



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

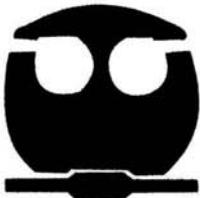
**TESIS**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO EN LA INCIDENCIA  
DE Salmonella sp EN LA SUPERFICIE DEL MANGO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**JORGE ALEJANDRO VÉLEZ SOTRES**



**MÉXICO, D.F.**

**2004**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

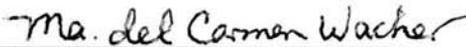
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

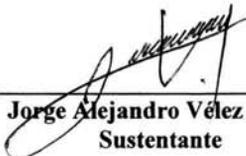
**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	Prof. Maria del Carmen Wacher Rodarte
<b>Vocal</b>	Prof. Maria Guadalupe Tsuzuki Reyes
<b>Secretario</b>	Prof. Marco Antonio León Félix
<b>1er Suplente</b>	Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López
<b>2do suplente</b>	Prof. Luciano Hernández Gómez.

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 324 Edificio E Facultad de Química, UNAM. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Y el Laboratorio de Microbiología Ambiental 3er piso, edificio de Investigación de Medicina.

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ma. Del Carmen Wacher Rodarte**  
Asesora

  
\_\_\_\_\_  
**Jorge Alejandro Vélez Sotres**  
Sustentante

**"La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es mas comunicable"**

**Leonardo Da Vinci**

**"El caos es un orden por descifrar"**

**Libro de los contrarios**

**"Las pequeñas causas tienen grandes consecuencias"**

**José Saramago**



### Agradecimientos:

A mis papas: Por darme todo el apoyo en todo momento dándome pie para llegar hasta aquí. Y ser lo que hoy en día me he forjado ser.

A mi hermano Carlos: Ya que de él aprendí que nunca hay que conformarse con las cosas pequeñas sino a ir más allá, también por enseñarme lo que es la lucha constante y la templanza.

A mi hermana Nadxieli: De ella he aprendido que a pesar de los malos momentos, todo lo que deseas lo puedes alcanzar, también por enseñarme lo que es ser diferente, pensativo y crítico de lo que sucede en la vida y en cada momento. Además de que las cosas profundas no las encuentras en el fondo de un hoyo sino en las demás personas y los legados que han dejado y nos van dejando momento a momento.

A Octavio: Porque de él aprendí lo que es un verdadero amigo incondicional, en todo momento, en las buenas y en las malas, a pesar de la distancia, del tiempo, a pesar de todo sigues y seguirás allí en todo momento por eso y más gracias.

A la Dra. Carmen Wachter por ser mi asesora, por esa confianza que deposito en mi, porque siempre estaba allí para ayudarme, y darme consejos.

A la Dra. Gloria Díaz por esos buenos consejos, su siempre alegre compañía y porque de ella aprendí a querer lo que haces y no solo hacerlo sin sentirlo.

Al Dr. Carlos Eslava Campos por el apoyo para la realización de esta tesis, por facilitarnos el uso del equipo Vitek®, así como por sus valiosos consejos.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Microbiología Ambiental del edificio de posgrado de la facultad de medicina, por el apoyo a la realización de esta tesis, en la realización de la identificación de cepas con el equipo Vitek® y la serología de *Escherichia coli*. En especial a: Eva Salinas Cortez, Leticia Martínez Romero y a Armando Navarro Ocaña.



A la Dra. Andrea Trejo y su equipo de trabajo por proporcionarnos los mangos de trabajo con los tratamientos térmicos alternativos, así como el equipo y mangos para el tratamiento hidrotérmico.

A M en C. Susana Ibarra por el trabajo en equipo para el estudio del tratamiento hidrotérmico con los mangos inoculados, así como por sus valiosos consejos.

A Alicia, Claudia, Mariana, Sandra, Leonardo, Tania por su gran amistad, por ese ambiente tan característico del laboratorio, por las largas pláticas, los consejos, pero sobre todo por ser únicos y su personalidad que los caracteriza, porque de cada uno he aprendido mucho.

A Raúl, Dora, Sonia, Efraín, Rocío, Francia, Fernanda, Gaby, Joana, por su amistad, compañía, por hacer de la vida de la facultad todo una excelente experiencia con risas, tristezas, enojos, y horas y horas de estancia en esta nuestra facultad, nuestra casa. También por aquellos recuerdos que quedaran plasmados en las enormes paredes de la facultad de química.

A la profesora Maria Guadalupe Tsuzuki Reyes por su comentarios en la corrección de esta tesis así como por su disponibilidad.

Al profesor Marco Antonio Félix por sus comentarios en la corrección de esta tesis.

A la Facultad de Química por darme los conocimientos, las vivencias, las largas horas de estudio y desvelo, que han hecho de mi una persona integral. Por ser mi ser mi segunda casa si no es que la primera y convertir a mi verdadera casa en un Hotel donde solo llegaba a dormir.

A Dios: porque a pesar de tantas dudas, porque a pesar de las buenas y las malas, porque a pesar de no siempre estarte buscando, siempre estabas presente, porque siempre iluminabas mi camino cuando lo perdía. Por todo Amén.

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo económico del programa PAPIIT IN211301, a quien se agradece también la beca otorgada.



≈∩ CONTENIDO ∩≈

Lista de Tablas	VIII
Lista de Figuras	IX
Resumen	X
1. Antecedentes	1
1.1 Mango	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Descripción botánica	2
1.1.2.1 Fruto	6
1.1.3 Desinfestación de la fruta del mango	6
1.1.4 Métodos térmicos para la desinfestación de la fruta del mango	7
1.1.4.1 Tratamiento con vapor caliente (VHT)	7
1.1.4.2 Tratamiento con aire caliente (FHAT)	8
1.1.4.3 Tratamiento hidrotérmico (HWT)	9
1.2 <i>Salmonella</i> sp.	10
1.2.1 Taxonomía	10
1.2.2 Fisiología	11
1.2.2.1 Crecimiento	12
1.2.2.2 Supervivencia	13
1.2.3 Reservorios	14
1.2.4 Características de la enfermedad	16
1.2.4.1 Síntomas y Tratamiento	16
1.2.5 Resistencia a los antibióticos	18
1.2.6 Dosis infecciosa	19
1.2.7 Patogenicidad y factores de virulencia	20
1.2.7.1 Respuestas humanas específicas e inespecíficas	20



1.2.8 Fijación e invasión	21
1.2.9 Crecimiento y supervivencia en el interior de las células hospedadoras	23
1.2.10 Otros factores de virulencia	26
1.2.10.1 Plásmidos de virulencia	26
1.2.10.2 Sideróforos	27
1.2.10.3 Toxinas	28
1.2.10.4 Antígeno Vi, LPS y porinas.	29
1.3 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	31
1.3.1 Ciclo térmico de la reacción en cadena de la polimerasa	31
2. Objetivos	33
3. Materiales y Métodos	34
3.1 Metodología General	34
3.1.1 <i>Salmonella</i> entérica serovariedad Typhimurium	37
3.1.2 Extracción de DNA de las cepas puras de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Typhimurium	37
3.1.3. Lavado de la superficie de los mangos para recuperar los microorganismos	38
3.1.4. Pre-Enriquecimiento	38
3.1.5. Extracción del DNA de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango	39
3.1.6 Determinación de la concentración de DNA	39
3.1.7. PCR múltiple (Condiciones de amplificación)	40
3.1.8. Detección de los productos de la PCR	41
3.1.9. Método Tradicional	42
3.2 Efecto de diferentes tratamientos térmicos en la incidencia de <i>Salmonella</i> sp	43



3.2.1 Materiales de trabajo	43
3.2.2 Tratamiento con vapor	44
3.2.2.1 Descripción del sistema para la producción de vapor	45
3.2.2.1.1 Características de los accesorios	45
3.2.2.1.2 Especificaciones	45
3.2.2 Tratamiento con aire seco	47
3.2.3 Tratamiento hidrotérmico	47
3.3 Efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos inoculados con <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Typhimurium.	48
3.3.1 Materiales	48
3.3.2 Inoculación de los mangos con <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Typhimurium	48
3.3.3 Lavado por aspersión de los mangos	49
3.3.4 Tratamiento hidrotérmico	49
3.3.5 Extracción de los microorganismos de la superficie del mango	49
3.3.6 Detección de <i>Salmonella</i> sp por PCR múltiple	50
3.4 Efecto del manejo poscosecha del mango de exportación en la incidencia de <i>Salmonella</i> sp. en una Compañía exportadora de Michoacán.	50
3.4.1 Materiales	51
3.5 Determinación de <i>Salmonella</i> sp. por PCR múltiple en los mangos	52
3.6 Cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios de la superficie de los mangos.	52
3.7 Determinación de <i>Salmonella</i> sp y cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios en el agua de tratamiento hidrotérmico.	52
3.8 Aislamiento y purificación de microorganismos de la superficie del mango	53
3.9 Identificación de cepas puras por el equipo Vitek*	53
3.10 Serología	54
3.10.1 Antígeno somático (O)	54
3.10.1.1 Preparación del antígeno	54



3.10.1.2 Selección del suero puro	54
3.10.2 Antígeno flagelar (H).	54
3.10.2.1 Preparación del antígeno	54
3.10.2.2 Selección del suero puro	55
4. Resultados y Discusión de Resultados	56
5. Conclusiones	73
Perspectivas	75
Apéndices	76
Bibliografía	77



## Lista de Tablas

Descripción	Página
Tabla 1.1 Tiempo de tratamiento térmico de acuerdo al peso	10
Tabla 2. Volúmenes de reacción para la PCR múltiple	44
Tabla 3. Relación tiempo-temperatura de los tratamientos térmicos	45
Tabla 3.2 Secuencia de oligos para la PCR	41
Tabla 3.3 Volúmenes de reacción para la PCR múltiple	42
Tabla 3.4 Relación tiempo temperatura de los tratamientos térmicos	44
Tabla 4.1 Cuenta de microorganismos mesófilos aerobios de los mangos antes y después de los tratamientos térmicos	61
Tabla 4.2 Identificación de microorganismos obtenidos y aislados de la superficie del mango	67
Tabla 4.3 Cuantificación de los microorganismos mesófilos aerobios en el mango de una compañía exportadora de mangos en Apatzingán, Michoacán.	70

## Lista de Figuras

Descripción	Página
Figura 3. Metodología general	35
Figura 3.1 Diagrama de flujo general para la detección de <i>Salmonella</i> sp y cuantificación de mesófilos aerobios en la superficie del mango	36
Figura 3.2 Procedimiento para el análisis del agua utilizada para el tratamiento hidrotérmico	37
Figura 3.3 Ciclo térmico de la PCR.	40
Figura 3.4 Manejo de los mangos de la central de abastos para probar los diferentes tratamientos térmicos.	44
Figura 3.5 Equipo diseñado para el tratamiento con vapor caliente.	46
Figura 3.6 Efecto de los diferentes tratamientos hidrotérmicos en la incidencia de <i>Salmonella</i> sp.	47
Figura 3.7 Efecto del tratamiento hidrotérmico en la incidencia de <i>Salmonella</i> sp.	48
Figura 3.8 Diagrama de flujo general para la detección de <i>Salmonella</i> sp en la superficie del mango	50
Figura 3.9 Proceso poscosecha de los mangos en la compañía exportadora de Apatzingán, Michoacán	51
Figura 3.10 Diagrama de flujo general para la detección de <i>Salmonella</i> sp en la superficie del	54



mango y determinación de la concentración de microorganismos mesófilos aerobios	
Figura 4.1 Producto de PCR de mangos control inoculados con <i>S. Typhimurium</i>	57
Figura 4.2 Producto de PCR de mangos con tratamiento hidrotérmico inoculados con <i>S. Typhimurium</i>	57
Figura 4.3 Producto de PCR de mangos control de la Central de Abastos México D.F.	60
Figura 4.4 Producto de PCR de mangos con tratamiento de aire caliente (46.1°C/180 min)	60
Figura 4.5 Producto de PCR de mangos con tratamiento hidrotérmico (46.1°C/65 min)	60
Figura 4.6 Producto de PCR de mangos con tratamiento con vapor (46°C/10 min)	60
Figura 4.7 Producto de PCR de mangos con tratamiento con vapor (46°C/20 min)	60
Figura 4.8 Producto de PCR de mangos control obtenidos de la cosecha (Apatzingán)	69
Figura 4.9 Producto de PCR de mangos con tratamiento hidrotérmico (46°C/90 min)	69
Figura 4.10 Producto de PCR de mangos después del proceso de cepillado	69
Figura 4.11 Producto de PCR de mangos empacados	69



## RESUMEN

El valor de producción agrícola del mango en el año 2000 fue de 3012 millones de pesos, que representa el tercer cultivo a nivel nacional en importancia económica (INEGI, 2003). En el año 2003 la producción fue de 1,403,881 toneladas en México (SAGARPA, 2003). Esto contribuye con el 6.6% de la producción mundial (de 19.6 millones de toneladas en promedio anual de 1993-1997), la India es el país líder con 53% y China le sigue con el 6.9%. Asimismo, nuestro país es el principal exportador con un volumen de 133.3 mil toneladas de 1993-1996, esto es el 39.3% del total importado por los EUA (INEGI, 2003); 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 un brote de salmonelosis a partir de mangos de exportación de una granja de Brasil, en donde se encontró que el microorganismo estaba contaminando el agua usada en el tratamiento hidrotérmico. El tratamiento hidrotérmico, es un método de control sanitario para eliminar la mosca de la fruta (*Thephitide*) en estado de huevo y de larva (Jacobi *et al.*, 2001), además elimina hongos causantes de la descomposición y retarda la maduración de la fruta (Haard y Salunkhe, 1975).

Los métodos tradicionales para determinar la presencia de *Salmonella* sp tienen poca sensibilidad para detectar bajas concentraciones de células (<10 células), y son métodos que requieren entre 3 a 5 días para obtener resultados. El uso de métodos más rápidos y con mayor sensibilidad ha ido en aumento. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que cumple con las expectativas deseadas de acuerdo a la sensibilidad, rapidez y especificidad.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tratamiento hidrotérmico en la incidencia de *Salmonella* sp en la superficie del mango detectándola por PCR múltiple y determinar



la sobrevivencia de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium en la superficie del mango después de diferentes tratamientos térmicos.

No se detectó *Salmonella* en muestras de mango de una compañía exportadora de mangos en Apatzingán, Michoacán, sin embargo la concentración de microorganismos mesófilos aerobios se incrementaba durante el proceso postcosecha de manera considerable.

Los tratamientos térmicos (hidrotérmico 46.1°C/65 min., aire seco 46°C/180 min., y vapor 46.1°C/20 min.) aplicados al mango son adecuados para eliminar a *Salmonella* sp, pero el tratamiento con vapor (46°C) dado por 10 minutos no es suficiente para eliminar a enterobacterias patógenas.

Se aisló una cepa patógena de *Escherichia coli* de la superficie de un mango muestreado proveniente de la Central de Abastos después del tratamiento hidrotérmico.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 MANGO

#### 1.1.1 Historia

El mango es conocido en la India desde épocas muy remotas y ha sido cultivado durante más de 4000 años en ese país (Comisión Fruticultura, 1974). A través de numerosas investigaciones ha sido posible señalar a la región Indo-Birmana (noroeste de la India y el norte de Burma en las laderas del Himalaya) y posiblemente también de Ceilán (Infoagro,2003), como el centro de origen de esta especie, cuya dispersión alrededor del mundo se inició con los tratados comerciales entre Asia y Europa. Esto promovió el cultivo del mango, el cual se ha extendido a diferentes países tales como Filipinas, Indonesia, Malasia Tailandia, Birmania y Ceilán en el sureste de Asia, además de Egipto, Hawai, Estados Unidos (el estado de Florida), Israel, México y Brasil (Mukherjee , 1973).

El mango está reconocido en la actualidad como uno de los 3 ó 4 frutos tropicales más finos. Ha estado bajo cultivo desde los tiempos prehistóricos. Las Sagradas Escrituras en Sánscrito, las leyendas y el folklore hindú 2.000 años A.C. se refieren a él como de origen antiguo, aun desde entonces. El árbol de mango ha sido objeto de gran veneración en la India y sus frutos constituyen un artículo estimado como comestibles a través de los tiempos. El mango está distribuido por todo el sureste de Asia y el archipiélago Malayo desde épocas antiguas. Se le ha descrito en la literatura china del siglo VII como un cultivo frutal bien conocido en las partes más cálidas de China e Indochina. La temprana prominencia del mango en su tierra nativa sale a la luz por el hecho de que Akbar, el gran Moguel de la India del siglo XVI, tenía un huerto conteniendo 100,000 árboles de mango (Infoagro, 2003).

El mundo occidental se relacionó con el mango e inició su actual distribución mundial con la apertura, por los portugueses, de las rutas marítimas hacia el Lejano Oriente, al principio del siglo



XVI. También se le llevó de Indochina a la isla de Mindanao y a Sulus por el siglo XIII, no siendo sino hasta fines del siglo XIV y principio del siglo XV que los viajeros españoles llevaron la fruta desde la India hasta Manila, en Luzón. Mientras tanto, los portugueses en Goa, cerca de Bombay, transportaron fruta de mango al sur de África, de ahí hacia Brasil, alrededor del siglo XVI y unos 40 años después a la Isla de Barbados (Infoagro, 2003).

Del mismo modo, los españoles introdujeron este cultivo a sus colonias tropicales del Continente Americano, por medio del tráfico entre las Filipinas y la costa oeste de México por los siglos XV y XVI. Jamaica importó sus primeros mangos de Barbados hacia 1782 y las otras islas de las Indias Occidentales, al principio del siglo XVII. Los mangos fueron llevados de México a Hawai, en 1809, y a California, alrededor de 1880, mientras que la primera plantación permanente en Florida data de 1861(Infoagro, 2003).

De acuerdo con el arribo de esta especie a nuestro país, ocurrió a partir de dos vías: la primera con origen en las Bermudas y la segunda de las Filipinas mediante los galeones comerciales de la Nao de China (Comisión Fruticultura, 1974; Mukherjee , 1973). Partiendo de una u otra vía, en el país las primeras huertas se establecieron en los estados de Guerrero, Colima, Jalisco, y Sinaloa en las costas del Pacífico, mientras que en Veracruz en la costa del Golfo (Comisión Fruticultura).

### 1.1.2 Descripción Botánica

El mango (*Mangifera indica* Linn.), es una fruta dicotiledónea de la familia Anacardiaceae (Lizada, 1993), incluye 64 géneros, la mayoría árboles y arbustos. El árbol es generalmente de porte mediano (10-20 m) en estado adulto. Conocida por su único sabor y su atractiva apariencia, el mango es un fruto muy valorado por los ingresos económicos que genera debido a su exportación por los países productores (Medlicott *et al.*, 1986a; Mitra and Baldwin, 1997).



Es una drupa aplanada, larga, carmosa y su pericarpio está dividido en tres capas; una delgada piel externa, el epicarpio, el cual cubre la semilla interior (Hulme, 1971; Mukherjee, 1997). De color exterior amarillo o verde como base, algunos con chapeos de colores que van del rojo claro al morado oscuro, que varía de acuerdo a la variedad, morfología, color y sabor.

El mango sazón es considerado una excelente fuente de vitaminas C, B1 y B2 además de provitamina A (Mukherjee, 1997). Contiene además tiamina, riboflavina, y minerales como el hierro, calcio, fósforo, además del aporte de agua y carbohidratos (León, 1982).

India es el principal productor de mango en el mundo, con el 66% de la producción mundial. Tradicionalmente los países exportadores de mango son Filipinas, India, Tailandia y México. Es una fruta de gran importancia a nivel económico y México es el exportador número uno a nivel mundial de este fruto, en los meses de diciembre a marzo.

Los cultivos de mango pueden ser clasificados en dos grupos: India o Indo-China, basado mayoritariamente en los pigmentos de la piel y las características sensoriales de la pulpa. Las variedades de la India, que poseen fuerte aroma y una intensa coloración de la piel, son monoembrionicos y requieren métodos de propagación asexual para una consistente reproducción de los cultivos. Por otro lado, los cultivos que crecen en la región sureste de Asia son mayoritariamente poliembrionicos (Jacobi *et al.*, 2001).

Subramanyam *et al.*, (1975) considera otros dos grupos: primero, los mangos de India con carácter intermedio entre las variedades poliembrionicas de Indo-China y la segunda, híbridos desarrollados en Florida y en Hawai.

El comercio del mango ha sido limitado por su naturaleza altamente perecedera. La madurez de este fruto no puede ser retrasada lo suficiente para viajar una larga distancia. El fruto es altamente susceptible a enfermedades, temperaturas extremas y al daño físico. Entonces, la mayoría de las tecnologías postcosecha para esas frutas han sido diseñadas para el control de enfermedades y la protección contra daño durante el empaque y transporte. Las tecnologías de almacenamiento por



largos periodos, como las atmósferas controladas o modificadas, que han sido utilizadas comercialmente para aclimatar frutos no ha sido aplicada satisfactoriamente al mango.

