la reacción. 14 control negativo de la reacción.

4.6 Detección de *Salmonella* en muestras de mango de diferentes regiones del país

4.6.1 Sinaloa

En la figura 4.8 se observan dos respuestas positivas de la reacción de la PCR (carril 4 y 5), 4 respuestas débiles (6, 7, 9, 10) y 4 respuestas negativas (2,3, 8,11). Los resultados obtenidos indican entonces la presencia de *Salmonella* en la superficie de 6 de los 10 mangos analizados. La posible causa de las respuestas débiles es la interferencia por la microbiota acompañante. Si la concentración de la microbiota es alta y la de las células de *Salmonella* sp. es considerablemente baja, la respuesta va a ser débil, pero visible. Knutsson *et, al.* 2002, observaron variabilidad en la intensidad de las bandas de la reacción de la PCR cuando se inocularon concentraciones diferentes de la microbiota natural de su muestra y diferentes concentraciones de *Yersinia enterocolitica*. Concluyeron que al aumentar la concentración de la microbiota natural de la muestra, la respuesta en la reacción de la PCR disminuye de intensidad, por lo que si hay pocas células del microorganismo buscado es necesario que la presencia de la microbiota natural no sea mayor a 10^6 UFC/ml para evitar interferencia en la detección del microorganismos en la muestra. Por lo tanto, al no poder controlar la concentración de microbiota natural presente en la muestra, se debe tomar como positiva una respuesta débil.

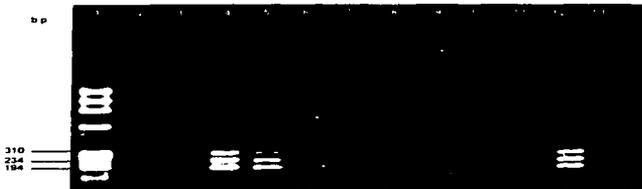


Fig.4.8 Presencia de *Salmonella sp.* en muestras de mango del estado de Sinaloa. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.

4.6.2 Oaxaca

En la Fig. 4.9 se observa una respuesta débil en el carril 8 y nueve respuestas negativas de las diez analizadas. Por lo que se confirma la presencia de *Salmonella sp.* en una muestra.

4.6.3 Veracruz

En el caso de las muestras de Veracruz (Fig. 4.10) se observan 7 respuestas débiles (carril 3, 4, 6-10) y 3 respuestas negativas (carril 2, 5 y 6) de las diez muestras analizadas. Como se mencionó anteriormente, las respuestas débiles se pueden deber a una alta concentración de la microbiota natural. Cabe mencionar que este tipo de respuestas no se pueden tomar como negativas, debido a que una clara respuesta negativa representa la inexistencia de bandas. Por lo que aunque la respuesta sea débil es definitiva.

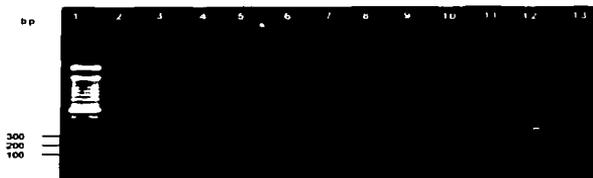


Fig.4.9 Presencia de *Salmonella* sp. en muestras de mango del estado de Oaxaca. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.



Fig.4.10 Presencia de *Salmonella* sp. en muestras de mango del estado de Veracruz. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.



Fig.4.9 Presencia de *Salmonella* sp. en muestras de mango del estado de Oaxaca. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.



Fig.4.10 Presencia de *Salmonella* sp. en muestras de mango del estado de Veracruz. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.

4.6.4 Poza Rica, Ver.

En el caso del muestreo de Poza Rica, Veracruz, no se observó ninguna reacción positiva en las 10 muestras analizadas,



Fig. 4.11 Presencia de *Salmonella* sp. en muestras de mango del estado de Poza Rica, Ver. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2-11 muestras de mango. 12 control positivo de la reacción. 13 control negativo de la reacción.

4.6.5 Guerrero

El caso de Guerrero es muy similar al de Poza Rica, ya que también de las diez muestras analizadas, no hubo respuestas positivas a la reacción de la PCR, por lo que no hay presencia de *Salmonella* en ambos lotes analizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 4.12 Presencia de *Salmonella sp.* en muestras de mango del estado de Guerrero. Carriles 1 Marcador de peso molecular; 2-11 muestras de mango. 12 control negativo de la reacción. 13 control positivo de la reacción.