India que es el principal país productor en volumen de mango, lo exporta mayoritariamente en forma procesada como jugo, puré, rebanadas o salsas; en contraste, las Filipinas y México exportan principalmente el fruto fresco.

-Tronco. El mango típico constituye un árbol de tamaño mediano, de 10-30 m de altura. El tronco es más o menos recto, cilíndrico y de 75-100 cm de diámetro, cuya corteza de color gris – café tiene grietas longitudinales o surcos reticulados poco profundos que a veces contienen gotitas de resina.

-Copa. La corona es densa y ampliamente oval o globular. Las ramitas son gruesas y robustas, frecuentemente con grupos alternos de entrenudos largos y cortos que corresponden al principio y a las partes posteriores de cada renuevo o crecimientos sucesivos; son redondeadas, lisas, de color verde amarillento y opacas cuando jóvenes; las cicatrices de la hoja son apenas prominentes.

-Hojas. Las hojas son alternas, espaciadas irregularmente a lo largo de las ramitas, de peciolo largo o corto, oblongo lanceolado, coriáceo, liso en ambas superficies, de color verde oscuro brillante por arriba, verde – amarillento por abajo, de 10-40 cm de largo, de 2-10 cm de ancho, y enteros con márgenes delgados transparentes, base aguda o acunada y un tanto reducida abruptamente, ápice acuminado.

Las hojas tienen nervaduras visiblemente reticuladas, con una nervadura media robusta y conspicua y de 12-30 pares de nervaduras laterales más o menos prominentes; ellas expiden un olor resinoso cuando se les tritura; el peciolo es redondeado, ligeramente engrosado en la base, liso y de 1,5-7,5 cm de largo. Las hojas jóvenes son de color violeta rojizo o bronceado, posteriormente se tornan de



color verde oscuro.

-Inflorescencia. Las panículas son muy ramificadas y terminales, de aspecto piramidal, de 6-40 cm de largo, de 3-25 cm de diámetro; las raquias son de color rosado o morado, algunas veces verde-amarillentas, redondeadas y densamente pubescentes o blancas peludas; las brácteas son oblongas-lanceoladas u ovadas-oblongas, intensamente pubescentes, se marchitan y caen pronto y miden de 0,3-0,5 cm de largo.

-Flores. Las flores poligamas, de 4 a 5 partes, se producen en las cimas densas o en la últimas ramitas de la inflorescencia y son de color verde-amarillento, de 0,2-0,4 cm de largo y 0,5-0,7 cm de diámetro cuando están extendidas. Los sépalos son libres, caedizos, ovados u ovados-oblongos, un tanto agudos u obtusos, de color verde-amarillento o amarillo claro, cóncavos, densamente cubiertos (especialmente en la parte exterior) con pelos cortos visibles, de 0,2-0,3 cm de largo y 0,1-0,15 cm de ancho.

Los pétalos permanecen libres del disco y son caedizos, ovoides u ovoides-oblongos, se extienden con las puntas curvadas, finamente pubescentes o lisos, de color blanco-amarillento con venas moradas y tres o cinco surcos de color ocre, que después toman el color anaranjado; ellos miden de 0,3-0,5 cm de largo, y 0,12-0,15 cm de ancho; los pétalos viejos a veces tienen márgenes rosados, el disco es grande, notoriamente de cuatro o cinco lóbulos arriba de la base de los pétalos, surcado, esponjoso, de color de limón, convirtiéndose después a blanco translúcido, durante la antesis es mucho más ancho que el ovario y de 0,1-0,15 cm de alto.

Los estambres pueden ser de cuatro a cinco, desiguales en su longitud, siendo fértiles sólo uno o dos de ellos, el resto está reducido a diminutos estaminoides, de color morado o blanco amarillento; los estambres perfectos miden de 0,2-0,3 cm de largo, con las anteras ovoide-oblongas,



obtusas, lisas. Las flores estaminadas carecen de ovario rudimentario y sus estambres son centrales, reunidos cercanamente por el disco. El ovario en la flor perfecta es conspicuo, globoso, de color limón o amarillento y de 0,2-0,15 cm de diámetro; el estilo es lateral, curvado hacia arriba, liso y de 0,15-0,2 cm de largo; el estigma es pequeño y terminal. La polinización del mango es esencialmente entomófila, siendo los principales polinizadores, insectos del orden Díptera.

#### 1.1.2.1 Fruto

Su peso varía desde 150 g hasta 2 kg. Su forma también es variable, pero generalmente es ovoide-oblonga, notoriamente aplanada, redondeada, u obtusa a ambos extremos, de 4-25 cm. de largo y 1.5-10 cm. de grosor. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cáscara es gruesa, frecuentemente con lenticelas blancas prominentes; la carne es de color amarillo o anaranjado, jugosa y sabrosa.

-Semilla. Es ovoide, oblonga, alargada, estando recubierta por un endocarpo grueso y leñoso con una capa fibrosa externa, que se puede extender dentro de la carne (Infoagro, 2003).

#### 1.1.3 Desinfestación de la fruta del mango

La fruta del mango es hospedera de la mosca de la fruta Tephritide que es considerada como un riesgo de cuarentena por muchos países importantes. Dependiendo del país de origen, el mango puede estar infestado por una o más especies de moscas de la fruta. En Australia por ejemplo los mangos pueden estar infestados por la mosca endémica Queensland (*Bactrocera tryoni* (Frogatt)), la mosca de la fruta del mediterráneo (*Ceratitidis capitata* (Weidemann)), y la mosca de la fruta de la papaya (*Bactrocera papayae* (Drew and Hancock)). Para que el mango fresco sea aceptado por muchos importantes mercados, la fruta debe de ser tratada para asegurar que esté libre de moscas de la fruta. Antiguamente a menudo se usaban tratamientos químicos como los pesticidas para la fruta, pero ahora han sido reemplazados por tratamientos libres de sustancias



químicas En general los tratamientos libres de sustancias químicas como el tratamiento térmico a una temperatura y por un periodo de tiempo adecuados, pueden matar el huevo y los estados de larva de la mosca en el fruto. Para ser aceptado por autoridades de cuarentena en muchos países, debe encontrarse evidencia de probabilidad estadística de que el tratamiento mató al 99.9968%. El valor de Probit infiere que no más de tres individuos deben sobrevivir en una población total de 100 000 frutos en un proceso de cuarentena. Por ejemplo, Japón usa una variación de Probit 9, concepto que requiere que no haya sobrevivientes en una población de 30 000 frutos diana (Keryl *et al.*, 2001).

#### **1.1.4 Métodos térmicos de desinfestación de la fruta del mango**

La desinfestación térmica del mango requiere que este sea sometido a un calentamiento a una temperatura establecida por un tiempo específico. La fruta se calienta por medio de la transferencia de energía de un medio caliente, el cual puede ser agua o aire. Hoy en día hay tres métodos en uso para el calentamiento de la fruta del mango: el tratamiento con vapor (VHT por sus siglas en inglés vapour heat treatment), tratamiento con aire caliente forzado (FHAT por sus siglas en inglés force hot-air treatment), y el tratamiento de inmersión en agua caliente (HWT por sus siglas en inglés hot water treatment), o tratamiento hidrotérmico (Keryl *et al.*, 2001).

##### **1.1.4.1 Tratamiento con vapor caliente (VHT)**

El tratamiento VHT es referido como el calentamiento con aire de alta humedad. Este proceso consiste en calentar el aire, posteriormente se pone en contacto con humedad cerca del punto de saturación. Cuando el vapor esta a la temperatura se hace pasar una corriente de aire alrededor del fruto. Cuando la temperatura del mango está en o por encima del punto de rocío, en la



superficie del mango ocurre una condensación de la humedad atmosférica. De esta forma la fruta del mango es calentada por transferencia de energía de convección. El calor de la superficie de la fruta es trasferida al centro del mango. Los protocolos de desinfestación por el método VHT aceptado para que el mango tenga acceso a los mercados de alto valor en Japón incluyen: 46°C en el corazón del mango durante 30 min. Para Filipinas el mango 'Carabao'; 46.5°C en el corazón del mango por 10min, para Tailandia los mangos 'Nang Klang Wun'; 47°C en el corazón del fruto por 10min para los mangos 'Nam Doc Mai', 'Pimsen Dang' y 'Rad'. El protocolo aceptado por las autoridades de Japón para la entrada de mango 'Kensigton' de Australia es de 47°C en el centro del corazón por 15min. El mango 'Manila' de México puede entrar a Estados Unidos con un tratamiento de 43.3°C por 6 horas (Keryl *et al.*, 2001).

#### 1.1.4.2 Tratamiento con Aire Caliente (FHAT).

Con el tratamiento con aire caliente, también conocido como tratamiento de aire no condensado, el calentamiento de la fruta se debe al paso de una corriente de aire a una cierta temperatura en una cama de fruta. El calor se transmite del aire caliente al fruto frío por medio de la conducción a través de la piel. El calor es transmitido rápidamente al centro del fruto. Sin embargo, la transferencia del aire a la piel es considerablemente más lenta que la transferencia de calor de la piel al centro de la fruta. La diferencia entre VHT y FHAT es que la superficie de la fruta puede secarse durante el tratamiento con aire caliente, comparada a la condensación en la fruta con el tratamiento de VHT. En el tratamiento FHAT, la humedad relativa del aire que pasa a través del fruto puede ser menor del 30%, y puede fluctuar durante el tratamiento, con la transferencia térmica por convección solamente. Si la humedad relativa es muy baja, la fruta pierde peso y puede ocurrir un encogimiento. Por lo tanto para conservar la calidad de la fruta, se debe de controlar de la humedad durante el tratamiento con aire caliente. Se han desarrollado métodos de cuarentena usando esta tecnología en los Estados Unidos. Sin embargo, los usos comerciales de FHAT



comúnmente solo ocurren para la papaya de Hawái y exportada a los Estados Unidos y a las islas Cook donde la papaya es tratada antes de ser exportada a Nueva Zelanda (Keryl *et al.*, 2001).

#### 1.1.4.3 Tratamiento hidrotérmico (HWT)

El tratamiento por inmersión en agua caliente tiene como objetivo eliminar la mosca de la fruta en el mango. Con la inmersión en el agua caliente, la transferencia de calor ocurre del agua a la piel de la fruta, y de la piel al centro de la fruta. La transferencia del agua a la piel es rápida mientras que de la piel al centro es más lenta. El rango de calentamiento de la piel y fuera del mesocarpio de la fruta es substancialmente rápida cuando la fruta es sumergida en agua caliente en comparación con el aire que pasa a alrededor fruta a la misma temperatura.

Comparada con VHT y FHAT el tratamiento hidrotérmico tiene cierto número de ventajas entre las que se encuentran: relativa facilidad de uso para industrias hortícolas, tiempo corto de tratamiento, monitoreo confiable y preciso, del mango y de la temperatura del mango, además de eliminar organismos de descomposición y limpiar la fruta de exudados de la planta. Otra ventaja importante de la tecnología del tratamiento hidrotérmico desde el punto de vista económico, es que el sistema comercial es un 10% más barato que el VHT comercial.

El uso de HWT en la fruta del mango en una escala comercial ha sido más generalizada en los Estados Unidos y en América Central. El tratamiento hidrotérmico para los propósitos de cuarentena usualmente consiste en sumergir la fruta en agua a una temperatura entre 43-46°C, las temperaturas de 46°C tienden a producir daño excesivo a la fruta. En América Central, el uso comercial de HWT para tratar a los mangos es generalizado. La temperatura del agua usada es de 46.1°C, algunas veces en un proceso por lotes o continuo por 65-90 min., dependiendo del peso de la fruta. Los protocolos de desinfestación usando el tratamiento hidrotérmico son aprobados para la entrada de fijo, de las variedades alargadas y redondas de México, Puerto Rico, Estados Unidos, Islas Vírgenes, India Oeste, Panamá y Sur América dentro de los Estados Unidos. Típicamente, los



frutos alargados con peso menor de 375 g son calentados a 46.1°C por un tiempo menor a 65 min., en cambio los cultivos con frutas alargadas y con peso entre 375-570g se calientan a 46.1°C y esta temperatura se mantiene durante 75 minutos. Existe evidencia de que esos tratamientos pueden inducir un alto daño en la piel del fruto, y esto es mal visto por los Estados Unidos. El tipo de equipo usado en México para el HWT varía desde sistemas simples hasta sistemas muy complejos continuos y automatizados (Keryl *et al.*, 2001).

El tratamiento hidrotérmico para frutos de mango autorizado por la SAGARPA deberá aplicarse a una temperatura constante de 46.1 grados centígrados a diferentes tiempos de acuerdo a su peso (tabla 1.1).

Tabla 1.1 Tiempo de tratamiento térmico de acuerdo al peso. (NOM-EM-033-FITO-2000, 2000)

Variedades	Peso	Tiempo de exposición
Redondas	700 g o menos	90 minutos
	500 g o menos	75 minutos
Alargadas	570 g o menos	75 minutos
	375 g o menos	65 minutos

## 1.2 *Salmonella* sp.

El género incluye más de 2,500 serovariedades, de las cuales la mayoría pueden causar gastroenteritis (Hoit *et al.*, 1994) con mayor incidencia en la épocas del año cuyas condiciones favorecen su crecimiento.

### 1.2.1 Taxonomía.

*Salmonella* sp. es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos miembros de este género tienen movilidad por medio de



flagelos peritricos, las variedades no flageladas como *Salmonella pullorum* y *S. gallinarum*, y las razas sin movilidad son el resultado de flagelos disfuncionales. *Salmonella* es un microorganismo quimiorganótrofo, con la habilidad de metabolizar nutrientes por las vía respiratoria y la vía fermentativa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y cataboliza la D-glucosa y otros carbohidratos, con la producción de ácido y gas. *Salmonella* es oxidasa positivo y catalasa negativo, crece en citrato como única fuente de carbono, generalmente con producción de sulfuro de hidrógeno, descarboxila la lisina y la ornitina, y no hidroliza la urea (Doyle *et al.*, 2001).

La identificación bioquímica de *Salmonella* spp, es generalmente acoplado a confirmaciones serológicas, éstas involucran la aglutinación de antígenos bacteriales de superficie con anticuerpos especiales de *Salmonella*. Entre éstos se incluyen lipopolisacáridos O (LPS) en la membrana externa de la pared bacteriana, antígenos H asociados con los flagelos peritricos, y el antígeno capsular (Vi), que se encuentra solo en *S. typhi*, *S. paratyphi* C, y *S. dublin*. La estabilidad térmica de los antígenos O se clasifica en antígenos mayores o menores. La primer categoría consiste en antígenos que son factores somáticos del grupo O:4 y O:3, que son determinantes específicos para el grupo somático B y E, respectivamente. En contraste, los antígenos somáticos menores como el O:12 son no discriminatorios, que es evidenciado por la presencia en diferentes grupos somáticos (Doyle *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Fisiología

El efecto bacteriostático, debido al resultado de la baja actividad acuosa ( $a_w$ ) y de la plasmólisis bacteriana conmensuradamente con la hipertonidad del medio puede producir la muerte de la célula. Estudios han demostrado que a un  $a_w \leq 0.93$ , *Salmonella* no se reproduce. Generalmente, *Salmonella* es inhibido en presencia de 3-4% de NaCl, la tolerancia bacteriana se incrementa con el incremento de la temperatura en el rango de 10 a 30°C. Sin embargo, este



fenómeno es asociado con una prolongada fase lag de crecimiento y un decremento en la tasa de crecimiento (Doyle *et al.*, 2001).

El pH, la concentración de sal, y la temperatura de los microambientes pueden ejercer grandes efectos en las cinéticas de crecimiento de *Salmonella* spp. Muchos estudios han delineado el incremento de la habilidad de los microorganismos de crecer en condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 5.0$ ), o en microambientes con alta salinidad ( $\geq 2\%$  NaCl) con el incremento de la temperatura.

La presencia de sal en alimentos acidificados puede reducir la acción antibacteriana de los ácidos orgánicos: bajas concentraciones de NaCl o KCl estimula el crecimiento de *S. enteritidis* en medio de cultivo acidificado a pH 5.19 con ácido acético (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.2.2.1 Crecimiento

El género *Salmonella* consiste en microorganismos resistentes que rápidamente se adaptan a extremas condiciones del medio ambiente. Crece activamente en un rango de temperatura ( $\leq 54^\circ\text{C}$ ) y puede exhibir propiedades psicrotróficas, que se reflejan en la habilidad de crecer en alimentos conservados a  $2-4^\circ\text{C}$  (Doyle *et al.*, 2001).

La adaptabilidad fisiológica de *Salmonella* sp. es fuertemente demostrada por la habilidad de proliferar a valores de pH que van desde 4.5 a 9.5, con un rango de pH óptimo de crecimiento de 6.5-7.5. Está bien establecido que los efectos bacteriostáticos o bactericidas de las condiciones de acidez son dependientes del agente acidulante. Los ácidos orgánicos formados por cultivos de bacterias en carne, leche, y otros productos fermentados, y de varios ácidos orgánicos e inorgánicos usados en la acidificación de los productos, ácido propiónico y el ácido acético tienen un poder bactericida mayor que los asociados a los alimentos, el láctico y el ácido cítrico. Es interesante ver que la acción antibacteriana de los ácidos orgánicos disminuye conforme se incrementa la longitud de la cadena del ácido graso (Doyle *et al.*, 2001).



### 1.2.2.2 Sobrevivencia

El calor es muy utilizado en los métodos de elaboración de alimentos para controlar la calidad e inocuidad bacteriana en los productos terminados. La termorresistencia de este género aumenta a medida que disminuye el  $a_w$  del medio de calentamiento, los solutos utilizados para modificar el  $a_w$  del medio de calentamiento desempeñan un papel determinante en el nivel de resistencia adquirida. La exposición a las temperaturas subletales resulta de una adaptación rápida de organismo a las temperaturas que se elevan en el microambiente hasta un nivel de termorresistencia aumentada muy diferente del descrito en las curvas convencionales como nivel de letalidad térmica. Esta respuesta adaptativa posiblemente tenga implicaciones graves con respecto a la seguridad de los tratamientos térmicos que exponen o mantienen los productos alimenticios a temperaturas marginalmente letales ( $\leq 50^\circ\text{C}$ ) durante un tiempo de 15 a 30 minutos, aumenta su termorresistencia gracias a una síntesis rápida (sensible al cloranfenicol) de las proteínas del choque térmico. Los cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares en las células estresadas por el calor (para proporcionar un mayor porcentaje de fosfolípidos saturados), reducen la fluidez de ésta con un aumento coincidente de la resistencia de la membrana al daño por el calor (Doyle *et al.*, 2001).

Pruebas recientes indican que la exposición breve de *S. Typhimurium* a medios ligeramente ácidos de pH 5.5 a 6.0 (prechoque) seguida de la exposición de las células adaptadas al pH de valor  $\leq 4.5$  (choque ácido) desencadena una compleja respuesta de ácido-tolerancia (ATR) que potencia la supervivencia del microorganismo en los medios sumamente ácidos (pH 3.0 a 4.0). La respuesta se traduce en una síntesis inducida de 43 proteínas del choque ácido y proteínas de la membrana externa (OMP's), velocidad de crecimiento reducida, y homeostasis del pH interno de las bacterias de 7.0 a 7.1 y de 5.0 a 5.5 tras exposición secuencial de las células a pH extremos de 5.0 y 3.3, respectivamente.

El estrés ácido también puede desencadenar resistencia bacteriana frente a otras condiciones ambientales adversas.



Un crecimiento de *S. Typhimurium* a pH 5.8 originó una resistencia térmica aumentada a 50°C, una tolerancia aumentada al estrés osmótico elevado (2.5 M de NaCl) atribuida a la síntesis inducida de las proteínas *OmpC*, una mayor hidrofobicidad de la superficie, y una resistencia aumentada al sistema lactoperoxidasa bacteriano y a agentes activos de superficie como el cristal violeta y la polimixina B (Doyle *et al.*, 2001).