En 3 de los 5 lotes analizados se detectó *Salmonella sp.* En total fueron 14 de los 50 mangos que resultaron positivos a la presencia de *Salmonella sp.* (Tabla 4.1). Los tres lotes donde se detectó *Salmonella sp.* provenían del mismo proveedor aunque uno de ellos era de diferente bodega de la Central de Abastos, a diferencia de los otros dos que provenían de lugares diferentes. Es posible que la fuente de inóculo de estos mangos provenga de humanos, ya que los 3 lotes son del mismo productor. Éste tiene diferentes huertas pero las mismas personas recolectan el fruto en las diferentes huertas. Para conocer la fuente de contaminación es necesario observar el método de recolección, para llevar a cabo un muestreo de los mangos desde que se cortan de los árboles hasta que llegan a la bodega, así como analizar las posibles fuentes de contaminación.

El único reporte que existe acerca de la presencia de *Salmonella sp.* en mangos fue realizada con pulpas de mango por Acharya *et. al.* 1999 quienes investigaron la presencia de *Salmonella sp.* en pulpas de mango enlatado y sin enlatar. Observaron que *Salmonella sp.* no estaba presente en ninguna de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

las muestras enlatadas, a diferencia de las muestras de pulpa sin enlatar, en los que se recuperó de las 5 muestras analizadas.

De acuerdo con el plan de muestreo ($n=10$, $c=0$) solo serían aceptable los lotes de Poza Rica y Guerrero.

Tabla 4.1 Resultado del muestreo realizado en diferentes regiones del país.

Estado	Fuente	Respuesta fuerte	Respuesta débil	Respuesta negativa
Sinaloa	Central de abastos bodega 1*	2	4	4
Oaxaca	Central de abastos bodega 1*	0	1	9
Veracruz	Central de abastos bodega 2*	0	7	3
Poza Rica, Ver.	Mercado ambulante bodega 3	0	0	10
Guerrero	Central de abastos bodega 4	0	0	10

* La bodega 1 y 2 son del mismo proveedor.

4.6 Aislamiento de la cepa

Se utilizó el método tradicional para aislar las cepas de *Salmonella* que dieron respuestas positivas en la PCR; sin embargo, ésta no se recuperó en ningún caso. Se aislaron microorganismos de los cultivos de enriquecimiento para identificarlos y corroborar que no dieran una reacción positiva en la PCR. Se aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* cpx, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Serratia fonticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter amalonaticus* y con ninguna se obtuvo una respuesta positiva a la reacción de la PCR (figura 4.9). La mayoría de las cepas aisladas coinciden con las reportadas por O'Connor-Shaw *et. al.* (1995) por lo que las cepas aisladas forman parte de los microorganismos predominantes o mas recurrentes y resistentes en el mango.

Aunque se demostró la presencia de *Salmonella* sp. en la superficie del mango debido a las respuestas positivas que se obtuvieron en la reacción de la PCR, no se pudo recuperar. Esto se puede deber a varias razones; una de ellas, es que hubieran producido colonias atípicas. Esto, aunado al hecho de que se encuentran en bajas concentraciones, la probabilidad 1:10 de recuperarla es baja. Hablamos de esta probabilidad por los resultados obtenidos en la comparación entre la reacción de la PCR y el método tradicional. En bajas concentraciones (1 UFC/mango), por el método tradicional *Salmonella* Typhimurium se aisló solamente de uno de los diez mangos trabajados, a diferencia de la técnica de PCR mediante la cual se detectó en las diez muestras (Fig. 4.7). Por lo tanto, la probabilidad 1:10 se refiere a que se puede detectar una vez por el método tradicional contra 10 veces por la PCR (Tabla 4).

Es conveniente probar otros medios selectivos que ayuden a identificar las colonias de manera más clara. Cabe la posibilidad de que las células estuvieran muertas (aunque este riesgo disminuye significativamente con el enriquecimiento) o que hayan entrado en un estado viable-no cultivable (*Salmonella* estado VNC) debido al estrés que les representa permanecer en la superficie del mango, por lo que para poder aislarlas será necesario el empleo de otros métodos. Se han realizado estudios que demuestran que *Salmonella* entra en un estado viable-no cultivable (VNC). Tal es el caso de Turpin *et. al.* 1997, quienes observaron que en muestras de suelo no se aisló *Salmonella* en medios sólidos, pero si por sus métodos seleccionados (ELISA y anticuerpos fluorescentes). Mediante el método de anticuerpos fluorescentes los investigadores (Turpin *et. al.* 1997) pudieron constatar que las células de *Salmonella* se convierten con el tiempo en pequeñas y redondas, pero son capaces de mantener su integridad celular por extensos periodos de tiempo (65 días) en un ambiente hostil. La rápida disminución de las cuentas de *Salmonella* les sugirió la presencia de un estado VNC, que confirmaron con la disminución del número de células muertas visibles en U.V después de la inoculación en el suelo. Marsh *et. al.* 1998 demostraron que al pasar el tiempo, células de *Salmonella* inoculadas en suelo, disminuyen significativamente en la cuenta en placa; mientras que por la QPCR (método de la PCR cuantitativo) el número de células no cambian, aunque se vuelven más difíciles a la lisis celular. Para confirmar que las células estaban vivas utilizaron un método de cuenta directa de la actividad celular usando la sensibilidad a la respiración con 5-ciano-2,3-ditolil cloruro de tetrazolio (CTC). Por lo tanto, esto demostró que *Salmonella* estaba viva y que había entrado en un estado viable-no cultivable

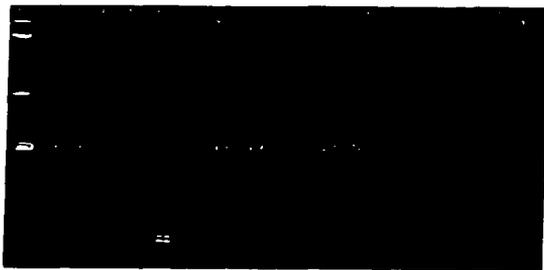


Fig. 4.13 Reacción de PCR con cepas aisladas de la superficie del mango. Carriles 1 Marcador de peso molecular. 2- 5 *Klebsiella pneumoniae*. 7 *Citreus caryocarpus*. 8-13 *E. cloacas*. 14-17 *Ps.aeruginosa*. 18 *Ser.fonticola*. 19 *E. aerogenes*. 20,22-24 *Cit.amalonaticus*. 21 Marcador de peso molecular. 25 Control positivo de la reacción. 26 Control negativo de la reacción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

Se montó un método de la PCR para la detección de *Salmonella* en la superficie del mango.

- ▲ El método es específico, ya que los primers son selectivos *HIN* y *H-LI* son selectivos para *Salmonella* y no cruzan con otras enterobacterias.
- ▲ La sensibilidad del método de la PCR es de 1 célula de *Salmonella* después de 5 horas de enriquecimiento en caldo BHI.
- ▲ Con la técnica montada se logró la detección específica de *Salmonella* sp. en 12 horas, a diferencia de la técnica tradicional para la que se requieren 5 días.
- ▲ Se detectó *Salmonella* en la superficie del mango de diferentes regiones del país; solamente dos lotes son aceptados. Por lo tanto, debido a que *Salmonella* implica un riesgo, el mango se considera como un riesgo de salud pública
- ▲ No fue posible aislar las cepas de *Salmonella* después de 5 horas de enriquecimiento, por lo que será necesario determinar si estaban muertas o en VNC

RECOMENDACIONES

- ▲ Es necesario llevar a cabo pruebas para conocer el posible inhibidor del extracto del mango.
- ▲ Es necesario usar técnicas como la del anaranjado de acridina o la del ácido nalidixico para determinar si las células presentes estaban en estado viable no cultivable o si no se pudieron aislar por otros motivos.