### 1.2.3 Reservorios

La presencia de *Salmonella* en el medio natural, junto con los sistemas de la producción intensiva que se utiliza en las industrias de la carne, del pescado y del marisco, y el reciclado de despojos y de materiales crudos en los piensos animales, han fomentado la importancia continua de este patógeno humano en la cadena alimenticia global. De los diversos sectores en la industria cárnica, los productos avícolas siguen siendo los reservorios principales de *Salmonella* spp., en muchos países, superando a otros productos cárnicos como la carne de cerdo, la carne de vaca, y la carne de camero como posibles vehículos de infección. La ausencia de mejoras importantes en el control de *Salmonella* de los productos avícolas crudos, notablemente el pollo, el pavo, las aves acuáticas en los continentes norteamericano y Europeo, proviene, en parte, de la dificultad de crear y mantener parvadas de abasto exentas de *Salmonella* y de distribuir piensos no contaminados a los diversos sectores de esta industria integrada verticalmente. El alojamiento de aves locales cuya construcción es posible que no impida de modo eficaz que entren animales salvajes portadores de esta bacteria patógena, que incluyen roedores, insectos y especies de aves, exagera la magnitud del problema. La persistencia de estas bacterias en las industrias de carne porcina, bovina, y ovina tiene su origen tanto en la exposición del ganado a fuentes de contaminación ambientales y a piensos contaminados como en la transmisión paterna de la infección.

En los últimos años el agotamiento rápido de las existencias silvestres de pescado y marisco ha aumentado en gran manera la importancia de la industria internacional de la acuicultura, como



una fuente alternativa en estos productos alimenticios populares. Las condiciones de cultivo de densidad elevada necesarias para aumentar al máximo los rendimientos biológicos y para satisfacer las demandas crecientes del mercado, abren paso a la infección difusa de especies criadas en albercas de tierra y en otras instalaciones sin protección, que están expuestas continuamente a la contaminación ambiental. La alimentación de especies criadas con sobras de carne cruda y despojos, con contenido de letrinas potencialmente contaminadas con organismos tifoideos y paratifoideos, y con piensos animales que pueden albergar una diversidad de serovariedades de *Salmonella*, es rara en estas zonas geográficas. Una seria preocupación de salud pública proviene del uso de agentes antimicrobianos como la ampicilina, el cloranfenicol, los agentes sulfamídicos y las quinolonas, que en la actualidad proporcionan el sostén del tratamiento clínico de la salmonelosis sistémica en las personas. El método de manejo dependiente de los antibióticos en acuicultura es imprudente e irresponsable si se tiene en cuenta que el abuso de agentes terapéuticos importantes desde el punto de vista médico, en la industria ganadera sigue seleccionando cepas resistentes a los antibióticos (Doyle *et al.*, 2001).

Las frutas y hortalizas han adquirido notoriedad en los últimos años como vehículos de salmonelosis humana. La situación ha aparecido como consecuencia de la exportación global aumentada de frutas y hortalizas frescas y deshidratadas procedentes de países que gozan de climas tropicales y subtropicales, por ejemplo el mango, el tomate, el melón y los germinados de alfalfa. El abonado de las cosechas con lodo no tratado o con efluentes de aguas residuales potencialmente contaminados con *Salmonella* sp. resistente a los antibióticos, el riego de las parcelas de los jardines y de los campos y el lavado de las frutas con aguas contaminadas, la manipulación reiterada del producto por los operarios locales, y la tendencia a la contaminación ambiental de las especias y otros condimentos durante la desecación en instalaciones no protegidas, representan eslabones débiles que socavan la inocuidad de los productos. Los cambios de operaciones a favor del riego de los campos con efluentes tratados, el lavado de frutas y hortalizas con aguas desinfectadas, la formación de los operarios locales en la manipulación de los productos frente a la contaminación



ambiental durante todas las fases de producción y comercialización, aumentarían notablemente la calidad y la seguridad de estos productos frecuentemente listos para consumir (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.2.4 Características de la Enfermedad

##### 1.2.4.1 Síntomas y Tratamiento

Las infecciones humanas con *Salmonella* puede producir varias enfermedades clínicas, que incluyen la fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis no complicadas, e infecciones sistémicas por microorganismos no tifoideos: fiebre entérica es una enfermedad humana grave relacionada con las cepas tifoideas y no tifoideas que están especialmente bien adaptadas para la invasión y supervivencia en los tejidos del hospedador. Las manifestaciones clínicas de la fiebre entérica aparecen después de un período de incubación que varía desde 7 a 28 días y pueden incluir diarrea, fiebre prolongada y de “agujas”, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento. El diagnóstico de la enfermedad se basa en el aislamiento del agente infeccioso o en las deposiciones después del comienzo de los síntomas clínicos. Con frecuencia, a la fase aguda de la fiebre entérica le sucede un estado de portador crónico asintomático. El tratamiento de la fiebre entérica se basa en la terapia de mantenimiento y/o en el uso de cloranfenicol, ampicilina, o trimetropim-sulfametoxazol para eliminar la infección sistémica. La resistencia global de los organismos tifoideos o paratifoideos a estos agentes antibacterianos. Es especialmente grave en los países subdesarrollados, donde cepas resistentes a varios antibióticos están involucrados en los brotes de fiebre entérica y son la causa de índices de mortalidad insólitamente elevados.

Por lo general, las infecciones humanas con cepas no tifoideas acaban en una enterocolitis que aparece de 8 a 72 horas después del contacto con el patógeno invasor. La enfermedad clínica es generalmente autolimitante y la remisión de las características deposiciones diarreicas no sanguinolentas y del dolor abdominal suele ocurrir transcurridos 5 días desde el comienzo de los síntomas. En estos episodios, el uso de antibióticos esta contraindicado porque tiende a prolongar el estado de portador y la excreción intermitente del agente patógeno. Esta persistencia asintomática



de *Salmonella* en el intestino probablemente es consecuencia de una represión notable, dependiente de los antibióticos, de la microbiota natural del intestino que normalmente compite con las bacterias invasoras por los nutrientes, y por los sitios de fijación intestinal. Las infecciones humanas con cepas no tifoideas también pueden degenerar en infecciones sistémicas y producir diversas enfermedades crónicas. Además de *S. dublin* y de *S. choleraesuis*, que manifiestan una predilección por la septicemia, de modo parecido han sido observados niveles de virulencia en otras cepas no tifoideas. En los hospedadores humanos, los trastornos fisiológicos, anatómicos, e inmunológicos preexistentes, también pueden favorecer la enfermedad grave y prolongada por causa de la incapacidad de los mecanismos de defensa para responder eficazmente ante la presencia de las bacterias invasoras (Doyle *et al.*, 2001).

Enfermedades crónicas inducidas por *Salmonella* como la artritis séptica, el síndrome de Reiter, y la espondilitis anquilosante son dignas de ser tenidas en cuenta. Los requisitos bacterianos previos para el comienzo de estas enfermedades crónicas incluyen la capacidad de la cepa bacteriana para infectar las superficies mucosas, la presencia del LPS de la membrana externa, y una tendencia a invadir las células del hospedador. Si bien los mecanismos subyacentes de estas enfermedades crónicas todavía tienen que ser esclarecidos del todo, una de las diversas teorías sugiere que la fagocitosis del agente patógeno se traduce en una alteración química y en la liberación fagocítica lenta de LPS bacteriano (Doyle *et al.*, 2001).

Otro mecanismo propuesto para la inducción bacteriana de artropatías involucra a las proteínas bacterianas del choque (estrés) térmico, que son sintetizadas en respuesta a condiciones ambientales adversas y a la liberación de sustancias antibacterianas como los metabolitos reactivos del oxígeno producidos durante el estallido oxidativo de los fagocitos activados. Las proteínas del choque térmico procedentes de los patógenos invasores desencadenan una respuesta proliferativa en los linfocitos T sinoviales del hospedador que, a su vez, produce la enfermedad reumatoide (Doyle *et al.*, 2001).



### 1.2.5 Resistencia a los antibióticos

Los aumentos sostenidos en el número de cepas de *Salmonella* sp resistentes a los antibióticos tanto en las personas como en los animales de granja, son muy inquietantes. La administración abundante de agentes antimicrobianos en los hospitales y en otros centros de tratamiento ha conducido a la aparición y a la persistencia de cepas resistentes. El uso extendido y el abuso de antibióticos poco controlados en las industrias de animales de carnicería y de acuicultura es inadmisibles. Un porcentaje importante (~ 90%) de estos antibióticos fue administrado en niveles subterapéuticos. Pruebas recientes indican que estos tratamientos facilitan, la aparición y persistencia de cepas de *Salmonella* y de otros patógenos transmitidos por alimentos resistentes a los antibióticos en los animales de granja y en los productos cárnicos derivados.

Los determinantes genéticos de la resistencia antibiótica, son codificados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos citoplásmicos. Los plásmidos de resistencia (R) son fragmentos de DNA autónomos y autorreplicantes cuyos productos de transcripción confieren resistencia a la célula portadora. La tendencia a la transferencia por conjugación intra e intergenérica de plásmidos R que son portadores de uno o varios codones de resistencia entre células compatibles que comparten el mismo nicho ecológico, es un grave problema de salud pública, intercambios de material genético pueden favorecer la aparición y propagación de *Salmonella* sp. transmitidas por alimentos que son resistentes a uno o más agentes terapéuticos importantes desde el punto de vista médico como el cloranfenicol y la asociación trimetoprim-sulfametoxazol.

Antibióticos diversos como la bacitracina, la virginiamicina, y la apramicina, son considerados antibióticos veterinarios que carecen de todo valor terapéutico en medicina humana. Sin embargo, pruebas recientes indican que el uso agrícola de apramicina puede conducir a la aparición de cepas de *Salmonella* gentamicino-resistentes en el ganado tratado.

Los aumentos recientes de los porcentajes de aislamiento humano de *Salmonella* sp. resistentes al cloranfenicol. A la ampicilina y a la asociación trimetoprim-sulfametoxazol, han



hecho necesario un cambio importante en el tratamiento antibiótico tanto de las salmonelosis humanas sistémicas como de los portadores crónicos. Si bien en la actualidad las cefalosporinas de espectro amplio conservan cierto nivel de importancia en el tratamiento de las infecciones sistémicas, el interés médico está retomando rápidamente hacia las fluoroquinonas para las infecciones por *Salmonella* asentadas profundamente (Doyle *et al.*, 2001).

### 1.2.6 Dosis infecciosa

Los recién nacidos, los niños, las personas mayores y los individuos inmunocomprometidos son más sensibles a las infecciones por *Salmonella* que las personas adultas sanas. El sistema inmune desarrollado incompletamente en los recién nacidos y en los niños, las respuestas inmunológicas débiles y/o retardadas en las personas ancianas y debilitadas, y la producción de ácido en el estómago, generalmente escasa en los niños y en las personas de edad, facilitan la colonización intestinal y la diseminación sistémica de las bacterias en este segmento de la población.

La ingestión de sólo unas cuantas células de *Salmonella* puede resultar infecciosa. Los datos más recientes indican que de 1 a 10 células pueden constituir una dosis infecciosa humana. En la salmonelosis, los factores determinantes no están limitados a la heterogeneidad inmunológica en las poblaciones humanas ni a la virulencia de las cepas infectantes, sino que también incluyen la composición química de los vehículos alimentarios incriminados (Doyle *et al.*, 2001).

### 1.2.7 Patogenicidad y Factores de virulencia

#### 1.2.7.1 Respuestas humanas específicas e inespecíficas

La presencia de *Salmonella* sp en el tracto intestinal humano confirma la evasión eficaz de los organismos ingeridos de las defensas inespecíficas del hospedador. La lactoperoxidasa antibacteriana en la saliva, la acidez gástrica, las secreciones mucoides de las células caliciformes



intestinales, la peristalsis intestinal y el desprendimiento de células epiteliales de la luz intestinal, se oponen sinérgicamente a la colonización bacteriana de la mucosa intestinal. Además de estas

barreras constitutivas frente a la infección bacteriana, las actividades de las células fagocíticas inespecíficas (neutrófilos, macrófagos, monocitos) asociadas a las respuestas inmunes relacionadas con los linfocitos específicos T y B, los tejidos epiteliofoliculares (placas de Peyer), y la vía clásica o alternativa de la inactivación de los patógenos invasores por el complemento, arman una defensa formidable contra la diseminación sistémica de las *Salmonella* sp (Doyle *et al.*, 2001).

La respuesta diarreagénica a la salmonelosis transmitida por alimentos es consecuencia de la migración del patógeno existente en la cavidad oral hacia los tejidos intestinales y folículos linfáticos mesentéricos (enterocolitis). El evento coincide con la producción de la enterotoxina bacteriana, con la abundante entrada de leucocitos en los tejidos infectados, con la secreción aumentada de moco en las células caliciformes y con la inflamación de las mucosas desencadenada por la liberación leucocítica de prostaglandinas. El último acontecimiento también activa la adenilciclase en las células del epitelio intestinal, que se traduce en un aumento de la secreción de líquido hacia el interior de la luz intestinal. El fracaso de los mecanismos de defensa del hospedador para frenar las células invasoras puede degenerar en septicemia y otras enfermedades clínicas crónicas.

### 1.2.8 Fijación e invasión

La creación de una infección humana por *Salmonella* depende de la capacidad del organismo para fijarse (colonización) y penetrar (invasión) en las células cilíndricas del epitelio intestinal (enterocitos) y en las células M especializadas que recubren las placas de Peyer. Las bacterias deben competir con éxito con la microbiota intestinal innata por sitios de fijación apropiados en la superficie de la luz de la pared intestinal y eludir la captura por la inmunoglobulina A secretora que también puede estar presente en la superficie de las células epiteliales. La



colonización de los enterocitos se produce, en parte, por la interacción de las fimbrias bacterianas de tipo 1 (sensibles a la manosa) y de tipo 3 (resistentes a la manosa) de las adhesinas de superficie, de las hemoaglutininas no fimbriadas (resistentes a la manosa), o de los polipéptidos inducidos por los enterocitos, con los receptores de glucoproteína del hospedador situados en las microvellosidades o en el glucocáliz de la superficie intestinal. Si bien el papel de la movilidad de *Salmonella* en los procesos de adherencia e invasión es dudoso, la movilidad puede no ser esencial para la interiorización bacteriana y es posible que simplemente aumente la frecuencia de los contactos provechosos entre el patógeno y su célula epitelial blanco. En la superficie de *Salmonella* se desarrollan apéndices proteicos por el contacto con las células epiteliales. Las enzimas ATP-asa y translocasa codificadas por los loci *invC* e *invG*, respectivamente, pueden contribuir en la formación de estas estructuras. Los apéndices tienen una longitud de 0,3 a 1,0 nm y aproximadamente 60 nm de diámetro, considerablemente más gruesos que los flagelos (aproximadamente 20 nm) y que las fimbrias de tipo 1 (aproximadamente 7 nm). Después de la fijación bacteriana, la transducción de señales entre el patógeno y la célula hospedadora culmina en una invasión por *Salmonella* de los enterocitos y células M, dependiente de la energía. Si bien la síntesis de la proteína bacteriana no es un requisito previo para el comienzo de la invasión, su inhibición prolongada pone en peligro la capacidad de las bacterias para penetrar en las células epiteliales cultivadas. El papel del locus *invE* en *Salmonella* sp., desencadena dos cambios profundos en los enterocitos y en las células M: un flujo de entrada de  $Ca^{2+}$  y una nueva disposición del citoesqueleto en la célula hospedadora blanco. El Citoesqueleto de las células eucarióticas es un entramado sumamente organizado de filamentos de sostén formados por actina y por otros elementos proteicos que definen la polaridad apical-basal de las células epiteliales del intestino y controlan el movimiento de los orgánulos intracelulares. Productos de genes no caracterizados procedentes del locus *invE* de una célula adherente de *Salmonella* favorecen el flujo de entrada del  $Ca^{2+}$  desde la luz intestinal hacia el interior de la célula de mamífero. Esta translocación iónica



origina una polimerización de la actina de la célula hospedadora en microfilamentos en la proximidad del patógeno invasor. (Doyle *et al.*, 2001).

La región de invasión (*inv*), la región de la presentación superficial de antígenos (*spa*), la región hiperinvasora (*hil*), *I* y las regiones (*prgH*) reprimidas por *phoP* en el cromosoma de *Salmonella*, son contiguas y loci relacionados funcionalmente situados en un segmento de 40 a 50 kb del DNA cromosómico (esto es, en la isla de la patogenicidad) que codifican factores determinantes de la entrada expedita de las bacterias en las células hospedadoras. El genoma *inv* es un locus multigénico que consta de no menos de 15 genes (desde *invA* hasta *-O*). Varios de estos loci codifican la síntesis de determinantes de virulencia o enzimas responsables de la translocación de los determinantes de virulencia a la superficie de las células hospedadoras. Se debe apuntar que varios loci *inv* representan denominaciones nuevas de los antiguos genes *spa*, que incluyen los genes *spaM* (*invI*), *spaN* (*invJ*), y *spaP* (*invL*). Las lesiones en el locus *inv* reducen notablemente la capacidad de *Salmonella* sp para invadir las células epiteliales cultivadas pero no causan efecto alguno en la adherencia bacteriana a las células hospedadoras (Doyle *et al.*, 2001).

Los genes *invA*, *-B*, y *-C* son contiguos en el cromosoma de *Salmonella* y se encuentran en la misma unidad transcripcional, mientras que el gen *invD* está situado corriente arriba de esta unidad. Factores ambientales como la osmolaridad elevada y la  $pO_2$  baja, aumentan la capacidad invasora bacteriana por alterar el sobre-enrollamiento, que consiguientemente influye en el nivel de transcripción de genes del DNA cromosómico relacionados con la transcripción como el gen *invA*. Las lesiones en los loci *invA* e *invC*, pero no en el *úlvE* ni en el *invD*, dificultan seriamente la capacidad invasora de las cepas portadoras. Además, las mutaciones en los loci *invA* a *-D* no modifican de modo importante la capacidad de *Salmonella* sp para fijarse a las células hospedadoras (Doyle *et al.*, 2001).



### 1.2.9 Crecimiento y supervivencia en el interior de las células hospedadoras

En contraposición a varios patógenos bacterianos como *Yersinia*, *Shigella*, y las cepas enteroinvasoras de *Escherichia coli* que se replican dentro del citoplasma de las células

hospedadoras, *Salmonella* está encerrada en una vacuola, endocitótica donde empieza la replicación bacteriana en un plazo de horas después de la interiorización. Las vacuolas infectadas se translocan desde el polo apical al basal de la célula hospedadora, donde las bacterias son liberadas dentro de la lámina propia. Durante su multiplicación en el interior de las vacuolas epiteliales, éstas también inducen la formación de estructuras filamentosas estables en el citosol epitelial. Estos orgánulos, que contienen proteínas de la membrana lisosómica y fosfatasa ácida al parecer están conectados a las vacuolas infectadas. La formación de estos filamentos requiere bacterias viables en el interior de las vacuolas membranosas y es bloqueada por los inhibidores de la acidificación vacuolar. La capacidad demostrada de las fimbrias finas agregadas en la superficie externa de las células de *Salmonella* para unirse al plasminógeno y al activador del plasminógeno de tipo tejido del hospedador, podría aumentar notablemente la capacidad invasora de las cepas infectantes. El zimógeno sería convertido en su forma proteolítica (plasmina) en la superficie bacteriana, proporcionando de este modo a *Salmonella* sp un medio eficaz para romper las barreras del tejido hospedador y facilitar la transcitosis hacia el interior de tejidos más profundos. La migración sistémica de las células bacterianas las expone al organismo a la fagocitosis por macrófagos, monocitos, y leucocitos polimorfonucleares ya las condiciones antibacterianas que predominan en el citoplasma de estas células de defensa del hospedador (Doyle *et al.*, 2001).

El regulón *phoP/phoQ* es un sistema regulador transcripcional de dos componentes que permite la supervivencia de *Salmonella* sp en el medio hostil de los fagocitos, notablemente en la acidez elevada existente en el interior de los fagolisosomas (célula hospedadora constituida por un fagosoma infectado con gránulos lisosómicos incorporados), y la liberación de defensinas antibacterianas por las células fagocíticas. Las defensinas, que también se encuentran en las células



epiteliales, son péptidos catiónicos inespecíficos de molécula pequeña que inactiva a *Salmonella* para insertarse en la membrana externa, creando de este modo canales a través de la membrana que aumentan la permeabilidad bacteriana a los iones y causan la muerte de la célula. La importancia de este producto de los genes se refleja en la incapacidad de las mutantes de *phoP* o de *phoQ* para oponer resistencia a la actividad antibacteriana de las defensinas. El producto del gen *phoQ* es una quinasa que, según se dice, sensibiliza el medio fagolisosómico hostil por medio de una cadena corta de 20 de sus 487 restos de aminoácidos que se prolonga hacia el interior del espacio periplásmico de la envoltura celular de *Salmonella*. Curiosamente, la mitad de los aminoácidos existentes en esta cadena periplásmica son de carácter ácido y forman un estuche aniónico que se cree que funciona como receptor de las defensinas catiónicas o como sensor de las condiciones sumamente ácidas existentes en el fagocito. Por ejemplo, una interacción entre las defensinas y el estuche aniónico de PhoQ-quinasa podría desencadenar la autofosforilación del sensor de la quinasa en un resto de histidina, seguida de una transferencia de fosfato, dependiente de la quinasa, a un resto de aspartato en el término amino de la proteína PhoP activadora de la transcripción. Después, la proteína PhoP fosforilada activaría la transcripción de varios genes activados por el componente *phoP* del regulón, que incluyen los loci *pagA*, *pagE*, *pagC*, *psiD*, y el locus *phoN* que codifica la fosfatasa ácida inespecífica del periplasma. La evidencia actual también indica que los loci *pagA*, *pagE* y *psiD* desunidos no están implicados en la virulencia de *Salmonella*, mientras que el gen *pagC* codifica una OMP que favorece la supervivencia en el interior de los macrófagos. La transcripción de *pagC* en el macrófago es máxima a pH 4.9 y, según se dice su producto de proteína coadyuva en la resistencia del suero pero no depara protección alguna frente a las defensinas o frente a los medios sumamente ácidos. La transcripción de los genes *pag* es inducida en los fagocitos acidificados infectados con *Salmonella* pero no en las vacuolas epiteliales infectadas. Además de los cinco genes activados por el componente *phoP* recientemente fueron identificados 13 nuevos loci regulados positivamente (*pagD* a *-P*). Estos genes *pag* identificados recientemente



no coadyuvan en la resistencia a las defensinas dependientes del sistema *phoP/phoQ*, mientras que los loci *pagD*, *pagJ*, *pagK* y *pagM* participan tanto en la virulencia para el ratón como en la supervivencia bacteriana en los macrófagos (Doyle *et al.*, 2001).