APÉNDICE 1

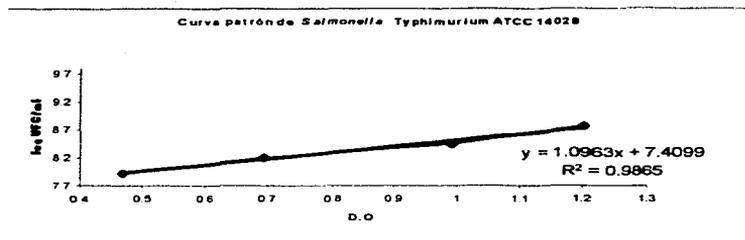


Fig. 4.14 Curva patrón de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028

APÉNDICE 2. SOLUCIONES

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

I. Solución Tris 0.5 M

Peso molecular tris= 121.1g/mol

Se necesita adicionar HCl concentrado para tener un pH de 7.0

II. Solución EDTA 0.5 M

Se disuelven 186.1g de EDTA a 800 ml de agua, se agita vigorosamente. Se ajusta el pH=8.0 para que el EDTA se pueda disolver.

III .Solución NaCl 5M

Peso molecular NaCl=58 g/mol

III. Buffer TBE 5X

TRis-borato

*54g Tris base

*27.5g ácido bórico

*20ml de EDTA 0.5M (p.H 8.0)

BIBLIOGRAFÍA

- ♣ Acharya M.R.; Shan R.K., (1999) Some microbiological and chemical attributes of mango pulp samples. *Food Science and Technology-India* 36(4), 339-341
- ♣ Ackerman, J. (2002) Food: How safe? How Altered? *National Geographic*. Mayo, p.p.20-21
- ♣ Bacteriological Analytical Manual (2001)
www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-ai.html
- ♣ Board, J. (1988). Introducción a la microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. Págs 214-220.
- ♣ California Rare Fruit Grower Inc. (CRFG) (1996) Mango *Mangifera indica* L. *Anacardiaceae* En.
<http://www.crfg.org/pubs/ff/mango.html>
- ♣ CDC. UPDATE. (1988) *Salmonella* Enteritidis infections and grades A shell eggs. *MMWR*; 37: 490,495-496
- ♣ CDC. (1990) Outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections and grade A shell eggs-United States, 1989, *MMWR* 38: 887-880.
- ♣ CDC. (1992) Outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections associated with consumption of raw shell eggs 1991 *MMWR*; 41: 369-372.

- ♣ Control de la salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Informe de un comité de expertos de la OMS.- Serie de informes Técnicos 774

- ♣ Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., (2001). Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. ASM Press. 2nd edition. Washington, D.C. Pp.141-178

- ♣ Echeita M.A. and Usera, M.A. (1998) Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". Research in Microbiology 149 (10), 757-761

- ♣ Eeles R.A, Stamus A.C., (1994). Polymerase chain reaction (PCR): The technique and Its Applications. R.G. Landes Company. Austin. Pp.4-25

- ♣ Eley R. (1992) Intoxicaciones alimentarias de Etiología microbiana., Editorial Acribia. España p.8-10,154

- ♣ Fernández Escartín F. (1981). Microbiología Sanitaria. Universidad de Guadalajara, México. Vol.I. Capítulo 17.

- ♣ Griosman, E.A; Ochman H. (2000) The Path to *Salmonella* . ASM News 66 (1), 21-26

- ♣ Hoit J.F., Krieg R.N., Sneath H.A., Stanley T., Williams & Wilkins (1994) Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Ninth edition. 186-187.

♣ Ian G. (1997) MINIREVIEW. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied and Environmental Microbiology 63 (10), 3741-3751

♣ Ibar L. (1979) "Aguacate, Chirimoyo, Mango, Papaya", Editorial Aedos. Barcelona. Pág. 145-150

♣ ICMSF (1978) Microorganisms in Food 2: Sampling for Microbiological Analysis: principles and specific. Applications University of Toronto, Canadá.

♣ IFT (2000). Emerging Microbiological Food Safety Issues implications for control in the 21st Century.

♣ Jay M. (1992). Microbiología de los alimentos. Editorial Acriba .3ª.edición. España. p.651-658

♣ Johnson, G. I. ; Coates, L.M (1993) Postharvest disease of mango. Postharvest News and information

♣ Kalra S.k. Tandon D.K., Singh B.P (1995) Mango. In: Salunkhe D.K., Kadamss. Handbooks of fruit Science and Technology. Marcel Pekter, New York Pp. 123-146

♣ Khader S. (2000). Indicadores Básicos del Manejo Post-cosecha de Mango: Recomendaciones para Mantener la calidad Pocoscha. En: Postharvest Technology Research and Information Center. Department of Pomology. University of California

En <http://www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/espanol/Mango.html>