En contraposición a los genes *pag* que son expresados bajo condiciones adversas del medio tales como el pH bajo, la carencia de nutrientes, y la presencia de defensinas durante la fase estacionaria de crecimiento, el sistema *phoP/phoQ* también regula la expresión de los genes *prg* (reprimida por *phoP*) que son inducidos en condiciones de ausencia de estrés. Expuesto de modo diferente, las condiciones que activan los genes *pag* generalmente reprimen la expresión de los genes *prg*. El locus *prgH* desempeña un papel determinante en la invasión de las células epiteliales hospedadoras por *Salmonella*. Otras proteínas que se producen por la transcripción de los genes *prg* son necesarias para el arrugamiento difuso de la membrana, para la pinocitosis aumentada y para la formación en los macrófagos de fagosomas espaciosos donde la acidificación lenta favorece la supervivencia y la virulencia simultáneas. Es digno de notarse que solamente un número de genes activados por *phoP* cooperan en la virulencia de *Salmonella* (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.2.10 Otros factores de virulencia

La virulencia de *Salmonella* spp., según se refleja en la capacidad para causar enfermedades agudas y crónicas en las personas y en una diversidad de hospedadores animales, resulta de atributos estructurales y fisiológicos que actúan sinérgica o independientemente para favorecer la adherencia y la capacidad invasora bacterianas. Además del locus *inv* y del sistema *phoP/phoQ*, los cuales codifican, respectivamente, los determinantes de la capacidad invasora de *Salmonella* y la resistencia a las condiciones antibacterianas en el interior de los fagocitos, otros varios factores influyen en la patogenicidad de *Salmonella* (Doyle *et al.*, 2001).



### 1.2.10.1 Plásmidos de virulencia

Los plásmidos de virulencia son estructuras de gran tamaño de DNA citoplásmico que se replican independientemente del cromosoma bacteriano. Estos orgánulos autónomos contienen varios loci de virulencia cuyo tamaño varía desde 30 hasta 60 MDa, y se encuentran con una

frecuencia de una a dos copias por cromosoma. La presencia de plásmidos de virulencia en el género *Salmonella* es limitada y ha sido confirmada en *S. Typhimurium*, *S. dublin*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. enteritidis* y *S. abortusovis*. Es digno de notarse la ausencia de un plásmido de virulencia en la especie *S. typhi* adaptada al hospedador y sumamente infecciosa. Los productos genéticos de la transcripción de este plásmido potencian la diseminación sistémica de la infección de los tejidos extraintestinales pero no ejercen efecto alguno ni en la adherencia ni en la invasión

por *Salmonella* de las células epiteliales y de las células M. Más concretamente, se cree que los plásmidos de virulencia permiten a las células portadoras multiplicarse rápidamente en las células hospedadoras y vencer a los mecanismos de defensa del hospedador. Los plásmidos de virulencia de *Salmonella* contienen secuencias de nucleótidos sumamente conservadas y manifiestan homología funcional en el sentido de que la transferencia de plásmidos de una serovariedad de tipo salvaje a otra serovariedad sin los plásmidos restablece la virulencia de la cepa receptora.

La región (*spv*) de los plásmidos de virulencia de *Salmonella* consta de un grupo de genes que codifica productos para el crecimiento prolífico de las células bacterianas en los tejidos reticuloendoteliales del hospedador. Las señales que desencadenan la transcripción de *spv* incluyen el medio hostil en el interior de los fagocitos del hospedador, la limitación de hierro, las temperaturas elevadas, el pH bajo, y la privación de nutrientes asociada con la fase estacionaria de crecimiento. El regulón *spv* tiene un tamaño de 8,0 kb aproximadamente y contiene por lo menos cinco genes (*spvR*, *-A*, *-E*, *-C* y *-D*) y dos promotores principales, uno para el locus *spvR* y otro para la unidad transcripcional *spvAECD*. Estos loci son transcritos en una sola dirección bajo la acción



reguladora coordinada del producto del gen *spvR* y de un factor cromosómico sigma ( $\sigma^S$ ) codificado por *rpoS* (antiguamente *katF*). El factor proteico sigma, una subunidad dentro de la RNA-polimerasa dedicada a la transcripción del gen *spvR*, reconoce la región promotora *spvR* y activa la transcripción del regulón *spv*. La proteína SpvR regula positivamente la expresión de la unidad

transcripcional corriente abajo de *spvAECD* por medio de la secuencia promotora *spvA*. El papel de los productos genéticos codificados por los genes *spvAECD* en la virulencia de *Salmonella* es fugaz. Las secuencias de nucleótidos de los loci *spv* están sumamente cuidadas en el género *Salmonella*. Las mutaciones en esta región atenúan eficazmente o inactivan la capacidad de este género para crear infecciones asentadas profundamente (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.2.10.2 Sideróforos

Estos elementos recuperan el hierro esencial de los tejidos del hospedador para impulsar funciones celulares clave como la cadena de transporte de electrones y las enzimas asociadas con los cofactores del hierro. Para este fin, las células bacterianas deben competir por el hierro disponible con la transferrina, con la lactoferrina, y con los ligandos de la ferritina del hospedador (Doyle *et al.*, 2001).

#### 1.2.10.3 Toxinas

La enterotoxina diarreagénica figura de modo predominante como un factor de virulencia de *Salmonella* debido a su capacidad para producir síntomas clínicos manifiestos en los casos humanos de salmonelosis. La liberación de toxina en el citoplasma de las células hospedadoras infectadas causa una activación de la adenilciclase localizada en la membrana de las células epiteliales y un aumento notable de la concentración citoplásmica de AMP cíclico en las células hospedadoras. La eliminación concomitante de líquido hacia el interior de la luz intestinal es consecuencia de una secreción neta de iones  $Cl^-$  en las regiones de las criptas de la mucosa intestinal



y de la absorción disminuida de  $\text{Na}^+$  al nivel de las vellosidades intestinales. La enterotoxigenicidad es un fenotipo de virulencia que predomina en las serovariedades de *Salmonella*. que incluyen a *S. typhi* y es expresada en un plazo de horas después del contacto con las células hospedadoras blanco (Doyle, 2001).

La enterotoxina de *Salmonella* es una proteína termolábil con un peso molecular de 90 a 110 kDa. El reducido intervalo de pH (6,0 a 8,0) de la enterotoxina activa sugiere que la liberación de una enterotoxina funcional puede estar disminuida o inhibida en los fagolisosomas ácidos (pH 4,5 a; 5,0) y en los endosomas epiteliales (pH 5,0 a 6,5). La capacidad de la enterotoxina para unirse a los receptores del gangliósido  $\text{GM}_1$  en la superficie de las células hospedadoras sigue siendo un punto polémico. La enterotoxina de *Salmonella* es codificada por un gen cromosómico (*stx*) de 6,3

kb que regula la síntesis de tres proteínas con pesos moleculares de 45, 26, y 12 k Da. Estudios detallados sobre la estructura cuaternaria de la toxina colérica han confirmado una estructura formada por una subunidad A (activa) y una subunidad B (fijadora) en la que A activa la adenilato ciclasa de las células hospedadoras y B se une al gangliósido epitelial  $\text{GM}_1$ . La reactividad de las tres proteínas asociadas a la enterotoxina de *Salmonella* con antisueros mono-específicos obtenidos frente a las subunidades coléricas A y B y los modelos de movilidad gel-electroforética idéntica de la enterotoxina y de las subunidades coléricas A y B indican que la enterotoxina de *Salmonella* presenta una configuración estructural parecida a la de *Vibrio* spp (Doyle, 2001).

Además de expresar la enterotoxina, las cepas de *Salmonella* generalmente elaboran una proteína citotóxica termolábil de 56 a 78 kDa que se localiza en la membrana externa bacteriana. Los medios hostiles, por ejemplo el pH ácido y la temperatura elevada ( $42^\circ\text{C}$ ), causan una liberación extracelular de toxina, posiblemente como resultado de la lisis bacteriana inducida. El atributo de virulencia de la citotoxina proviene de su inhibición de la síntesis de proteínas y de la lisis de las células hospeda- doras. La capacidad de los iones de  $\text{Ca}^+$  añadidos para bloquear la desorganización de las monocapas de células dependiente de la citotoxina, indica que la citotoxina



puede actuar como queladora de los iones divalentes que normalmente cooperan en la integridad estructural de las monocapas.

#### 1.2.10.4 Antígeno Vi, Lipopolisacáridos (LPS), y porinas

El antígeno capsular polisacárido Vi existe en casi todas las cepas de *S. typhi*. en unas pocas cepas de *S. paratyphi C*, y rara vez en *S. dublin*. El antígeno Vi incrementa de modo importante la virulencia de las cepas portadoras por inhibir la opsonización del factor C3b del complemento del hospedador para el LPS de la superficie, un acontecimiento decisivo en la inducción de la fagocitosis de los macrófagos de las bacterias invasoras. Dos genes (*viaA* y *-8*) están asociados con la formación del antígeno Vi. Sin embargo, parece ser que el locus *via8*, que codifica

no menos de seis proteínas, es el elemento genético clave en el control de la síntesis del antígeno Vi, según se patentizó por la presencia de *viaA* en los representantes de las *Enterobacteriaceae* y en las cepas de *Salmonella* que no expresan el antígeno Vi. Datos recientes indican además, que el locus *ompR* también influye en la formación de la cápsula de Vi en *S. typhi* (Doyle, 2001).

La longitud del LPS serotípico, que sobresale de la membrana externa bacteriana, no sólo define a los fenotipos rugoso (LPS corto) y liso (LPS largo) sino que también desempeña un papel importante para repeler el posible ataque lítico del sistema complemento del hospedador. En efecto, los LPSs de las variantes lisas impiden espacialmente la inserción estable del factor C5b-9 del complemento en la membrana citoplásmica interna, lo que motivaría la bacteriolisis. La incapacidad general del LPS corto en las variantes rugosas para proteger contra la inserción lítica de CSb-9, convierte a estas variantes en más sensibles a la lisis y consiguientemente en menos virulentas. La composición del carbohidrato principal del LPS también puede influir en el nivel de activación del complemento del suero (Doyle, 2001).



Las porinas son proteínas transmembrana (OMP) que actúan como canales de transmembrana (membrana externa) para regular el flujo de entrada de nutrientes, antibióticos y de otras especies de moléculas pequeñas. Hasta ahora, cuatro porinas, codificadas por los genes *ompF*, *ompC*, *ompD* y *phoE*, han sido identificadas en *S. typhimurium*. La transcripción de genes de los

loci *ompF* y *ompC* es inducida por cambios en el microambiente. La osmolaridad baja, la disponibilidad escasa de nutrientes, y la temperatura baja, pueden desencadenar la transcripción del gen *ompF*, con una represión concomitante del locus *ompC*. Recíprocamente, las condiciones favorables del medio inducen la transcripción del gen *ompC* y la represión del locus *ompF*. Este fenómeno es análogo al de la activación de los genes *pag* dependiente del regulón *phoP/phoQ* en condiciones adversas y de la represión concomitante de los genes *prg* descrito anteriormente. Los canales de transmembrana formados por OmpF y OmpC tienen un diámetro de 1.11 a 1.3 nm y constan de trimeros formados por subunidades monoméricas. El producto del gen *envZ* activa la

OmpR mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación, mientras que el locus *ompR* activado regula la transcripción de los loci *ompF* y *-C*. Este mecanismo es reminiscente del regulón *phoP/phoQ*, en el que la fosforilación de *phoP* por la quinasa codificada por *phoQ* activa la transcripción de los genes *pag*. Las mutaciones en el regulón *ompR/envZ* (denominado *ompB*) atenúan espectacularmente la virulencia de las cepas portadoras; por el contrario, las mutaciones en el locus *ompC*, *-F*, o *-D* tienen escasa repercusión en la virulencia de *Salmonella*. Los informes sobre la capacidad de las porinas de *Salmonella* para reducir respuestas inmunológicas de defensa en el hospedador, indican que las porinas son de importancia limitada en la patogenicidad de *Salmonella*. Pruebas recientes indican que el locus *rck* (resistencia a la destrucción por complemento), que está situado en el plásmido de virulencia de *Salmonella*, codifica productos genéticos que protegen tanto a las variantes lisas como a las rugosas frente al factor lítico C5b-9 del complemento. El secuenciado de los nucleótidos de *rck* y el análisis de los aminoácidos de la



proteína Rck mostraron homología con el locus *pagC* dependiente de *phoP/phoQ* y con el producto del gen (Doyle, 2001).

### 1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que se utiliza en 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 bajas concentraciones, como es el caso de *Salmonella*.

Se utiliza para amplificar directamente secuencias específicas de DNA en una mezcla compleja, cuando se conocen los extremos de la secuencia. Este método de amplificación tiene diferentes aplicaciones, desde la investigación básica hasta la medicina forense (Darnell *et al.*, 2003)

La mezcla de reacción de PCR contiene oligonucleótidos que son secuencias específicas de nucleótidos que se unen al DNA blanco en la posición 3' y 5' respectivamente, para que posteriormente se una la Polimerasa *Taq* (llamada así porque proviene de un microorganismo termorresistente llamado *Thermus aquaticus* que vive en fuentes termales) para sintetizar el resto de la hebra de DNA con el exceso de nucleótidos que hay en la mezcla de reacción. Para que la polimerasa pueda actuar es necesario la presencia de un cofactor, los iones magnesio, que se agregan a la reacción como cloruro de magnesio.

#### 1.3.1 Ciclo térmico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez hecha la mezcla de reacción con la polimerasa (*Taq*), el cloruro de magnesio, la mezcla de los nucleótidos, el buffer 10X y el DNA de prueba, la mezcla es sometida a una serie de ciclos térmico: una elevación de la temperatura a 94°C por 2 minutos para desnaturalizar el DNA,



posteriormente baja la temperatura hasta 50-60°C, en donde el DNA blanco permanece desnaturizado, dado que las hebras complementarias se encuentran en una concentración demasiado baja para hallarse entre sí en el periodo de incubación, pero los oligonucleótidos específicos, en concentración muy elevada, se hibridan en las secuencias complementarias del DNA genómico. Entonces, los oligonucleótidos hibridados sirven como iniciadores para la síntesis de las cadenas de DNA, que comienzan por el agregado desoxinucleótidos y de una DNA polimerasa resistente a la temperatura, como la proveniente de *Thermus aquaticus*. Esta enzima es capaz de extender a partir de los iniciadores a temperatura de hasta 72°C. Cuando se completa la síntesis, toda la mezcla se vuelve a calentar (94-95°C) para desnaturizar los dúplex de DNA recién formados. Cuando se vuelve a disminuir la temperatura tiene lugar una segunda ronda de síntesis, porque aún hay exceso de iniciador. Mediante ciclos repetidos de síntesis (enfriado) y desnaturización (calentamiento) se amplifica rápidamente la secuencia buscada. En cada ronda se duplica la cantidad de copias de la secuencia entre los sitios de iniciador; en consecuencia, la cantidad de secuencia buscada aumenta en forma exponencial (Darnell *et al.*, 2003), que corresponde a  $2^{n-1}$  donde n es el número de ciclos y el valor obtenido es el número de copias obtenidas del fragmento deseado (Mathews, 2003).



## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- ✧ Determinar el efecto del tratamiento hidrotérmico y de tratamientos térmicos alternativos en el mango sobre la incidencia de *Salmonella* sp. detectándola por medio de la técnica de PCR múltiple.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Determinar el efecto de diferentes condiciones de tratamiento térmico del mango sobre la sobrevivencia de *Salmonella* sp.
- ✧ Determinar por PCR múltiple la posible presencia de *Salmonella* sp en la superficie de mangos de exportación del estado de Michoacán.
- ✧ Aislar las cepas de *Salmonella* sp. obtenidas de la superficie de los mangos de exportación.
- ✧ Determinar las cuentas de microorganismos mesófilos aerobios; como indicador de las prácticas de higiene y sanidad en el manejo de frutos.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Metodología general (Figura 3)

Se estudiaron mangos de la Central de Abastos. Un conjunto de mangos de inoculó con *Salmonella* Typhimurium (Fig. 3) y se sometieron a tratamiento hidrotérmico, usando mangos inoculados sin tratamiento térmico como controles (inciso 3.3).

Otro conjunto de mangos de la Central de Abastos sin inocular (Fig. 3), se usó para estudiar la sobrevivencia de *Salmonella* sp después de diferentes tratamientos térmicos. Se probaron 3 diferentes tratamientos térmicos: hidrotérmico, aire seco y vapor (tabla 3.4) para los mangos (inciso 3.2).

Se estudió el manejo postcosecha el mango en una compañía empacadora de mangos de Apatzingán en el estado de Michoacán (Fig. 3). En esta compañía se puede dividir el proceso del manejo postcosecha en cinco etapas que se muestran en la figura 3.8. Se muestrearon mangos de cuatro etapas que son: Recepción de mangos de cosecha, después del tratamiento hidrotérmico, después del cepillado de los mangos y después del empacado. Además se tomo una muestra de agua de los dos tanques que se usaban para el tratamiento hidrotémico. Con esas muestras se estudio la incidencia de *Salmonella* sp y la concentración de microorganismos mesófilos aerobios (inciso 3.4). Los controles fueron los mangos recibidos de la cosecha. Más adelante se muestra con detalle los materiales y métodos utilizados.



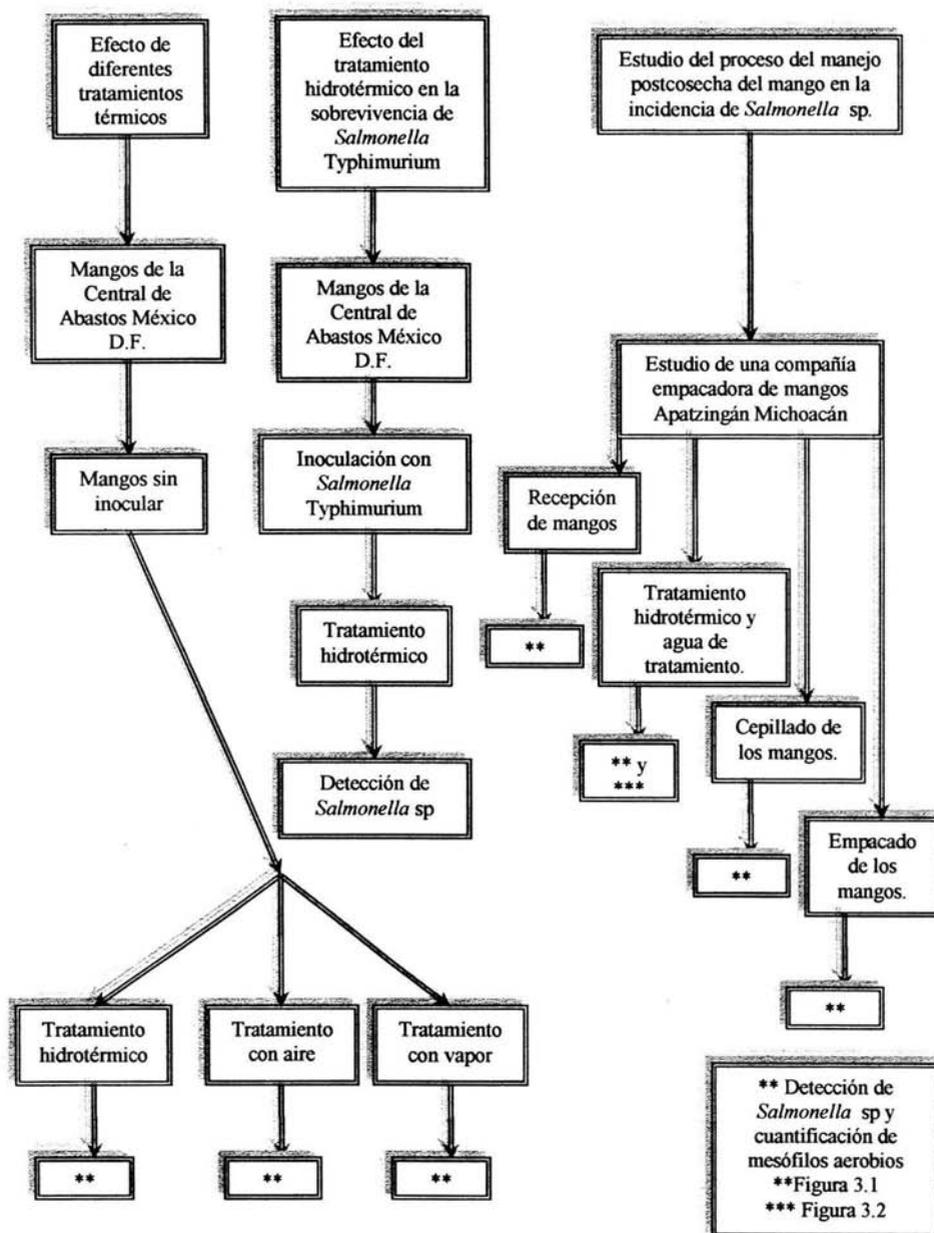


Figura 3. Metodología general



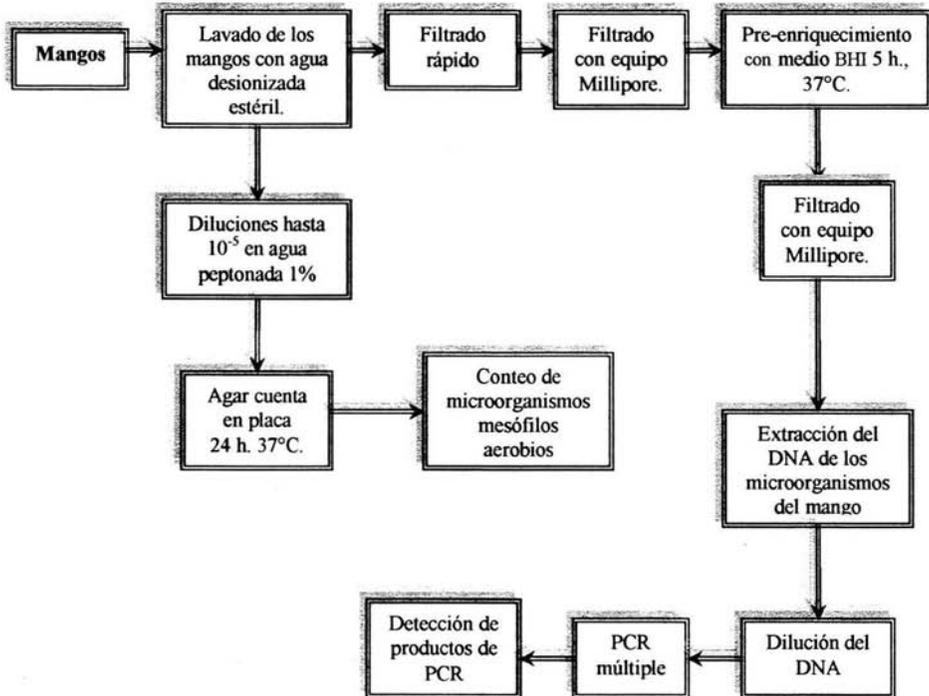


Figura 3.1. Diagrama de flujo general para la detección de *Salmonella* sp en la superficie del mango y determinación de la concentración de microorganismos mesófilos aerobios.



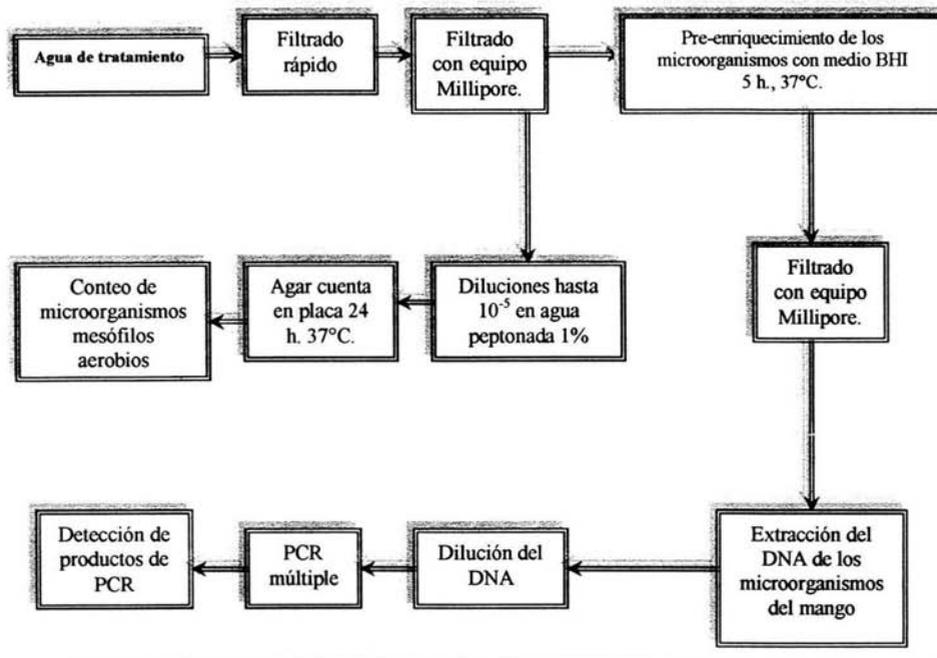


Figura 3.2. Procedimiento para el análisis del agua utilizada para el tratamiento hidrotérmico.

## Materiales y Métodos para la PCR múltiple.

### 3.1.1 *Salmonella* entérica serovariedad Typhimurium

La cepa pura de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028, fue proporcionada por el cepario de la Facultad de Química UNAM, Edificio A, laboratorio 1C.

### 3.1.2 Extracción de DNA de las cepas puras de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium

La extracción del DNA de las cepas de *Salmonella* se realizó siguiendo el procedimiento modificado de Lawson *et al.*, 1989. Se resuspendieron las células del cultivo puro en un tubo eppendorff de 1.5 ml que contenían 500 µl de buffer TES (0.05 M tris, 0.05 M NaCl, 0.005 M EDTA, pH 8.0). Se adicionaron 15 µl de lisozima (10 mg/ml) (Sigma) y se incubó a 37°C por 30



min. Se adicionaron 8  $\mu$ l de Pronasa y 8  $\mu$ l de RNAsa, ambos con una concentración de 10 mg/ml y se incubaron en un baño de agua a 65°C por una hora. Al término de este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 600  $\mu$ l de una mezcla fenol/cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente con la mano. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Al terminar la centrifugación se formaron tres fases. Se tomó la fase superior, que es la que contiene el DNA y se pasó a otro tubo eppendorff limpio. A este tubo se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100% a -20°C. Se agitó suavemente con la mano para mezclar el DNA con el etanol y se procedió a centrifugar (Centra microcentrifuga IEC) a 15000 rpm por 10 minutos. Se retiró el etanol por decantación y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 24 horas. Se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ l de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM de EDTA, pH 8.0).

### 3.1.3. Lavado de la superficie de los mangos para recuperar los microorganismos

El mango se colocó en una bolsa de plástico (Ziploc 16.51 cm por 14.92 cm) junto con 100 ml de agua desionizada estéril. Se cerró la bolsa y se agitó en un vortex frotando el mango simultáneamente con las manos desde el exterior de la bolsa durante 5 minutos. El líquido se filtró por un embudo con papel de filtración rápida (estéril) y el filtrado se pasó por una membrana de 0.45  $\mu$ m en un equipo Millipore (estéril).

### 3.1.4. Pre-Enriquecimiento

Posteriormente al lavado de los mangos, cada membrana se colocó en 50 ml de caldo BHI (OXOID) estéril, para preenriquecer durante 5 h a 37°C. Posteriormente se filtraron 20 mililitros del medio BHI de cada mango, por una membrana de 0.45  $\mu$ m, en un equipo Millipore (estéril). Entre filtrado y filtrado de cada mango se lavó el equipo Millipore, con 100 ml de agua desionizada estéril, cerrando la llave de vacío y dejando unos 30 segundos el agua filtrando lentamente, para posteriormente abrir la llave de vacío y proceder a filtrar el medio del siguiente mango.



### 3.1.5. Extracción del DNA de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango

Al término de la filtración descrita en la sección anterior, se retiró la membrana del equipo y se colocó en un tubo de centrifuga. Se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Se cortó la membrana en 4 partes y se regresaron al tubo de centrifuga; se adicionó 1ml de buffer TES (Apéndice A) y se agitó por 5 minutos en un vortex (Fisher) en el número 8. Se colocó en un congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Después de ese tiempo, se transfirió a un baño de agua y se calentó a  $92^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Se agitó el tubo que contenía la membrana sumergida en el buffer por 30 segundos en el vortex. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se agitó cuidadosamente con la mano y se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos. Se retiró el etanol por decantación y se dejó secar la pastilla. Se resuspendió la pastilla en 20  $\mu\text{l}$  de buffer TE (Apéndice A).

### 3.1.6 Determinación de la concentración de DNA

Para la reacción de PCR se ajustó la concentración de DNA a 50 ng/ $\mu\text{l}$ . Para ello se tomaron 5  $\mu\text{l}$  de DNA extraído, se diluyó con 1995  $\mu\text{l}$  de agua destilada y se mezcló en una celda de cuarzo. Posteriormente se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm usando como blanco 2 ml de agua destilada. Para calcular la concentración de DNA, se tomó en cuenta que cada unidad de absorbancia (a 260 nm), equivale a 50 ng/ml de DNA. La pureza del DNA se calculó midiendo la densidad óptica a 280 nm con la misma muestra y dividiendo el valor de las densidades  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ . Valores entre 1.8 – 2.0 nos indica que son muestras puras de DNA. Por debajo de ese valor significa que la muestra está contaminada con fenol o con proteínas (Maniatis *et al.*, 1989).



### 3.1.7. PCR múltiple (Condiciones de amplificación)

Se usaron 3 pares de oligos: el primer par de oligos, (*phoP/phoQ*) se observa a 299 pb, el segundo es derivado de la región de 1.5 Kb de la secuencia *hin/H2* de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium y se observa a 236pb, el tercer par de es *H-li*, el cual se deriva de la región *H-li* de la flagelina de *Salmonella* Typhimurium y el tamaño de la región que amplifica es de 173 bp. Las secuencias se presentan en la tabla 3.2.

La mezcla de PCR contiene buffer de reacción 10x (invitrogen) (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH=8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (invitrogen), 0.01% (wt/vol) gelatina, 200 µg de DNTPs – Trifosfatos desoxinucleótidos (Gibco), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Gibco), 50 ng de oligo *phoP*, 100 ng del oligo *Hin* y *Hi-li* (Operon Technologies), 1.25 U de *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer), templado de DNA (10 µl) y agua desionizada hasta un volumen final de 100 µl (tabla 2). La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones (Way *et al.*, 1993); temperatura de desnaturalización de 94°C por 2 minutos con la adición de 30 ciclos con temperatura de desnaturalización de 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 se mantuvieron a 72°C por 7 minutos para completar la síntesis de todas las cadenas de DNA (Figura 2). Finalmente los productos de PCR se mantuvieron a 4°C y se colocaron a -20°C para su almacenamiento.

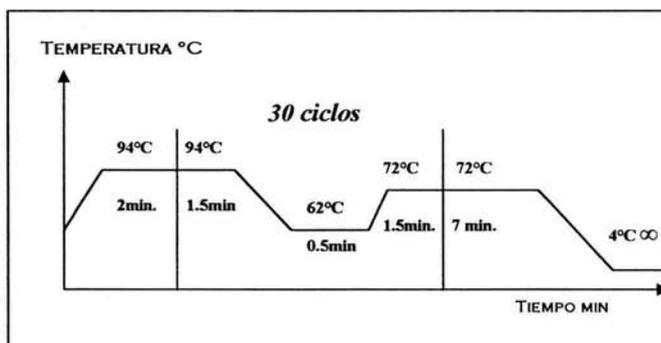


Figura 3.3. Ciclo térmico de la PCR.



Se usaron dos tipos de controles en la reacción, el control positivo se le adiciona el DNA de la cepa pura (*Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028) en una concentración de 50 ng/μl para confirmar que la reacción se había llevado a cabo; mientras que el control negativo contiene toda la mezcla de reacción pero sin la adición de templado de DNA, se adicionó agua desionizada. El control negativo se utiliza para verificar que ninguno de los reactivos estuviera contaminado.

**Tabla 3.2.** Secuencia de oligos para la PCR

Secuencia de bases	Longitud (pb)	Posición y orientación de las secuencias <sup>a</sup> de DNA	Región de amplificación (pb)
<i>Pho P</i>			
337-L, 5'-ATGCAAAGCCCGACCATGACG-3'	21	1052 → 1072	299
338-R, 5'-GTATCGACCACCACGATGGTT-3'	21	1331 ← 1351	
<i>Hin</i>			
1750-L, 5'-CTAGTGCAAATTGTGACCGCA-3'	21	169 → 189	236
1751-R, 5'-CCCCATCGCGCTACTGGTATC-3'	21	384 ← 404	
<i>H-Li</i>			
1788-L, 5'-AGCCTCGGCTACTGGTCTTG-3'	20	624 → 643	173
1789-R, 5'-CCGCAGCAAGAGTCACCTCA-3'	20	777 ← 796	

<sup>a</sup> Las flechas indican la orientación de los oligos

### 3.1.8. Detección de los productos de la PCR

Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa. Se cargaron diez microlitros del producto de PCR, 2 μl de colorante, 2 μl de buffer de corrimiento TBE 1X son cargados en un gel de agarosa (Boehringer Mannheim) al 1.8% y se corrieron en buffer TBE 1X a 70 volts por 70 minutos (BIORAD), incluyendo marcadores de peso molecular de 0.07-12.2 kb



(Boehringer Mannheim). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml) por un periodo de 3 minutos y se visualizaron en el equipo Fluor-S (BIORAD).

**Tabla 3.3.** Volúmenes de reacción para la PCR múltiple

Reactivo/Volumen (µl)	Mangos	Control positivo (+)	Control Negativo (-)
Buffer 10X	10	10	10
Mezcla de dDNTP (10mM)	2	2	2
Oligo PHOP 337L	1	1	1
Oligo PhoQ 338B	1	1	1
Oligo HiA 1750 L	1	1	1
Oligo HiA 1751R	1	1	1
Oligo HLi 1788L	1	1	1
Oligo HLi 1789R	1	1	1
Templado DNA (50ng/µl)	10	10	0
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	2	2
Agua desionizada	60	60	60
Volumen Final (µl)	100	100	100

## **Materiales y Métodos para el método tradicional para aislar *Salmonella* sp.**

### **3.1.9. Método Tradicional**

El lavado de los mangos se llevó a cabo como se explicó en el inciso 3.1.2. Se colocó la membrana de 0.45 µm que contenía los microorganismos recuperados de la superficie del mango, se colocó en 50 ml de caldo BHI (Oxoid) y se incubó por 24 h a 37°C. Se transfirió 1 ml de este cultivo en caldo tetratonato y caldo selenito cistina y se incubaron por 24 h a 37°C. Posteriormente se sembraron en cajas de medios selectivos Agar sulfito de Bismuto (Oxoid), Agar Entérico



Hektoen (Oxoid) y agar XLD (Oxoid) se incubaron por 24 h., a 37°C para llevar a cabo el aislamiento de la cepa. Se tomaron las colonias con las características típicas de *Salmonella* para realizar las pruebas bioquímicas confirmativas y se inocularon por picadura y estría en los medios agar triple azúcar (Oxoid) y agar lisina-hierro (Oxoid) por 24 h., a 37°C.

### 3.2 Efecto de diferentes tratamientos térmicos en la incidencia de *Salmonella* sp.

#### 3.2.1 Materiales de trabajo

Los mangos fueron traídos de la Central de Abastos de la Ciudad de México, originarios de Sinaloa, estibados en cajas de madera de aproximadamente 20 kg y cubiertos con papel. Los frutos se encontraban en la etapa del preclimaterio con un color verde uniforme. Al llegar al laboratorio, éstos se seleccionaron por color, tamaño y peso, estableciendo un rango para cada parámetro físico. Los frutos que no coincidieron con las características previamente establecidas fueron rechazados, al igual que los frutos que presentaron algún daño mecánico o alguna enfermedad en la piel. Se muestrearon 25 mangos de la Central de Abastos en la ciudad de México. De éstos 5 fueron usados como control (no se les dio tratamiento térmico). Los 20 restantes, se dividieron en grupos de 5 mangos a los cuales se les dieron 4 diferentes tratamientos térmicos. (tabla 2). Posteriormente a los tratamientos térmicos se determinó *Salmonella* sp. por medio de la PCR múltiple (Figura 3.6). Los muestras de mangos siguieron el manejo descrito en la Tabla 3.5.



Tabla 3.4. Relación tiempo - temperatura de los tratamientos térmicos.

Tipo de tratamiento térmico	Temperatura de tratamiento (°C)	Tiempo de tratamiento (min)	Observaciones
Ninguno	-	-	Mangos de control 1-5
Vapor	46	10	Mangos 6-10
Vapor	46	20	Mangos 11-15
Aire seco	46.1	180	Mangos 16-20
Hidrotérmico	46.1	65	Magos 21-25

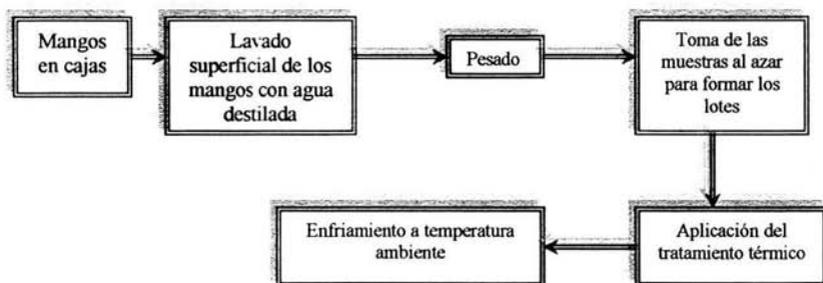


Figura 3.4 Manejo de los mangos de la central de abastos para probar los diferentes tratamientos térmicos..

### 3.2.2 Tratamiento con vapor

Se dio el tratamiento con vapor en el equipo mostrado en la figura 3.6. Los tratamientos de acondicionamiento térmico se desarrollaron con la aplicación de vapor caliente utilizando diferentes condiciones de temperatura y tiempo:

- ☛ Vapor caliente: 46.1° C durante 10, 20 min.

Posteriormente los frutos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron almacenados a 4° C.



### 3.2.2.1 Descripción del sistema para la producción de vapor

#### 3.2.2.1.1 Características de los accesorios

- ☞ Resistencia de aluminio de 3000W, con longitud aproximada de 42 cm.
- ☞ Regulador de temperatura de 0 – 120°C, modelo K-5-60/25 A, 250 VAC, MAX ADJ, 250°F, 032597NW.
- ☞ Termostato de cobre, medidas aproximadas: longitud: 11 cm, diámetro: 1 cm.
- ☞ Bomba para pecera, marca: MÁXIMA, 115VAC, 60Hz, 6.0Watts, Entrada y salida de aire 350 cm<sup>3</sup> / min x 2 psi 6.; Rolf C.Hagen (USA) Corp. Con dos salidas de aire.

#### 3.2.2.1.2 Especificaciones

Las paredes de la pecera son de vidrio excepto la cara en la cual se encuentran sujetadas la resistencia y el regulador de temperatura, ya que ésta es de acrílico debido a que éste material, cuenta con mayor facilidad para ser perforada.

- ☞ Las medidas del equipo se basan en L x a x h, y son equivalentes a las siguientes dimensiones: 61 x 31 x 46 cm.
- ☞ El acomodo de la resistencia sobre la pared de acrílico, se encuentra en el centro a 6 cm. Hacia arriba de la superficie inferior, mientras que el regulador de temperatura, se encuentra anclado con cinta adherente con una distancia de 9 cm. Sobre la parte inferior del equipo.
- ☞ El termostato, aunque no se encuentra representado con claridad en el esquema, éste se encuentra unido en la parte inferior a el regulador de temperatura y la parte superior, va colocada dentro del cubo de vidrio, siendo éste cubierto por el agua.



El equipo cuenta con una tapa de acrílico que es colocada en la parte superior para evitar la salida excesiva del vapor y por lo tanto, disminuir problemas en el control y regulación de la temperatura al interior del sistema; solo tiene dos perforaciones por las cuales se introduce los termopares ( el de penetración y el de toma de temperatura del vapor).

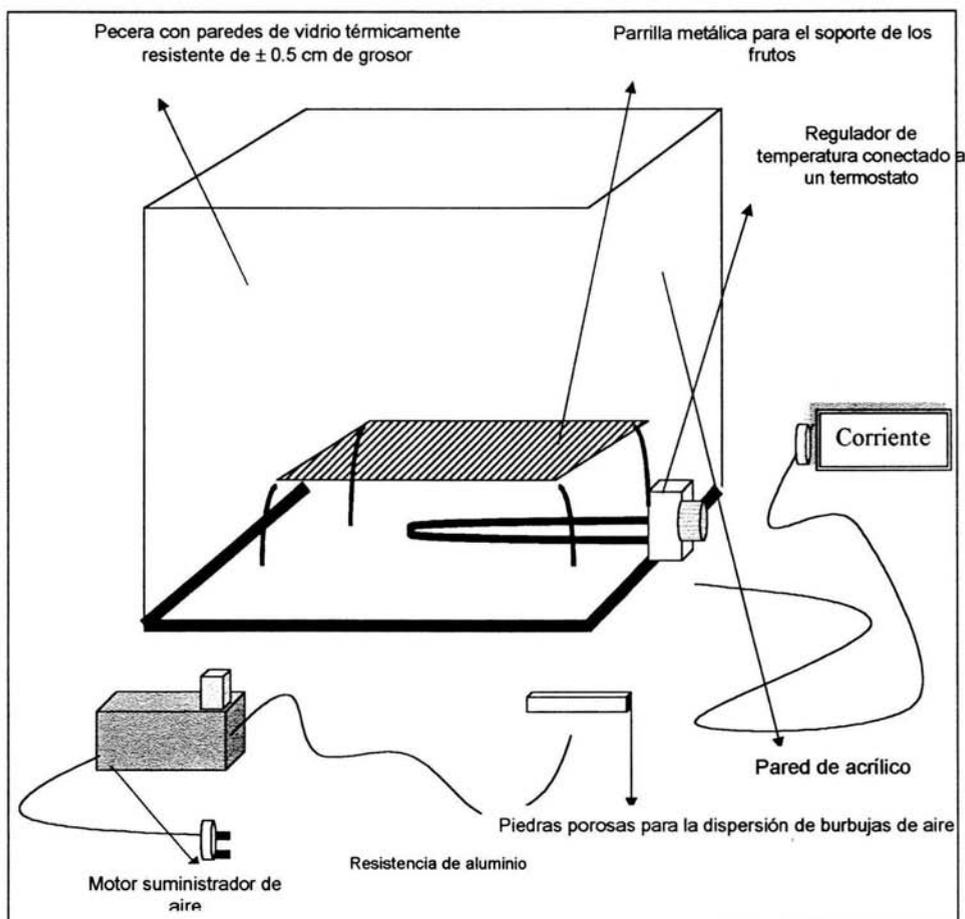


Figura 3.5 Equipo diseñado para el tratamiento con vapor caliente. Equipo diseñado por la Dra. Andrea Trejo y col., en la FESC.



### 3.2.2 Tratamiento con aire seco

Este tratamiento se realizó en una estufa de aire por convección forzada marca Blue M modelo Stabilthem. El tratamiento fue a: 46.1° C por 180 minutos. Al finalizar cada tratamiento se enfriaron a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 4 °C.

### 3.2.3 Tratamiento hidrotérmico

Este tratamiento se realizó en un baño de agua Felisa por un periodo de 65 minutos a 46.1°C. Se monitoreó la temperatura con termopares de penetración.

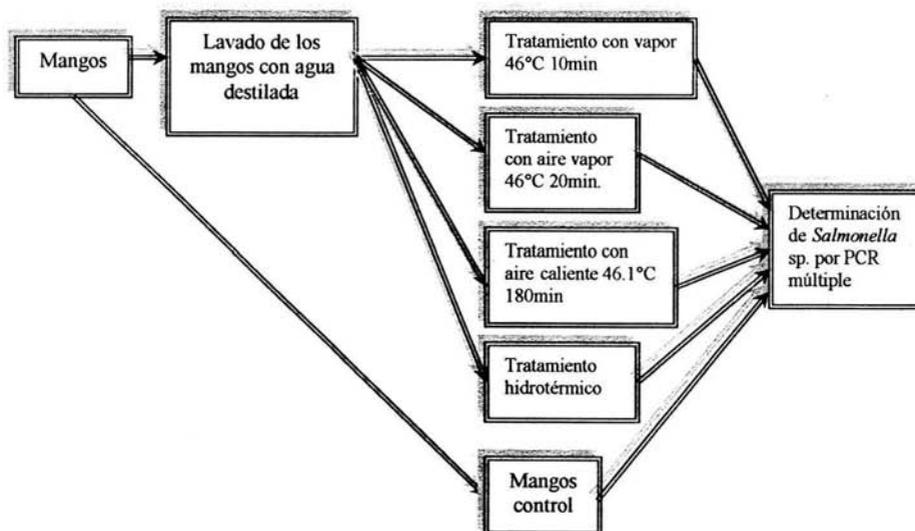


Figura 3.6 Efecto de los diferentes tratamientos hidrotérmicos en la incidencia de *Salmonella* sp.



### 3.3 Efecto del tratamiento hidrotérmico en mangos inoculados con *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium.

#### 3.3.1 Materiales (Figura 3.8).

Se trabajó con mangos Kent de la Central de Abastos, en estado inmaduro, proporcionados por la Dra. Andrea Trejo.

#### 3.3.2 Inoculación de los mangos con *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (Figura 3.8).

Se marcaron los mangos con un cilindro de acero inoxidable de 10 cm<sup>2</sup> de superficie, en condiciones estériles, dibujando 3 círculos en la superficie de cada mango para indicar la superficie inoculada. Posteriormente con un cultivo de *Salmonella* en agua peptonada al 1% con una concentración de 40 UFC/ml se inoculó con una pipeta, colocando 0.1ml de inóculo en cada círculo, se dejó secar en campana de flujo laminar por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente.

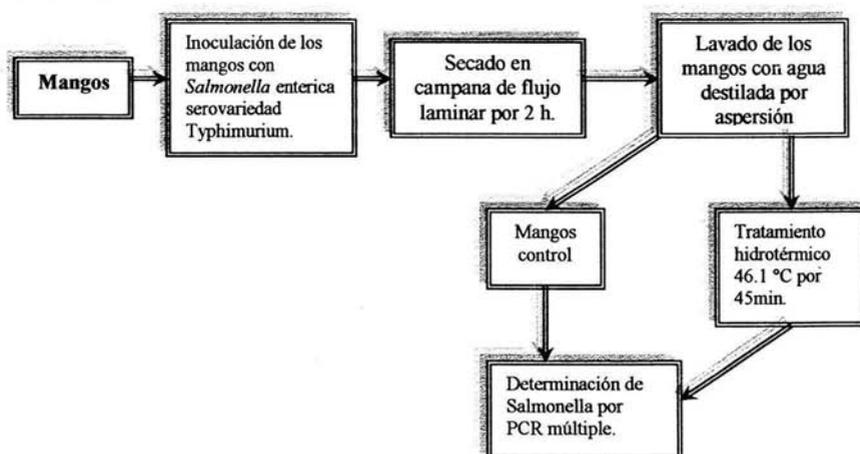


Figura 3.7. Efecto del tratamiento hidrotérmico en la incidencia de *Salmonella* sp.



### **3.3.3 Lavado por aspersión de los mangos (Figura 3.8).**

Posteriormente de inoculados los mangos, se lavaron cada uno de los mangos, con las manos usando guantes de látex estériles, con agua destilada por aspersión, durante un minuto, girando el fruto.

### **3.3.4 Tratamiento hidrotérmico (Figura 3.8).**

Los mangos inoculados se sometieron a un tratamiento hidrotérmico: se preparó un baño con agua destilada en un termobañero Felisa a una temperatura de 48°C aproximadamente. Encima de este baño se colocó una charola de aluminio con agua destilada que se encontraba a 46.1°C. Se colocaron los mangos usando guantes de látex, de modo que todo el mango quedara cubierto por el agua de tratamiento hidrotérmico. Se monitoreó la temperatura del agua del termobañero Felisa con un termómetro de mercurio (-20 – 100°C), la temperatura del agua contenida en la charola de aluminio y la temperatura de los mangos fue monitoreada con un termopar. Una vez que la temperatura en el interior del mango alcanzó los 46.1°C se tomó el tiempo de tratamiento hasta alcanzar los 70 minutos. Posteriormente los mangos se dejaron enfriar a temperatura ambiente (20°C) por 30 minutos.

### **3.3.5 Extracción de los microorganismos de la superficie del mango.**

La superficie de los mangos se cortó con una cuchilla estéril en las zonas inoculadas, la cáscara se colocó en una bolsa para Stomacher, adicionando 100ml de medio BHI. Se colocaron las bolsas individualmente en un Stomacher a máxima velocidad por 1 minuto. Posteriormente se incubaron a 37°C por 5 h. Posteriormente se filtraron 20 ml de caldo BHI por un embudo con papel de filtración rápida estéril, se volvió a filtrar en un equipo Millipore con una membrana con poro de 0.45 µm.



### 3.3.6 Detección de *Salmonella* sp por PCR múltiple.

Para la detección de *Salmonella* sp por PCR múltiple se siguió el procedimiento descrito en los incisos 3.1.5 al 3.1.8 utilizando la membrana del equipo Millipore descrita en el inciso anterior.

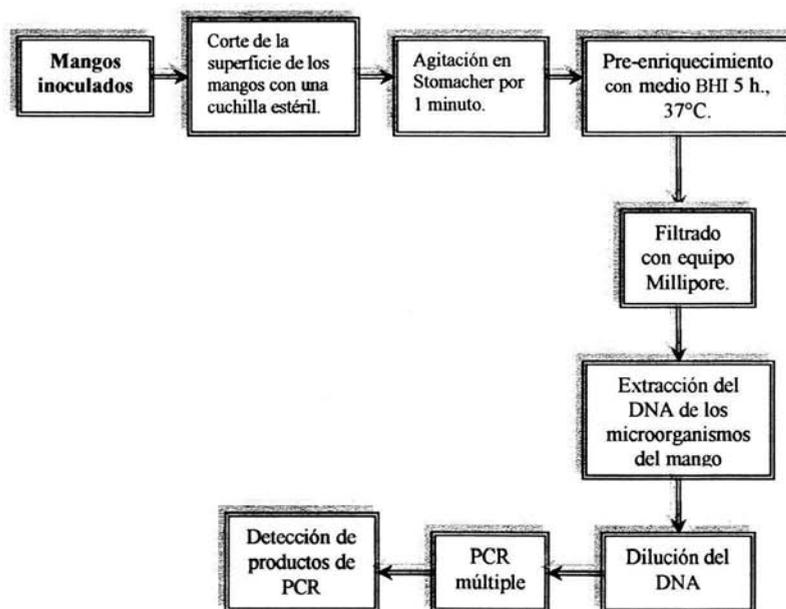


Figura 3.8. Diagrama de flujo general para la detección de *Salmonella* sp en la superficie del mango

### 3.4 Efecto del manejo poscosecha del mango de exportación en la incidencia de *Salmonella* sp. en una Compañía exportadora de Michoacán.

El manejo del mango poscosecha de la compañía exportadora de Michoacán se resume en el Figura 3.10. Este consiste en 5 etapas diferentes. El primer paso es la recepción de mangos de la cosecha, aún verdes y duros. Posteriormente pasan por una banda transportadora, hacia una máquina que los lava, por medio de aspersores de agua. Después de este proceso los mangos se colocan en cajas y son llevados a los tanques, para el tratamiento hidrotérmico, donde son calentados a 46.1°C por 90 minutos. De ahí se dejan enfriar a temperatura ambiente y



posteriormente pasan a un proceso de pulido (cepillado), ya que los mangos salen del proceso anterior con un color opaco. Este proceso consiste de una máquina con un par de cepillos, que frotan el mango para pulirlos, al final del proceso los mangos salen brillantes y listos para empacarse, que es la etapa final del proceso. Cabe mencionar que en esta etapa del proceso ninguno de los trabajadores contaba con guantes de látex, ni cofia, ni cubre bocas.

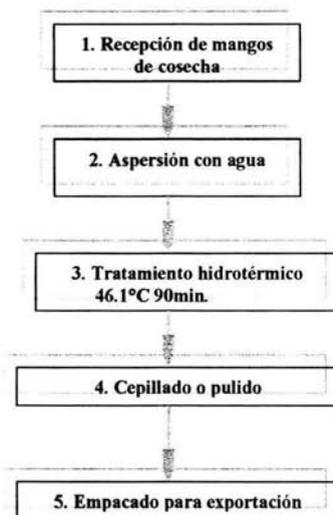


Figura 3.9. Proceso poscosecha de los mangos en la compañía exportadora de Apatzingán, Michoacán

### 3.4.1 Materiales

Se muestrearon un total de 20 mangos, a partir de diferentes etapas del proceso. Se muestrearon 4 de las 5 diferentes etapas del proceso de manejo (Figura 3.10; mangos recién llegados a la empacadora, mangos después del tratamiento hidrotérmico, mangos después del proceso de cepillado y finalmente mangos después del empacado. Los mangos fueron tomados con guantes de látex, estériles, y guardados en bolsas individuales con cierre (Ziploc). Durante el traslado los mangos se almacenaron en una hielera.



Así mismo se muestreó el agua de los dos diferentes tanques, en donde se realiza el tratamiento hidrotérmico, el agua se colocó en dos frascos de plástico estériles respectivamente.

### **3.5 Determinación de *Salmonella* sp. por PCR múltiple en los mangos (Figura 3.1.1).**

En la Figura 3.11 muestra el procedimiento que se siguió para determinar *Salmonella* sp. en los mangos de la compañía exportadora de Michoacán México. El procedimiento se realizó como está descrito en los incisos 3.1.1 al 3.1.7.

### **3.6 Cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios de la superficie de los mangos (Figura 3.1.1).**

Posteriormente al lavado de cada mango se tomaron un 0.5 ml de agua de lavado para hacer diluciones sucesivas con agua peptonada al 0.1% (Oxoid). Se inocularon por duplicado 0.1 ml de cada dilución en cajas petri de plástico con medio Agar cuenta en placa (Oxoid) y se esparcieron con una varilla de vidrio flameada. Las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C.

### **3.7 Determinación de *Salmonella* sp y cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios en el agua de tratamiento hidrotérmico.**

En la Figura 3.12, se muestra el procedimiento que se siguió para determinar *Salmonella* sp. en el agua. Para aislar los microorganismos del agua, se filtraron 20 mililitros por un embudo de filtración rápida y posteriormente se filtró en un equipo Millipore por una membrana con poro de 0.45 µm. Para extraer el DNA de los microorganismos se siguieron los procedimientos descritos en los incisos 3.1.4 al 3.1.8, además de la cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios que está descrita en el inciso 3.6.



### 3.8 Aislamiento y purificación de microorganismos de la superficie del mango

A partir de las cajas de agar cuenta en placa utilizadas para la cuantificación de microorganismos mesófilos aerobios, se tomaron 10 colonias diferentes para purificarlas en agar nutritivo, por la técnica de agotamiento utilizando un asa estéril. Se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente se verificó la pureza en la cajas. Una vez purificadas se realiza una tinción de Gram. A cada una de las colonias se les realizó las pruebas de catalasa y de oxidasa. Para la prueba de catalasa se utilizó peróxido de hidrógeno al 3% colocando una gota en un portaobjetos y tomando una asada de una colonia se coloca en contacto con el peróxido de hidrógeno. La presencia de burbujas indica una reacción positiva de la catalasa. Para la prueba de la oxidasa se colocó una muestra de una colonia en un papel filtro impregnado con diclorohidrato de tetrametil-*p*-fenildiamina al 1%. El cambio de color de azul a púrpura dentro de los 10 segundos indica una reacción positiva. Una vez purificadas pueden ser utilizadas para ser identificadas por el equipo Vitek®.

### 3.9 Identificación de cepas puras por el equipo Vitek®

Las cepas puras obtenidas (descritas en el inciso anterior) se mezclaron con solución salina estéril (0.85%) en tubos de ensaye para Vitek® hasta una transmitancia de 0.8 (de acuerdo al fabricante del equipo Vitek®). Una vez mezcladas las cepas puras en solución salina se colocó la manguera a la tarjeta correspondiente para cada cepa. La charola con las muestras y las tarjetas se colocó dentro de una cámara de vacío en el equipo Vitek® por tres minutos. Posteriormente se cortó la manguera en la sección de corte del equipo Vitek®, metiendo cada tarjeta en la cámara de corte. Se debe de asegurar que la manguera este bien cortada, de no ser así se corta con una navaja los restos de manguera. Las tarjetas con la muestra, se colocaron en los rieles del equipo y se dejaron por 24 h a 20°C. El equipo incubó las tarjetas realizaba las lecturas cada media hora.



### 3.10 Serología

#### 3.10.1 Antígeno somático (O)

##### 3.10.1.1 Preparación del antígeno

A partir de las cepas aisladas e identificadas en este caso para *Escherichia coli*, para el antígeno O se tomó una asada del cultivo puro y se inoculó por estria en agar inclinado, procurando que el medio quede cubierto de inoculó, en agar TSA (Oxoid), y de incuba a 37°C por 24 h. Una vez inoculado el cultivo se resuspendió en 8ml de solución salina al 0.8%, posteriormente se calentó a 105°C por 1.5 h. Una vez enfriado, se agregó solución de formalina (35% de formaldehído al 1% + 65% de solución salina estéril al 0.8%), hasta cubrir casi por completo el tubo de ensaye.

##### 3.10.1.2 Selección del suero puro

Posteriormente se transfirieron 50 µl del medio a placas con los sueros diluidos (especificos el antígeno O), se envuelven bien las cajas con plástico y se incuban a 50°C por 24 h. A las 24 h. se anotaron los que aglutinaron. De aquellos que aglutinaron se realizaron diluciones desde 1:100 (suero del rack) hasta 1:12800, con solución salina. Se inocularon con 50 µl del antígeno. Se incubada a 50°C por 24 h. Se leyeron los resultados y se comparó con el titulo homologa para obtener el suero puro a evaluar finalmente. Se realizan diluciones como se realizaron anteriormente (1:50-1:6400), trasfiriendo de la misma forma e incubando.

#### 3.10.2 Antígeno flagelar (H).

##### 3.10.2.1 Preparación del antígeno

Para el antígeno H se inoculó el microorganismo en un medio semisólido Colindale en condiciones estériles una asada del microorganismo dentro del tubo y se incubó a 30°C de 24 hasta 72 h para que se desarrolle adecuadamente el flagelo. Si no se observa crecimiento en la superficie



o dentro del medio que esta afuera del tubo, se considera que no contiene el antígeno H ya que no hay desarrollo de flagelo para su motilidad.

### 3.10.2.2 Selección del suero puro

A partir de la prueba de movilidad se tomó una asada y se inoculó en caldo Biotriptasa (Oxoid) incubando a 37°C por 24 h. Posteriormente realiza un el mismo procedimiento realizado con el antígeno O, probando diferentes sueros para el antígeno H. El tiempo de incubación es de 2 h a 50°C. Se igual manera se comparó con el titulo homologa para seleccionar los sueros puros, y finalmente se prueban los sueros puros realizando las mismas diluciones mencionadas para el antígeno O.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

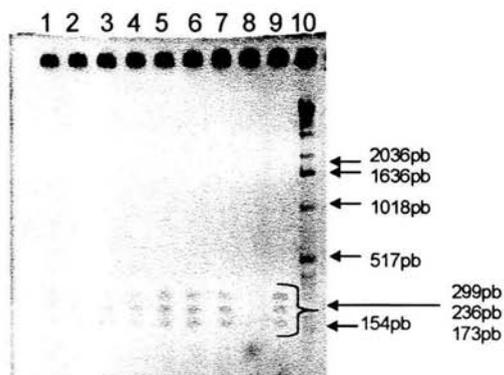
### **Efecto de diferentes tratamientos térmicos del mango en la sobrevivencia de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium.**

El mango es una fruta susceptible, en especial, a la descomposición provocada por hongos, como *Colletotrichum* que causa la antracnosis, así como *Rhizopus arrhizus* (Pathak, 1980), *Aspergillus niger* (Pathak, 1980), *Lasiodiplodia theobromae* (Johnson, 1993); además del ataque de algunas plagas como la mosca de la fruta y de insectos escamosos. Por ese motivo, una vez cosechado el mango, es sometido a un tratamiento térmico que elimina la mosca de la fruta en los estados de larva, y las plagas, así como la inactivación de los hongos causantes de la descomposición de la fruta. De esta manera se mejora la calidad del fruto tanto para su manejo como para la exportación del mismo. En el año 2000 ocurrió un brote de salmonelosis en Estados Unidos, debido a la presencia de *Salmonella* en mangos exportados de una huerta de Brasil (Ackerman, 2002). Esto ocurrió debido a que el agua del tratamiento hidrotérmico estaba contaminada con esta bacteria. Los tratamientos térmicos del mango no fueron diseñados para eliminar específicamente microorganismos patógenos como *Salmonella*, ni para reducir la carga microbiana de los microorganismos mesófilos aerobios. Por este motivo es de particular interés determinar el efecto de este tratamiento en la sobrevivencia de *Salmonella* en el mango sometida al tratamiento térmico.

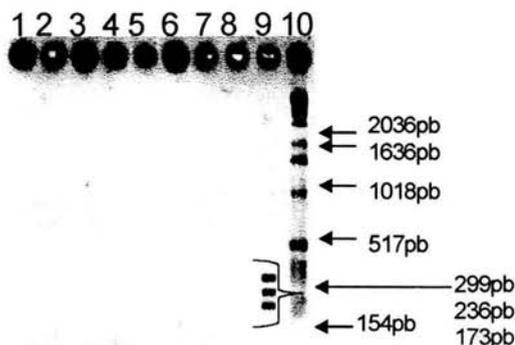


COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS HIDROTÉRMICOS CON MANGOS INOCULADOS  
Y MANGOS SIN INOCULAR.

4.1 Tratamiento hidrotérmico



**Figura 4.1** Carriles 1-7 mangos inoculados sin tratamiento hidrotérmico (46.1°C 45min), carril 8 control negativo, carril 9 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028), carril 10 Marcador de peso molecular (0.07-0.12kb Boehringer Mannheim).



**Figura 4.2** Carriles 1-7 mangos inoculados con tratamiento hidrotérmico (46.1°C 45min), carril 8 control negativo, carril 9 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028), carril 10 Marcador de peso molecular (0.07-0.12kb Boehringer Mannheim).

Como indica la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural un requerimiento indispensable para la exportación de los mangos es que éstos hayan sido previamente sometidos a un tratamiento térmico. Se exige el tratamiento hidrotérmico a 46.1°C por un periodo variable de 65-90 minutos dependiendo del peso del fruto. Esto con el fin de eliminar la mosca de la fruta y evitar problemas con hongos que causan la descomposición del mango.

Para evaluar el efecto del tratamiento hidrotérmico en la calidad e inocuidad del mango, se analizaron dos condiciones de tratamiento hidrotérmico, 46°C por 90 y 70 minutos respectivamente. En este último se analizó además la concentración de microorganismos mesófilos aerobios.



#### 4.1.1 Detección de *Salmonella*

Con el objetivo de determinar la sobrevivencia de *Salmonella* en el mango, se inoculó la superficie de 14 mangos con *Salmonella* Typhimurium en una concentración de 4.5 UFC por mango. De los mangos inoculados, 7 fueron usados como control, y no se sometieron a ningún tratamiento térmico. A los 7 restantes se les dio un tratamiento hidrotérmico a 46.1°C por 70 minutos. En la figura 4.1 se pueden apreciar las bandas características de *Salmonella* en los 7 mangos y en la figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos con los mangos inoculados que fueron sometidos al tratamiento hidrotérmico. No se observaron bandas en los carriles 1 al 7, lo que indica que el tratamiento hidrotérmico eliminó a *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium. El carril 8 es el control negativo, donde no se debe de observar ninguna banda y con el control positivo en el carril 9 se confirma la reacción de PCR.

Para evaluar la presencia y sobrevivencia de *Salmonella* en mangos sin inocular, se muestrearon 5 mangos, los cuales fueron sometidos a tratamiento hidrotérmico a 46.1°C por 65 minutos. En la figura 4.3 se corrobora la presencia de *Salmonella* en los 5 mangos control, mientras que no hay bandas que indiquen la presencia de *Salmonella* en la superficie de los mangos después de este tratamiento térmico (Figura 4.4). No se encuentran en la literatura estudios referentes a bacterias patógenas en el mango, se han reportado únicamente microorganismos coliformes en productos procesados del mango, entre los que se identificaron *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Rahnella aquatilis* (O'Connor-Shaw, 1995). Estudios realizados con tomates, demostraron que en esta hortaliza, inoculada con *Salmonella* y almacenada a temperaturas entre 20 y 30°C por periodos de hasta 3.6 días (Zhuan, *et al.*, 1995), incrementaban las cuentas de este patógeno a partir de las 22 hrs. Un estudio realizado con mangos demostraron que existe internalización de este microorganismo en un 80% en mangos inmaduros y de un 87% en mangos maduros. El tratamiento aplicado era de 46°C por 90 minutos con un



enfriamiento en agua (que contenía *Salmonella enterica* Enteritidis) 22°C por 10 minutos (Penteado *et al.*, 2004).

Puede haber internalización al aplicar el tratamiento hidrotérmico sin embargo de los mangos, lo que explica que no sea detectable *Salmonella* después del tratamiento hidrotérmico debido a que no sobrevivió al tratamiento. Los mangos inoculados que se sometieron a tratamiento hidrotérmico no fueron sometidos a hidrogenfriamiento, se enfriaron a temperatura ambiente (20°C) por un periodo de 20 minutos.

Cuando los mangos se someten al tratamiento hidrotérmico y probablemente a cualquier tratamiento térmico, y posteriormente son enfriados en agua a una temperatura baja, disminuye la presión interna del fruto lo que produce que se internalice *Salmonella*. y ésta además pueda sobrevivir un mes a 10, 20 y 30°C en el interior de la fruta (Penteado *et al.*, 2004).

#### 4.1.2 Concentración de microorganismos mesófilos aerobios

En la tabla 4.1 se presenta la concentración de microorganismos mesófilos aerobios de los mangos sin inocular con diferentes tratamientos térmicos. La concentración promedio fue de  $1.7 \times 10^8$  UFC/mango para los mangos control (sin ningún tratamiento térmico y sin inocular). Existe una variación de la concentración de microorganismos mesófilos aerobios de  $10^5$  hasta  $10^8$  UFC/mango. Los mangos con tratamiento hidrotérmico tuvieron una concentración final de  $2.1 \times 10^7$  UFC/mango, es decir la cuenta se redujo únicamente un ciclo logarítmico con respecto a los mangos control. En un estudio realizado con germinados de alfalfa se encontró que se puede lograr la misma reducción de un ciclo logarítmico lavando con agua (Castro-Rosas y Escartin, 2000), es decir que el tratamiento hidrotérmico tiene el mismo efecto que el lavado, por lo que no funciona como método de control de calidad en la inocuidad del mango. Sería necesario adaptar las condiciones del mismo a la mejora de la inocuidad del mango. Sin embargo existen ciertas limitaciones como lo es el factor tiempo-temperatura, ya que un tratamiento mayor al establecido para el mango (46°C 65 minutos) afecta su calidad. Se ha observado la aparición de manchas en la piel, daño en las lenticelas y



regiones donde se acumula el almidón, con tratamiento hidrotérmico a 46°C por periodos de 65 minutos (Jacobi *et al.*, 2000).

**Efecto de los diferentes tratamientos térmicos en la incidencia de *Salmonella* sp, en mangos de la Central de Abastos México D.F. sin inocular.**

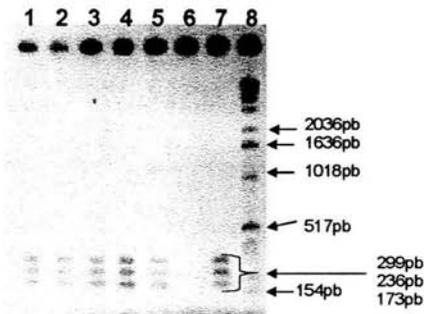


Figura 4.3 Carriles 1-5 Mangos control de la central de abastos, sin inocular (controles para las figuras 4.4-4.7). Carril 6 control negativo, carril 7 control positivo, carril 8 marcadores de peso molecular (0.07-0.12kb Boehringer Mannheim)

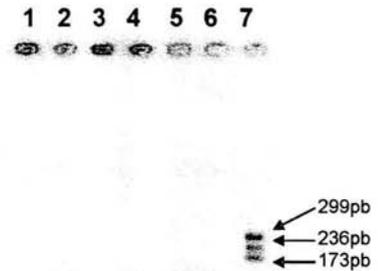


Figura 4.4 Carriles 1-5 Producto de PCR de los mangos (tratamiento hidrotérmico 46.1 °C/65min), carril 6 control negativo, carril 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028).

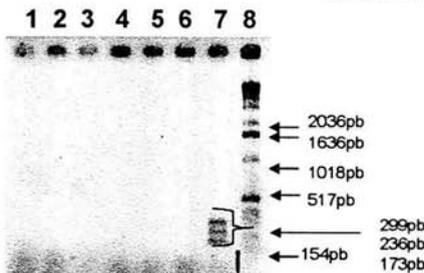


Figura 4.5 Carriles 1-5 Producto de PCR de los mangos (tratamiento con vapor 46 °C/10min), carril 6 control negativo, carril 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028), carril 8 marcadores de peso molecular 0.07 -0.12Kb Boehringer Mannheim)

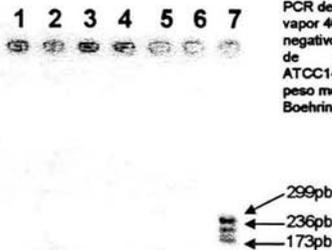


Figura 4.6 Carriles 1-5 Mangos con tratamiento de vapor (46°C/20min) de la central de abastos, carril 6 control negativo, carril 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC

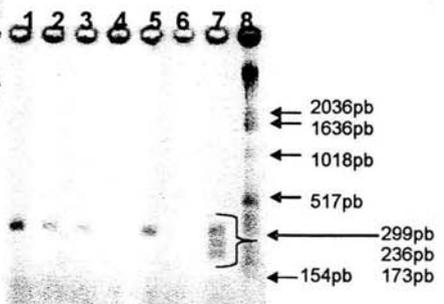


Figura 4.7 Carriles 1-5 mangos con tratamiento de aire seco (46.1°C/180min), carril 6 control negativo, carril 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC



Tabla 4.1. Cuenta de microorganismos mesófilos aerobios de los mangos antes y después de los tratamientos térmicos.

Mango	Tratamiento térmico	UFC/mango	Promedio de UFC/mango ± Desv. estandar
1	Sin tratamiento	$2.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^8 \pm 3.7 \times 10^8$
2	Sin tratamiento	$2 \times 10^6$	
3	Sin tratamiento	$5.1 \times 10^5$	
4	Sin tratamiento	$8.5 \times 10^8$	
5	Sin tratamiento	$1 \times 10^6$	
6	Tratamiento hidrotérmico 46°C/65min.	$1 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7 \pm 4.3 \times 10^7$
7	Tratamiento hidrotérmico 46°C/65min.	$1.7 \times 10^6$	
8	Tratamiento hidrotérmico 46°C/65min.	$2.7 \times 10^5$	
9	Tratamiento hidrotérmico 46°C/65min.	$1.7 \times 10^6$	
10	Tratamiento hidrotérmico 46°C/65min.	$6.1 \times 10^6$	
11	Tratamiento con vapor 46°C/10min.	$6.6 \times 10^8$	$1.7 \times 10^9 \pm 2.7 \times 10^9$
12	Tratamiento con vapor 46°C/10min.	$1.2 \times 10^7$	
13	Tratamiento con vapor 46°C/10min.	$6.6 \times 10^9$	
14	Tratamiento con vapor 46°C/10min.	$1 \times 10^9$	
15	Tratamiento con vapor 46°C/10min.	$6.2 \times 10^8$	
16	Tratamiento con vapor 46°C/20min.	$2.3 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5 \pm 4.1 \times 10^5$
17	Tratamiento con vapor 46°C/20min.	$9.5 \times 10^3$	
18	Tratamiento con vapor 46°C/20min.	$3.9 \times 10^2$	
19	Tratamiento con vapor 46°C/20min.	<1000	
20	Tratamiento con vapor 46°C/20min.	$9.4 \times 10^5$	
21	Tratamiento con aire seco 46°C/180min.	$1.2 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$
22	Tratamiento con aire seco 46°C/180min.	$4.1 \times 10^5$	
23	Tratamiento con aire seco 46°C/180min.	$4.4 \times 10^6$	
24	Tratamiento con aire seco 46°C/180min.	$5.5 \times 10^5$	
25	Tratamiento con aire seco 46°C/180min.	$8.6 \times 10^5$	

Nota: Los promedios son resultado de cuentas por duplicado en Agar cuenta en placa.



## 4.2 Tratamiento con vapor

El tratamiento con vapor es otra forma de aplicación de el tratamiento térmico al mango. Este método presenta desventajas en comparación con el hidrotérmico. Entre ellas, se requiere un mayor tiempo para que la temperatura en la superficie de la fruta alcance la temperatura de tratamiento. Una ventaja es un menor gasto de agua.

Con el objetivo de determinar el efecto del tratamiento con vapor en la sobrevivencia de *Salmonella*, se muestrearon 10 mangos sin inocular, de los cuales 5 fueron sometidos a tratamiento con vapor a 46.1°C por un periodo de tiempo de 10 minutos y 5 con el mismo tratamiento por un periodo de 20 minutos.

### 4.2.1 Detección de *Salmonella*

Los controles para este tratamiento fueron 5 mangos sin inocular que no recibieron ningún tratamiento térmico. En la figura 4.3 se observan 3 bandas en cada uno de los carriles (1 al 5). Estas son idénticas que en el carril 9, donde se encuentra el control positivo, lo que demuestra la presencia de *Salmonella*. En las figuras 4.5 y 4.6 se presentan los resultados para los mangos después del tratamiento con vapor por 10 y 20 min a 46°C minutos respectivamente. No se detectó la presencia de *Salmonella* en ambos casos, por tanto cualquiera de estos dos tratamientos con vapor resultan eficaces para eliminarla.

### 4.2.2 Concentración de microorganismos mesófilos aerobios

Se evaluó la concentración de microorganismos mesófilos aerobios en la superficie del mango con el tratamiento térmico con vapor (46°C por 10 y 20 minutos respectivamente). En la tabla 4.1 se presentan estos resultados. Los mangos control (sin ningún tratamiento térmico) presentaron una concentración promedio de  $1.7 \times 10^8$  UFC/mango. Las concentraciones finales observadas después del tratamiento con vapor fueron de  $1.7 \times 10^9$  y  $1.9 \times 10^5$  después de 10 y 20 minutos de tratamiento respectivamente. En el primer caso se observa un incremento de un ciclo logarítmico en la



concentración con respecto al control, mientras que en el segundo caso, se observa una mayor variación entre las muestras en la concentración de mesófilos, desde  $2.3 \times 10^4$ , hasta  $<1000$  UFC/mango. Se observó una reducción de tres ciclos logarítmicos en la concentración con respecto al promedio de los controles. Esto indica que los tiempos cortos de tratamiento térmico favorecen el crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios, y esto indica que puede favorecerse el crecimiento de microorganismos patógenos. Se ha demostrado el crecimiento de *Salmonella* y mesófilos aerobios en productos frescos como el tomate (Zhuang *et al.*, 1995), así como *Salmonella* y microorganismos mesófilos aerobios en alfalfa (Castro-Rosas y Escartín., 2000) y se encontró, en tomates, que los microorganismos mesófilos aerobios incrementaban su crecimiento dos ciclos logarítmicos en periodos de almacenamiento de 22 hrs a temperaturas de 20 y 30°C (Zhuan, *et al.*, 1995). Estudios realizados en germinados de alfalfa y en tomates, demuestran que el crecimiento de *Salmonella* y de coliformes se daba junto con los microorganismos mesófilos aerobios, aunque en algunos casos, cuando la concentración de mesófilos aerobios alcanza un valor de  $10^8$ , el crecimiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* se mantenía constante (Castro-Rosas y Escartín, 2000; Zhuan, *et al.*, 1995). El incremento en la concentración de microorganismos mesófilos aerobios puede ser un indicativo del incremento en la concentración de microorganismos patógenos. En el caso del tratamiento con vapor, sería recomendable que se aplicara durante 20 minutos. Los daños por tratamiento con vapor son considerables cuando el tratamiento dura 3-5 horas (Jacobi *et al.*, 2000), por lo que no es posible utilizar un mayor tiempo con este tratamiento, por ejemplo 35 minutos.

#### 4.3 Tratamiento con aire seco

El tratamiento con aire seco es un método sencillo, debido a que no es necesario el uso de maquinaria compleja. Las desventajas de este método son: no limpia el mango como lo hace el hidrotérmico, el tiempo requerido para el tratamiento es mayor, debido a que el tiempo necesario para que la superficie de la fruta alcance la temperatura de tratamiento es el más prolongado de los



tres tipos de tratamiento. Si el flujo de aire no es constante, al igual que la temperatura, se pueden presentar zonas “frías” en la fruta, que llevan a un inadecuado tratamiento térmico (Jacobi *et al.*, 2001).

Para evaluar el efecto de este tratamiento, se determinó la presencia de *Salmonella* y la concentración de microorganismos mesófilos aerobios. Se muestrearon 5 mangos sin inocular, que fueron sometidos a tratamiento con aire seco a 46°C por un periodo de 180 minutos. Se determinó la presencia de *Salmonella* por PCR múltiple y se realizó un conteo de microorganismos mesófilos aerobios.

#### 4.3.1 Detección de *Salmonella*

En la figura 4.7 se observa la presencia de una banda en cada uno de los carriles 1, 2, 3 y 5, que son el producto de amplificación de un fragmento de un tamaño de 299 pb. Este fragmento corresponde a una región del locus *phoP/phoQ*, perteneciente a un regulador de fosforilación involucrado en la expresión de genes de virulencia y sobrevivencia en el macrófago que está presente en enterobacterias patógenas (Way *et al.*, 1993). Esto indica entonces la posible presencia de algunos patógenos, entre los que podemos encontrar a *Escherichia coli*. Además es una bacteria que indica malas condiciones de higiene y sanidad. Way *et al.* (1993), analizando diferentes cepas de microorganismos para evaluar la detección selectiva de *Salmonella* por PCR múltiple, encontraron que algunas especies de microorganismos (*Salmonella pullorum*, *S. gallinarum*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Citrobacter freundii*) mostraban una sola banda de 299pb al realizar el PCR, mientras que las bandas de 236 pb y 173 pb no se observaban. No se descarta entonces la presencia de alguno de estos microorganismos.

La presencia de *E. coli* se confirmó aislando 10 cepas obtenidas de la superficie del mango, a partir de las placas de agar cuenta en placa. Posteriormente fueron purificadas e identificadas por el método Vitek<sup>®</sup> y una de ellas fue identificada como *E. coli* con un 99% de seguridad (tabla 4.2).



#### 4.3.2 Concentración de microorganismos mesófilos aerobios

Se determinó la concentración de microorganismos mesófilos aerobios en la superficie del mango y el efecto del tratamiento con aire seco (46°C por 180 minutos), en su concentración final, con respecto al control.

En la tabla 4.1 se observa que los mangos tratados con aire seco presentan una concentración de  $1.4 \times 10^6$  UFC/mango, en comparación con los controles, que tienen una concentración de  $1.7 \times 10^8$  UFC/mango. De esta manera se puede observar una reducción dos ciclos logarítmicos en la concentración final. Zhuan *et al.* (1995), mediante la aplicación de diferentes concentraciones de cloro libre, logran una reducción de tan solo un ciclo logarítmico (110ppm de cloro libre) en la inactivación de *Salmonella*. El tratamiento con aire seco logra la eliminación de *Salmonella*, y una reducción similar en los microorganismos mesófilos aerobios, por lo que tiene una efectividad similar a la del tratamiento con cloro (110ppm).

#### 4.4 Aislamiento e identificación de microorganismos de la superficie del mango

Se aislaron 10 cepas diferentes de microorganismos de la superficie del mango a partir de cajas de agar cuenta en placa, que fueron usadas para la cuantificación de los microorganismos mesófilos aerobios. Estas se purificaron en agar nutritivo, y posteriormente se les hizo tinción de gram y las pruebas de la catalasa y oxidasa para que una vez puras fueran identificadas por el equipo Vitek®. Esto con el fin de conocer la microbiota representativa de la superficie del mango y la búsqueda de *Salmonella*.

Los resultados se muestran en la tabla 4.2. Se observó que de las 10 cepas aisladas se obtuvieron 7 bacterias Gram positivas y solo 3 Gram negativas, de las cuales solo se identificaron 3 bacterias por el método Vitek®, y una levadura presuntamente, identificada por observación al microscopio,



pero sin confirmarse. De las 3 bacterias identificadas, dos bacterias Gram positivas, con morfología de cocos grandes en racimos fueron identificadas como *Enterococcus gallinarum*. Esta bacteria generalmente está asociada a *E. coli* y se ha aislado a partir de heces de pollo. La importancia de este microorganismo a nivel clínico radica en la capacidad de producir infecciones en el tracto urinario, así como bacteremia, endocarditis, infecciones intrabdominales, y pelvianas, infecciones en tejidos blandos y heridas. Además se puede desarrollar a 45°C y es resistente a diversos antibióticos (Koneman, 2000). *Escherichia coli* es en muchos casos una bacteria de importancia clínica, y en alimentos es de importancia a nivel salud pública, ya que además de indicar prácticas inadecuadas de higiene, existen serotipos capaces de causar enfermedades. Se determinó que la cepa aislada pertenece al serotipo O111:H6, que es una cepa patógena se ha reportado como enteroagregativa (aunque para demostrarlo es necesario realizar pruebas de adherencia). Los síntomas causados por este tipo de cepas son características diarreas principalmente en lactantes. Produce lesiones caracterizadas por la destrucción de las células de borde de cepillo, unión íntima de la bacteria con la membrana enterocítica y la formación de una capa fundamental de actina polimerizada en la célula huésped (Kobayashi *et al.*, 2000). La enfermedad causada por las cepas EPEC (*Escherichia coli* enteropatogénica) se caracteriza por malestar, vómitos, fiebre y diarrea, con una cantidad importante de moco. (Koneman, 2000). Las cepas EAEC (por sus siglas en inglés Enteroagregative *E. coli*) se asocian con diarrea persistente (> de 14 días) en niños, en países en vías de desarrollo. También de asocia con diarreas de adultos.



Tabla 4.2 Identificación de microorganismos obtenidos y aislados de la superficie del mango

Cepa	Tinción de Gram	Morfología	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa	Microorganismo Identificado por Vitek®
1	+	Bacilos medianos	+	-	No identificado
2	+	Bacilos medianos	+	-	No identificado
3	+	Bacilos medianos	+	-	No identificado
4	-	Levaduras	+	-	Levadura**
5	+	Bacilos largos	+	+	No identificado
6	-	Bacilos chicos	+	-	<i>Escherichia coli</i>
7	+	Cocos grandes en racimos	+	-	No identificado
8	+	Cocos chicos en racimos	-	-	<i>Enterococcus gallinarum</i>
9	+	Cocos en racimos	-	-	<i>Enterococcus gallinarum</i>
10	-	Bacilos largos	+	-	No identificado

\*\* no identificado en el equipo Vitek®

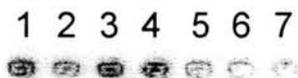


#### **4.5 Efecto del manejo poscosecha del mango de exportación de una compañía exportadora en Apatzingán, Michoacán.**

En la compañía exportadora de Michoacán que se estudió, todos los mangos que son procesados pasan a través de un manejo establecido postcosecha, antes de ser exportado el mango. En primer lugar, como se muestra en la figura 6, se recolectan los mangos, posteriormente estos pasan a través de una banda transportadora en donde son lavados mediante aspersión con agua. Al terminar este proceso se pesan los mangos y se someten a tratamiento hidrotérmico a 46.1°C por un periodo de 90 minutos. Al salir del tratamiento son enfriados a temperatura ambiente, posteriormente son cepillados en una máquina con un par de cepillos de unicel, para finalmente ser empacados a mano. Se muestrearon y analizaron un total de 20 mangos. Se muestrearon de las siguientes etapas del proceso: mangos de cosecha, mangos con tratamiento hidrotérmico, mangos después del proceso de cepillado, mangos empacados además, del agua utilizada en el tratamiento hidrotérmico

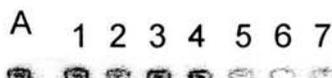


Detección de *Salmonella* sp. en mangos de una compañía exportadora de Apatzingán.



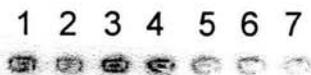
299pb  
 236pb  
 173pb

**Figura 4.8.-** Carriles 1-5 mangos de cosecha; carril 6 control negativo; carriles 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028).



299pb  
 236pb  
 173pb

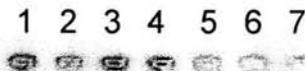
**Figura 4.9** Carril A, agua utilizada para el tratamiento hidrotérmico. Carriles 1-5, mangos muestreados después del tratamiento hidrotérmico (46°C/90min.); carril 6 control negativo; Carriles 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028).



299pb

299pb  
 236pb  
 173pb

**Figura 4.10.-** Carriles 1-5 mangos muestreados del proceso de cepillado; carril 6 control negativo; carril 7 control positivo (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028).



299pb  
 236pb  
 173pb

**Figura 4.11-** Carriles 1-5 mangos muestreados del proceso de empacado; carril 6 control positivos (DNA de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028).



**Tabla 4.3** Cuantificación de los microorganismos mesófilos aerobios en el mango de una compañía exportadora de mangos en Apatzingán, Michoacán.

Mangos	Etapas del proceso	UFC / mango
001	Recolección	3.1 x10 <sup>5</sup>
002	Recolección	Incontable
003	Recolección	1.5 x10 <sup>4</sup>
004	Recolección	1.1 x10 <sup>5</sup>
005	Recolección	3.1 x10 <sup>5</sup>
Promedio		1.9 x10 <sup>5</sup>
006	Tratamiento hidrotérmico	Incontable
007	Tratamiento hidrotérmico	2.8 x10 <sup>5</sup>
008	Tratamiento hidrotérmico	4.8 x10 <sup>4</sup>
009	Tratamiento hidrotérmico	3.0 x10 <sup>5</sup>
010	Tratamiento hidrotérmico	Incontable
Promedio		2.1 x10 <sup>5</sup>
011	Cepillado	> 2 x10 <sup>5</sup>
012	Cepillado	> 2 x10 <sup>5</sup>
013	Cepillado	> 2 x10 <sup>5</sup>
014	Cepillado	> 2 x10 <sup>5</sup>
015	Cepillado	> 2 x10 <sup>5</sup>
Promedio		> 2 x10 <sup>5</sup>
016	Empacado	5.7 x10 <sup>6</sup>
017	Empacado	3.1 x10 <sup>9</sup>
018	Empacado	1 x10 <sup>8</sup>
019	Empacado	1 x10 <sup>7</sup>
020	Empacado	8.5 x10 <sup>6</sup>
Promedio		6.4 x10 <sup>8</sup>
Agua de tratamiento hidrotérmico		1 x10 <sup>9</sup>



#### 4.5.1 Detección de *Salmonella*

En la figura 4.8 se presentan los resultados de los mangos obtenidos de la cosecha. En ninguno de ellos se observó la presencia de *Salmonella* sp. En la figura 4.9 se presentan los resultados de los mangos después del tratamiento hidrotérmico (46.1°C 65 minutos), donde no se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguno de los mangos, ni en el agua de tratamiento hidrotérmico de los dos tanques en donde se realiza el tratamiento (carril A). En la figura 4.10 se presentan los resultados de los mangos después del cepillado y el resultado del agua de tratamiento hidrotérmico en el carril 10. No se detectó la presencia de *Salmonella* en los carriles 2 al 5, pero se observa en el carril 1, una banda de 299 pb, que indica la posible presencia de enterobacterias patógenas, dentro de las que se pueden encontrar *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei*. La posible presencia de *Escherichia coli* se confirmó por el método Vitek<sup>®</sup>, a partir de la superficie de los mangos, por lo que sería necesario mejorar los tratamientos térmicos. No es conveniente, sin embargo, realizar un tratamiento más drástico, ya que este produciría daños en la piel del mango, como lo es el oscurecimiento de las lenticelas, daño en las lenticelas, retención en la madurez del mesocarpio, así como el lento desarrollo en el color del mango maduro (Jacobi *et al.*, 2000).

Después del cepillado y del proceso de empacado no detecto la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras, como se observa en las figuras 4.10 y 4.11 respectivamente; sin embargo en un mango después del proceso de cepillado se observa la presencia de enterobacterias patógenas. Los procesos de cepillado requieren de un mejor control sanitario, y en el caso del empacado mejorar las prácticas de empacado para evitar problemas de inocuidad.

#### 4.5.2 Concentración de microorganismos mesófilos aerobios

Se evaluó la concentración de microorganismos mesófilos aerobios en cada etapa del proceso de manejo del mango, en la tabla 4.2 se presentan los resultados. Se observa que a pesar del



tratamiento postcosecha, la concentración de microorganismos mesófilos aerobios se mantuvo constante a partir de la cuenta inicial en los mangos de cosecha ( $1.9 \times 10^5$  UFC/mango), después del tratamiento hidrotérmico y posterior al cepillado. Sin embargo, la concentración promedio de los mesófilos posterior al empacado fue de  $6.4 \times 10^8$  UFC/mango, es decir la concentración se incrementó en 3 ciclos logarítmicos. Aunque el objetivo de los tratamientos térmicos es la eliminación de la mosca de la fruta y de los hongos causantes de la descomposición de la fruta del mango, se esperaba que el tratamiento dado al mango redujera las cuentas de mesófilos, como en el tratamiento hidrotérmico dado a los mangos no inoculados (tabla 4.1), en donde se observó la reducción de la concentración de mesófilos en un ciclo logarítmico. Es posible que algunos microorganismos se puedan desarrollar a pesar del tratamiento aplicado al mango. En un estudio realizado con tomates, se desinfectaba la superficie con cloro, logrando solo la reducción de un ciclo logarítmico en la concentración de microorganismos mesófilos aerobios, y observaron que se incrementaba la concentración en un ciclo logarítmico a  $5^\circ\text{C}$  y 2.5 ciclos a  $20$  y  $30^\circ\text{C}$  (Zhuang *et al.*, 1995).

Es importante señalar que la higiene de la empacadora era deficiente y que las personas que empacaban los mangos a mano, no usaban guantes, ni cofia ni cubrebocas.



## 5.0 CONCLUSIONES

Los tratamientos postcosecha del mango se han diseñado para eliminar la mosca de la fruta y los hongos que causan su descomposición. Los problemas recientes relacionados con la inocuidad de este fruto muestran la importancia de investigar el efecto del tratamiento hidrotérmico al que deben someterse los mangos para evitar la sobrevivencia de bacterias patógenas, como *Salmonella*, así como de tratamientos alternativos. Se estudió el efecto de diferentes tratamientos térmicos en la sobrevivencia de *Salmonella* y en la concentración de microorganismos mesófilos aerobios.

Todos los tratamientos térmicos evaluados fueron adecuados para la eliminación de *Salmonella*, excepto el tratamiento con aire caliente, en el que sobrevivió otro tipo de bacteria patógena.

- ☛ El tratamiento hidrotérmico a 46.1°C por 45 minutos es adecuado para la eliminación de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, en la superficie del mango.
- ☛ Con todos los tratamientos térmicos se logró una reducción en la cuenta de los microorganismos mesófilos aerobios de por lo menos una unidad logarítmica (tratamiento hidrotérmico a 46°C por 65 minutos), hasta una reducción de tres unidades logarítmicas (tratamiento de vapor 20 minutos, 46.1°C), con la excepción del tratamiento de vapor por 10 minutos, con el que en vez de reducción se obtuvo un incremento en la cuenta de una unidad logarítmica por arriba de los controles.
- ☛ De los microorganismos aislados de la superficie del mango se identificaron *Enterococcus gallinarum* y un serotipo de *Escherichia coli* reportado como patógeno. La presencia de estos microorganismos indica el manejo sanitario defectuoso, y la presencia de un serotipo patógeno de *E. coli* la necesidad de estudiar la incidencia de cepas patógenas de esta especie.



- ☞ No se detectó la presencia de *Salmonella* sp en los mangos muestreados en una compañía empacadora de Michoacán; sin embargo en algunas muestras se detectó la posible presencia de enterobacterias patógenas. Sería necesario muestrear otras compañías exportadoras de mangos a fin de conocer las condiciones con que son manejados y exportados.
  
- ☞ Se hizo evidente la falta de un manejo higiénico de los mangos, ya que la concentración de microorganismos mesófilos aerobios se incrementó en vez de disminuir durante el tratamiento postcosecha. Es urgente la necesidad de mejorar las condiciones de limpieza, el intercambio de agua del tratamiento hidrotérmico, o su sanitización, el lavado de los mangos adecuadamente, el empaquetado higiénico, para evitar problemas de inocuidad en los mangos de exportación. Es necesario implementar las buenas prácticas de higiene y sanidad en la compañía para evitar problemas de inocuidad y así mismo repercusiones económicas al rechazarse los mangos para exportarse principalmente hacia Estados Unidos.
  
- ☞ Es necesario e imperante que se tome una mayor conciencia de los riesgos que los frutos frescos y hortalizas en general pueden llegar a acarrear por medio de los microorganismos patógenos, para evitar problemas a nivel salud pública y a nivel económico.



## PERSPECTIVAS

- ☞ Evaluar la formación de biopelículas de *Salmonella* y *Escherichia coli* en la superficie del mango para conocer la sobrevivencia de estos patógenos en el mango con el tratamiento hidrotérmico, durante su manejo poscosecha y durante la exportación. Así como su manejo en fresco para consumo en el país de origen en este caso en México.
- ☞ Es necesario evaluar si existe penetración de *Escherichia coli* hacia el interior del mango, debida al tratamiento hidrotérmico.
- ☞ Es necesario evaluar si existe penetración y sobrevivencia de *Salmonella* inoculando previamente al tratamiento térmico con y sin hidrogenfriamiento en el mango.
- ☞ Es necesario evaluar más compañías de exportación de mangos a fin de conocer las condiciones de manejo poscosecha del mango.
- ☞ Conocer la microbiota predominante del mango a fin de conocer las posibles interacciones de los microorganismos en la sobrevivencia en la superficie del mango.
- ☞ Evaluar la presencia y/o sobrevivencia de otros patógenos de interés a fin de evitar problemas con el mango de exportación y/o de consumo interno del país.
- ☞ Desarrollar nuevos procesos térmicos y/o alternativos a los tratamientos térmicos a fin de conseguir un mejor control microbiológico y una adecuada calidad de exportación del mango fresco.



## APÉNDICE A

### I. Solución Tris 0.5M

Peso molecular tris = 121.1 g/mol

Se necesita adicionar HCl concentrado para tener un pH final de 7.0.

### II. Solución de EDTA 0.5M

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

### III. Solución de NaCl 5M

Peso molecular NaCl = 58g/mol. Disolver 290g de NaCl cristal (Sigma) en 1L de agua destilada.

### IV. Buffer TBE 5X

Tris – borato

- 54g de Tris base
- 27.5g de ácido bórico
- 20ml de EDTA 0.5M (pH= 8.0)
- mezclar todo perfectamente en 1L de agua destilada.

### V. Formalina

Solución salina 0.85%

Formol 0.6%

Mezclar disolviendo 8.76 gr de NaCl con 6 ml de formaldehído en un litro de agua destilada



## BIBLIOGRAFÍA

**Baltierra Mena G.P.** 2003. Determinación de *Salmonella* sp. En la superficie del mango por PCR múltiple. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F. pp 61-62.

**Castro-Rosas. J., Escarpín E.F.,** 2000. Survival of *Vibrio cholerae* 01, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* 0157:H7 in Alfalfa sprouts. *Journal of Food Science*. 65(1) 162-165.

**Comisión Nacional de Fruticultura.** 1974. El mango en México. Serie de Investigaciones fisiológicas No. 3. SAG/México

**Comisión Nacional de Fruticultura.** 1980. El mercado exterior frutícola. Boletín bimestral año 1 número 01. México D.F.

**Darnell James, David Baltimore, Paul Matsudaira, S. Lawrence Zipursky, Arnold Berk, Harvey Lodish,** 2003. Biología Celular y Molecular. Ed. Medica Panamericana.. pp. 246-247.

**Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J.,** 2001. Food Microbiology Fundamentals and frontiers. ASM Press 2<sup>nd</sup> edition. Washington, D.C. pp. 141-178.

**Evaluation of hot water treatments of mango under simulated transportation and distribution.** IFT Annual Meeting 1995 pp. 83.

**Haard N. F., Salunkhe D.K.** Symposium: Postharvest biology and handling of fruits and vegetables. Westport, Connecticut. The Avi Publishing company, Inc. 1975. pp. 81-117



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

**Hulme, A.C. 1971.** The Mango, Chapter 6 In: Hulme A.C. "The Biochemistry of fruits an their products". Vol. 2. Hulme, A.C. Academic Press Inc. London, pp. 233-254.

**Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2003.**

Departamento de difusión disponible en: <http://www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/fbuscar.html>

**Infoagro 2003.** Disponible en: [http://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/mango.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango.htm)

**Jacobi K.K., MacRae E.A. y Hetherington S.E. 2001.** Postharvest heat desinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae*. 89: 171-193.

**Johnson, G.I., Coates, L.M. 1993** Postharvest disease of mango. Postharvest News and information.

**Join Institute of Food Safety and Applied Nutrition. FDA.** Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: Manual de formación para instructores. Universidad de Meryland 2002.  
Organización mundial de la salud (OMS/WHO).

**Journal or Horticultural science & Biotechnology, 1991.** 73 (5) 589-597,26.

**Keryl K.J., Elspeth A., MacRae S.E., Hetherington. 2001.** Postharvest heat desinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae* .89: 171-193.



**Khader, S. 2000.** Indicadores básicos del manejo postcosecha del mango: recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. En: Postharvest Technology Research and Information Center. Department of Pomology. University of California.

Disponible en:

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

**Kobayashi R.K.T., Saridakis H.O., Dias A.M.G., Vidotto M.C., 2000.** Molecular identification of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:275-280.

**Koneman, E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C., 2000.** Diagnóstico Microbiológico. Ed. Medica Panamericana. pp. 196-200, 206-207.

**Lawson, et al. 1989.** *FEMS Microbiology Letters*. 113: 87-92.

**León, F.M. 1982.** Industrialización de variedades de Mango Kent y Keitt. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F, pp. 15.

**Lizada M.C.C. 1993.** Mango: In: Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London, pp. 255-271.

**Maniatis, Fritsch, Sanbrook, 1989.** *Molecular cloning manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Mathews y Van Holde. 2003.** In: Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahem K.G. (Ed.), Addison Wesley. *Bioquímica*, 3a ed. pp. 1037-40, 1257-58.



Medlicott A.P., Reynolds S.B. y Thompson A.K. 1986a. Effects of temperature on the ripening of mango fruit (*Mangifera indica* var. Tommy Atkins). *Journal of Science of Food Agriculture*. **36**: 561-566.

Mitra, S.K. 1997. Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. CAB International, UK, USA. pp 85-110.

Mitra S.K. y Baldwin E.A. 1997. Mango. In: Mitra S.K. (Ed.), Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 85-122.

Mukherjee, S.K. 1973. History, origin and botany, Chapter 1 in "The mango handbook" Indian Council of Agriculture Research. New Delhi.

Ackerman Jennifer, 2002. In: Food: How Safe? How Altered?. *Oficial Journal of Nacional Geographic Society*. **201** (5): 2-51.

**NORMA OFICIAL MEXICANA** (con carácter de emergencia) **NOM-EM-033-FITO-2000**, Confinamiento y erradicación de brotes de la mosca del Mediterráneo en los municipios del Estado de Chiapas, que se indican.

Pathak V.N. (1980). **Diseases of fruit crops**. Oxford & IBH Publishing Company. New Delhi. India. Disponible en: [www.scisoc.org/resource/common/names/mango/htm](http://www.scisoc.org/resource/common/names/mango/htm)



Penteado A.L., Eblen B.S., Millar A.J., 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect desinfestation procedures. *Journal of Food Protection*. 67: 181-184.

Sistema integral de información agroalimentaria y pesquera. Sagarpa 2003. Disponible en:  
[http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comagr2c.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comagr2c.html)

Stepanovic S., Cirkovic I., Mijac V., Svabic-Vlahovic M., 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiolog*. 20: 339-343.

Subramanyam H., Gowri S., y Krishnamurthy S. 1976. Ripening behaviour of mango fruits graded on specific gravity basis. *Journal of Food Science and Technology*. 13: 84-86.

Universidad Nacional de Chapingo unidad de investigación disponible en:  
<http://www.chapingo.mx/investigacion/pronisea/rev67.html>

Way J.S., Josephson K.L., Pillai S.D., Abbaszadegan M., Charles P., Gerba, and Pepper I.L., 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Applied. And Enviromental Microbiology*. 59(5)1473-1479.

Zhuang R.-Y., Beuchat L.R., and Angulo F.J., 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in Raw Tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied. And Environmental Microbiology*. 61(6) 2127-2131..