- ♣ Knutsson R.; Blixt Y.; Grage H.; et al (2002). Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology* 73, 35-46
- ♣ Lawson, *et al.* (1989). *FEMS Microbiol. Letts.* 113:87-92
- ♣ Marsh P.; Morris NZ.; Wellington E. (1998). Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. *FEMS Microbiology Ecology* 27,351-363
- ♣ Mitchell G.E.; McLauchlan R.L.; Isaacs A.R (1992). Effect of low dose irradiation on composition of tropical fruits and vegetables. *J. Food Composition and Analysis* 5, 291-311
- ♣ Mitra S.K. (1997) *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. CAB International, UK, USA Pp 85-110
- ♣ Morton J. (1987). Mango *Mangifera indica* L. En: Morton, J. *Fruits of warm climates*. Miami, FL. En: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/mango-ars.htm>
- ♣ Mora M.J. (1997). Mango. *Manual de Recomendaciones de la dirección Regional Pacífico Central de MAG/DIA (Sistema Institucional de Investigaciones Agropecuaria de Costa Rica)* Ed. Esparza. En: <http://www.mag.go.cr/info1e.htm>
- ♣ O'Connor-Shaw R.E., Guthrie, J.A.; Dunlop, K.J.; (1995) . Coliforms in processed mango: Significance and control. *International Journal of Food Microbiology* 25,51-61



- ♣ Olsen J.E., Aabo S., Hill W., Notermans S., Wemars K., Granum P.E., Popovic T., Rasmussen H.N., Olsvik O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 28, 1-78
- ♣ Patel P. (1994). *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Blackie Academic & Professional of Chapman & Hall.
- ♣ Pathak V.N. (1980). *Diseases of Fruit Crops*. Oxford & IBH Publishing Company. New Delhi. India
www.scisoc.org/resource/common/names/mango.htm
- ♣ Pernezny K.; Simon G.W (2000). *Diseases of Mango (Mangifera indica L.)* en: *Committee on Standardization of Common Names for Plants Diseases of the American Phytopathological Society* (eds). *Common Names of Plants Diseases*. APS Press.
<http://www.scisoc.org/resource/common/names/mango.htm>
- ♣ Poppe C., R.J. Irwin C.M. Fosberg, Clarke & Ogge J. (1991) *The prevalence of Salmonella Enteritidis and other Salmonella spp among Canadian registered commercial layer flock*. *Epidemiol Infect* 106:259-270
- ♣ Prusky D., Keen N.T. (1993) *Involvement of performed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay*. *Plant Disease* 77 (2), 114-119
- ♣ Quevedo F. (1990) *Actualización de enfermedades transmitidas por alimentos*. OPS.

- ♣ Rahn K., De Grandis S.A, Clarke, R.C Mc Ewen, S.A., Galán J.E., Ginocchio C., Curtiss R., and Gyles C.L. (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6, 271-279
- ♣ Research and Development New of the Horticultural Resource Australia. Mangos in India: Diseases. En: <http://www.raiana.com/mango-india2.htm>
- ♣ Research and Development New of de Horticultural Resources Australia. Mango cultivars. En: <http://www.raiana.com/cultivars.htm>
- ♣ SAGARPA Y PROEXIN (Programa de Promoción de la Exportaciones Agropecuarias de la Alianza del campo). (2000), Propuestas de Estrategia para el Desarrollo Comercial de la Industria del Mango de Exportación. En: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- ♣ Saúco Galán V. (1990) "Los frutales tropicales en los subtrópicos I. Aguacate-mango-Litchi y Longan", Ediciones Mundt-Prensa. Madrid. Pág. 59-88
- ♣ Turpin P.E.; Maycroft, K.A. Rowlands, C.L. Wellington, E.M. (1993) Viable but non-culturable salmonellas in soil. *Journal Applied of Bacteriology* 74 (4), 421-427

◆ Way J., Josephson K.L., Pillai S.D., *et al* (1993) Specific detection of *Salmonella* spp. By multiplex polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (5), 1473-1479

◆ www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango.htm

◆ Xuan G.; Chen J.; Beuchat L.; Brackett R. (2000) PCR Detection of *Salmonella enterica* Serotipo Montevideo in and on Raw Tomatoes using primers derived from *hliA*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12), 5248-5252



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA