



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

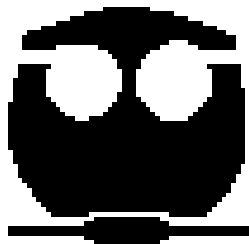
**DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN CON  
ENTEROBACTERIAS EN EL TRATAMIENTO POST-COSECHA  
DEL MANGO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**ALBERTO PEREZ JIMENEZ**



**MÉXICO, D. F.,**

**2007**



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.

## **Jurado asignado:**

Presidente: Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova  
Vocal: Dra. María del Carmen Wacher Rodarte  
Secretario: Aurora Irma Ortegón Avila  
1<sup>er</sup> suplente: Raquel Ortega Muñoz  
2<sup>o</sup> suplente: Ruth Edith Martín Fuentes

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM y laboratorios de Serología y Microbiología Ambiental del tercer piso de la torre de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

---

Dra. Maria del Carmen Wacher Rodarte  
Asesora

---

Dr. Carlos Alberto Eslava Campos  
Asesor Técnico

---

Alberto Pérez Jiménez  
Sustentante

*"La imaginación es más importante que el conocimiento"*  
**A. Einstein**

*"La soledad no te enseña a estar solo, sino a ser único"*  
**Emil M. Cioran**

*"A veces uno quisiera que alguien te encontrara, te levantara del suelo y te pusiera en una vitrinita"*  
**Ricardo Anguía**

*"Todos los movimientos del Universo, desde el átomo más pequeño, hasta la estrella más grande, vibran con ritmo, porque a fin de cuentas, el ritmo es la diferencia entre la vida y la muerte"*  
**George Martin**

*"El dinero no compra la felicidad, pero ¿quien quiere ser feliz?...In Gold We Trust"*  
**Nuevos Ricos**

## RECONOCIMIENTOS

El proyecto de tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce y se agradece la colaboración del Dr. Carlos Alberto Eslava Campos como asesor técnico en la realización de este proyecto.

Se agradece:

A la Dra. Irma Rosas por las facilidades prestadas para hacer uso de las instalaciones del laboratorio de Microbiología Ambiental en el tercer piso de la torre de investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Al Dr. Armando Navarro su colaboración durante la realización de la tipificación serológica.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Microbiología Ambiental, integrado por las Maestras en Ciencias: Eva Salinas, Leticia Martínez, Ariadna Cruz y Luz María García por su valiosa asesoría en el proceso de identificación de cepas con el equipo automatizado Vitek, así como en la realización de la virotipificación de las cepas de *Escherichia coli*.

La participación de la Dra. Montserrat Calderón y su equipo de trabajo del Instituto Tecnológico de Tepic por el trabajo realizado de aislamiento de las cepas del mango.

A la Bióloga María Teresa Flores Espinosa por el apoyo técnico brindado en la realización de este proyecto.

Este trabajo se desarrolló con el apoyo financiero otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN 212703) de la UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Wacher por darme la oportunidad de trabajar con usted y por dirigir mi trabajo, pero sobre todo por su amistad y el apoyo recibido durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Eslava por brindarme su apoyo, su conocimiento y su amistad en todo momento.

A Eva Salinas, Ariadna Cruz, Leti Martínez, Luz García y Alma Romero por compartir sus conocimientos y experiencias, pero sobre por ser mis amigas.

A Gaby López. Por ser como la hermanita que nunca tuve, sabes que aunque lejos, de alguna u otra forma siempre estas presente.

A Sandra Bolaños por tu cariño y tu amistad, por siempre apoyarme de distintas maneras. Por compartir la experiencia de visitar el viejo continente.

A Lolita Reyes por tu amistad, tu honestidad, tu disposición y tu vibra siempre tan positiva. Por inspirar la creación del club "Todos queremos ser como Lolita"

A Julieta Sandoval por tu cariño, tu amistad, por tus opiniones siempre tan atinadas, por *amargueitor*, por esas jornadas de cafecito mientras platicamos a veces, por horas.

A Tere Flores por las voces de animo que siempre tuviste para mi, por tu colaboración y claro, por tu amistad.

A Gloria Díaz por que a pesar del poco tiempo que compartimos juntos en el labo siempre me brindaste todo tu apoyo en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi papá, mi mamá y mi hermano por ser el peldaño fijo de mi escalera floja. Por que no importa donde estemos, siempre estaremos juntos.

A mis tías Lili y Kity y mi tío Benito, por siempre estar tan cerca, por todo su apoyo y su cariño incondicional.

A Alma, por compartir la misma pasión pero no la misma paciencia. Por compartir las alegrías y las penas. Por mostrarme que la vida es de colores. Por invitarme a comer uvas en la tarde. (Ya ni tu me puedes quitar todo lo que fuimos).

A Natalia, por ser siempre tan objetiva, honesta y divertida. Por ser mí amiga. Por siempre tener la intención de rockear juntos aunque nunca lo hacemos.

A Kasha, por ser tan intensa, divertida y una gran amiga. Por tu confianza y por amar todo. Por hostil.

A Paola Uscanga, por compartir buenos momentos en clase y ahora en el labo. Por tus magnificas galletas de café. Por tu buen sentido del humor.

A Tere Soto, por una bonita amistad, por compartir la felicidad de tu matrimonio.

A los bros: Emmanuel, Fidel, Julio, Carlos y Gustavo, por mantener la amistad y afianzarla con el paso de los años.

A Samo, Manuel (Sr. Cerdo), Enrique, Mariana Saucedo, Lili Noyola, Paris, Arturo López, Paola Ayala, Valentina, Alicia y Jorge, Mariana López, Tamara, Familia



Sánchez Rojas, Familia Ventura Sánchez, Familia Matamoros Sánchez, Mariel y Karina, Ana Carolina Rojas, Luis Antonio (E-324), Billy, Mariana Yamel, Rocío, Lorena de Anda, Adriana, Selene, Aleida, Edna Rangel, Belegui, Marisol, Pancho y su Capitulo 7, Carlos (equipo) y Ceci, Chucho y Samuel (la vieja guardia), Enedina, Elisa López, Itzel (Ciencias), Juano banano, Luz Flores, Paque, Saul, Marco Cenicerros, Jokus, Ale Campos, Omar (Invalido), Paloma Cerrillo, Paquito, Reyó, Poncho, Darío, Fernando, Sandra Salmeron, Yuyis, Ruth, Sasha, Yeimi, Claudia, Selene, Miguel, Domingo (Culiacán), Gabriel, Luis (muerto), Delia, Armando (Serologia), Ulises, Lulu, Jorge Mateo (Salud Pública), Carlos Almanza, Checo, Carlos (de Julieta), Argelia, Juanito, Lety, Rosita, maestra Angela Sotelo, Juan (Colombia), Alfredo (E-324), maestra Beatriz Serrano López, Sandra (güerita), Eli (E-321), Tere Plata, Lucy Cornejo, Paty Severiano, Odilon y Claudia, Jaime Pérez, Rosy, Diego, Noriko, Daniela, Alejandra, Ernesto, Quique, Vences, Ramón, Alonso, Carlos, Robles, Ricardo.

A todas las bandas que han colaborado en el soundtrack de mi vida. A la música por ser la más cruel y seductora de las artes.

A la rabia y al cariño por hacer este trabajo.



A todos mis muertos, y muy en especial a la memoria de mi padre.

---

---

# INDICE GENERAL

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
3.1 MANGO .....	5
3.1.1 Descripción Botánica.....	5
3.1.2 Microbiota del Mango.....	7
3.1.3 Contaminación del Mango.....	9
3.1.4 Desinfestación de la Fruta del Mango.....	10
3.1.5 Situación Actual.....	10
3.1.6 Exportación .....	11
3.1.7 Inocuidad Alimentaria.....	12
3.1.8 Buenas Prácticas de Producción (BPP).....	12
3.1.9 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) .....	13
3.1.10 Enfermedades Transmitidas por Alimentos .....	14
3.2 ESCHERICHIA COLI.....	16
3.2.1 ETEC.....	20
3.2.2 EPEC .....	21
3.2.3 EHEC .....	22
3.2.4 EIEC.....	22
3.2.5 EAEC.....	22
3.3 SALMONELLA SP.....	25
3.3.1 Aspectos Generales.....	25
3.3.2 Aislamiento e Identificación.....	27
3.3.3 Fundamento de la Técnica.....	27
3.3.4 Pre-Enriquecimiento.....	28

---

---

3.3.5	<i>Enriquecimiento Selectivo</i> .....	29
3.3.6	<i>Detección en Medios Selectivo</i> .....	29
3.3.7	<i>Identificación</i> .....	30
3.3.8	<i>Factores que afectan el crecimiento, muerte y/o sobrevivencia</i> .....	30
3.3.10	<i>Actividad de Agua (<math>a_w</math>)</i> .....	32
3.3.11	<i>pH</i> .....	32
3.3.11	<i>Sobrevivencia en Alimentos y su Vigilancia</i> .....	32
3.3.13	<i>Control en los Alimentos (Salmonella)</i> .....	33
3.4	MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN .....	34
3.4.1	<i>Tipificación</i> .....	34
3.4.2	<i>Métodos Fenotípicos de Tipificación</i> .....	35
3.4.3	<i>Métodos Genotípicos de Tipificación de Cepas</i> .....	37
3.5	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). .....	39
3.6	SERUNAM .....	42
3.7	SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK PARA IDENTIFICACION .....	45
3.7.1	<i>Descripción</i> .....	46
3.7.2	<i>Conservación y Manejo</i> .....	47
3.7.3	<i>Preparación del Inóculo</i> .....	47
3.7.4	<i>Resultados</i> .....	48
3.8	PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....	48
3.8.1	<i>Importancia de la Resistencia a Antibióticos</i> .....	48
3.9	BIOPELÍCULAS .....	49
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
7.1	MUESTREO EN TEPIC, NAYARIT .....	57

7.2	EXTRACCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA SUPERFICIE DEL MANGO (EN TEPIC, NAYARIT) .....	58
7.2.1	<i>Detección de Salmonella</i> .....	59
7.2.2	<i>Detección de Escherichia coli</i> .....	59
7.3	PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS .....	61
7.4	PRUEBA DE LA OXIDASA.....	61
7.5	IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO VITEK .....	61
7.6	TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS .....	62
7.6.1	<i>Determinación del Patrón de Sensibilidad a Antibióticos Mediante el Método Vitek</i> .....	62
7.6.2	<i>Serotipificación</i> .....	64
7.7	VIROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI. ....	68
7.7.1	<i>Extracción de DNA</i> .....	68
7.7.2	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (para cepas de E. coli)</i> .....	70
7.8	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.....	74
7.8.1	<i>Preparación del Inóculo</i> .....	74
7.8.2	<i>Ensayo con placas de poliestireno</i> .....	74
7.8.3	<i>Determinación de la Capacidad de Formación de Biopelículas</i> .....	75
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
8.1.1	<i>Importancia de las bacterias encontradas en la superficie del mango</i> .	82
8.1.1.7	<i>Contaminación en mango y otros productos frescos</i> .....	85
8.2	SEROTIPIFICACIÓN .....	87
8.2.1	<i>Serotipificación de E. coli</i> .....	88
8.2.2	<i>Serotipificación de Salmonella</i> .....	88
8.3	VIROTIPIFICACIÓN.....	90
8.3.1	<i>Detección de Genes de Virulencia de las Cepas Aisladas de Escherichia coli, mediante PCR Múltiple</i> .....	90
8.4	PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....	93

8.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.....	106
8.6 DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL MANGO .....	109
8.6.1 Instalaciones Sanitarias .....	112
8.6.2 Lavado .....	113
8.6.3 Tratamiento Hidrotérmico e Hydroenfriado .....	114
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>116</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>119</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>120</b>
<b>12. ANEXO.....</b>	<b>129</b>
<b>RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN POR EQUIPO VITEK .....</b>	<b>131</b>
<b>RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN POR EQUIPO VITEK .....</b>	<b>132</b>

---

---

## INDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

### TABLAS

Tabla 1. Patógenos asociados a brotes por productos frescos .....	15
Tabla 2. Brotes de enfermedades asociadas al consumo de productos frescos en Estados Unidos .....	16
Tabla 3. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> (59).....	17
Tabla 4. Límites de crecimiento de <i>Salmonella</i> .....	30
Tabla 5. Identificación de las muestras de aislados de la superficie de mangos Ataulfo y Agua de una compañía exportadora de mango de Nayarit, México. ....	60
Tabla 6. Tipos de antibióticos utilizados en esta prueba .....	63
Tabla 7. Genes correspondientes a cada grupo de <i>E. coli</i> .....	70
Tabla 8. Ciclos de la PCR. ....	71
Tabla 9. Reactivos para PCR.....	72
Tabla 10. Iniciadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.....	72
Tabla 11. Fórmulas para calcular la formación de biopelículas.....	76
Tabla 12. Resultados obtenidos después de la lectura de pruebas bioquímicas hecha por el equipo automatizado Vitek, sitios de aislamiento y resultado de la prueba de la oxidasa. ....	78
Tabla 13. Claves de los sitios de aislamiento.....	79
Tabla 14. Número y Porcentaje de microorganismos identificados por el equipo automatizado Vitek.....	80
Tabla 15. Sitios de muestreo y número de microorganismos aislados.....	81
Tabla 16. Claves de serología.....	87
Tabla 17. Serotipificación para <i>Escherichia coli</i> . ....	88
Tabla 18. Serotipificación para <i>Salmonella</i> . ....	88
Tabla 19. Pesos de bandas en PCR múltiple de <i>E. coli</i> .....	92
Tabla 20. Resultados de sensibilidad a antibióticos. ....	94

Tabla 21. Resistencia a antibióticos con el método de Sensidiscos para las cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	101
Tabla 22. Espectros antimicrobianos reportados en la literatura para la serie de antibióticos usados en este trabajo. ....	105
Tabla 23. Capacidad de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> para formar biopelículas. ....	106
Tabla 24. Capacidad de <i>Enterobacter cloacae</i> para formar biopelículas .....	107

## FIGURAS

Figura 1. Diagrama PCR (1).....	40
Figura 2. Diagrama PCR (2).....	40
Figura 3. Diagrama de la metodología.....	56
Figura 4. Diagrama de procesamiento de mangos en empacadora .....	58
Figura 5. Ciclos de la PCR .....	71
Figura 6. PCR múltiple de <i>E. coli</i> .....	91
Figura 7. Presencia de <i>E. clocae</i> en el proceso .....	102
Figura 8. Posibles fuentes de contaminación del mango .....	109

## CUADROS

Cuadro 1. Características de los grupos de <i>E. coli</i> causantes de diarrea .....	19
--	----



## 1. RESUMEN

En los últimos años se han presentado problemas comerciales relacionados con la inocuidad de productos frescos que han afectado el mercado de exportación de ciertos productos mexicanos. Estas medidas se convierten en barrera no arancelaria a las exportaciones, provocando grandes pérdidas económicas para el sector.

El mango es el tercer cultivo en México, de acuerdo con su importancia económica. La producción anual en 2003 fue de 1, 403, 881 toneladas, lo que representa el 6.6% de la producción mundial.

El consumo de mangos crudos se asoció en Estados Unidos con un brote de salmonelosis, en el que se infectaron setenta y ocho personas de trece estados; requirieron hospitalización quince y dos de ellas fallecieron.

Mediante este estudio se propone establecer procedimientos que permitan al mango mexicano mantener su presencia en el mercado internacional y en especial en el mercado estadounidense, logrando asegurar su inocuidad.

Para eliminar el riesgo de la presencia de la mosca de la fruta en el mango de exportación, se incluye un tratamiento hidrotérmico (46.1°C por 65, 75 o 90 minutos); sin embargo, este tratamiento puede aumentar el riesgo de incidencia de enterobacterias patógenas.

Se han detectado cepas tanto de *Salmonella* como de *Escherichia coli* en mangos mexicanos, por lo que es indispensable determinar las fuentes de contaminación, con el objeto de evitar su contaminación y así poder asegurar su inocuidad.

Se tomaron muestras de mangos provenientes de una compañía empacadora de mangos de exportación ubicada en el poblado conocido como 5 de Mayo en el municipio de Tepic en el Estado de Nayarit, México llamada NATURAMEX SRL de CV.

Se determinó la presencia tanto de *Salmonella sp* como de *Escherichia coli*, siguiendo la metodología del Bacteriological Analytical Manual (2001) (2).

Se aislaron además enterobacterias presentes en la superficie del mango mediante el método automatizado Vitek. Se serotipificaron, además, las cepas aisladas de *Salmonella sp* y de *E. coli*.

Se determinó el patrón de resistencia a antibióticos de cada cepa, y se encontró que el 25% de las cepas fueron resistentes a todos los antibióticos empleados, *Enterobacter cloacae* que fue el microorganismo aislado prácticamente a lo largo de todo el proceso presentó dos patrones de resistencia: las trece cepas aisladas presentaron resistencia a dos antibióticos mientras que sólo una de ellas presentó resistencia a diez antibióticos. Las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* fueron sensibles a todos los antibióticos empleados.

Se encontró que seis cepas de *Enterobacter cloacae* son ligeramente formadoras de biopelículas y sólo una cepa de *Enterobacter cloacae* presentó una capacidad

media para formar biopelículas. Las cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli* no presentaron capacidad para formar biopelículas.

Los resultados indican que existen problemas de inocuidad, ya que se detectaron bacterias patógenas, que las posibles fuentes de contaminación son el mango proveniente de la huerta, el agua empleada en el proceso en la planta así como la manipulación del mango por parte de los trabajadores de la planta, y que deberá tomarse en cuenta en el manejo post-cosecha del mango que algunas cepas son capaces de formar biopelículas.

## 2. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras frescas es parte de una dieta sana, ya que proveen al organismo de vitaminas, minerales y fibra. La OMS y FAO, recomiendan una ingesta diaria de al menos 400 g de fruta y verduras <sup>(43)</sup>. La calidad microbiológica de estos productos frescos es esencial para asegurar la disponibilidad de productos de alta calidad y microbiológicamente seguros para los consumidores. La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas y constituye un problema de salud pública, el cual se refleja en la alta incidencia de brotes diarreicos e implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes son consumidores de estos productos.

México es uno de los principales productores de productos frescos y en particular, es el principal exportador de mango; sin embargo, en los últimos años se han presentado problemas comerciales relacionados con la falta de inocuidad de productos frescos que han afectado al mercado de exportación. La alta incidencia de brotes pone de manifiesto la necesidad de aplicar programas de control y prevención de riesgos, como son las buenas prácticas de manufactura en todos y cada uno de los puntos que se encuentran a lo largo de toda la cadena de producción así como a los involucrados en la manipulación de los alimentos para prevenir infecciones.

Es importante determinar la presencia de bacterias patógenas (*Salmonella* sp. y *Escherichia coli*) en diferentes puntos del tratamiento post-cosecha, así como determinar las posibles fuentes de contaminación, para diseñar estrategias para mejorar su calidad microbiológica.

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1 MANGO

El mango es conocido en India desde épocas muy remotas y ha sido cultivado durante más de 4000 años en aquel país <sup>(10)</sup>.

El mango es reconocido en la actualidad como uno de los 3 o 4 frutos tropicales más finos. Se encuentra en todo el sureste de Asia y el archipiélago Malayo desde épocas muy antiguas. El mundo occidental se relacionó con el mango a partir de que los viajeros españoles llevaron la fruta desde la India hasta Manila, en Luzón. Mientras tanto, los portugueses transportaron mango al sur de África, de ahí hacia Brasil y posteriormente a la isla de Barbados<sup>(28)</sup>.

El arribo del mango a nuestro país ocurrió por dos vías: la primera con origen en las Bermudas y la segunda de las Filipinas mediante los galeones comerciales de la Nao de China <sup>(10)</sup> <sup>(47)</sup>. Partiendo de una u otra vía, en el país se establecieron las primeras huertas en los estados de Guerrero, Colima, Jalisco y Sinaloa en las costas del Pacífico, así como en Veracruz, en la costa del Golfo de México <sup>(10)</sup>.

#### 3.1.1 Descripción Botánica.

El mango (*Mangifera indica*), es un fruto dicotiledóneo de la familia *Anacardiaceae* <sup>(38)</sup>, incluye 64 géneros, la mayoría árboles y arbustos. El árbol es generalmente de porte mediano (10-20m) en estado adulto. Conocido por su sabor único y atractiva apariencia, el mango es un fruto muy valorado debido a los ingresos económicos que genera por su exportación por los países productores <sup>(44)</sup><sup>(46)</sup>.

Es una drupa larga, carnosa y su pericarpio está dividido en tres capas; una delgada piel externa, el epicarpio, el cual cubre la semilla interior <sup>(25)(47)</sup>. De color exterior amarillo o verde como base, algunos con chapeos de colores que van del rojo claro al morado oscuro, esto cambia según la variedad, morfología, color y sabor.

El mango es considerado una excelente fuente de vitaminas C, B1 Y B2 además, de pro vitamina A <sup>(47)</sup>. Contiene también riboflavina, tiamina y minerales como hierro, calcio y fósforo, aporta también, agua y carbohidratos <sup>(35)</sup>.

Los países exportadores de mango son Filipinas, India, Tailandia y México; siendo India el principal productor en el mundo, con el 66% de la producción mundial aunque, en los últimos años México ha sido el exportador número uno a nivel mundial de este fruto.

El comercio del mango ha sido limitado por su naturaleza altamente perecedera. El fruto es susceptible a enfermedades, temperaturas extremas y daño físico, por ello, la mayoría de las tecnologías poscosecha para este fruto han sido diseñadas para el control de enfermedades y la protección contra daño durante el empaque y el transporte.

El mango típico constituye un árbol de tamaño mediano, entre 10 y 30 metros de altura cuyo tronco tiene aproximadamente de 75 a 100 cm de diámetro. La corona es densa y ampliamente oval o globular. Las ramas son gruesas y robustas.

Sus hojas se encuentran espaciadas irregularmente a lo largo de las ramas, de peciolo largo o corto, oblongo lanceolado, coriáceo, liso en ambas superficies, de color verde oscuro brillante por arriba y verde-amarillento por abajo, de 10 a 40 cm

de largo por 2 a 10 cm de ancho. Las hojas jóvenes son de color violeta rojizo o bronceado que posteriormente se tornarán de color verde oscuro.

Las flores, se producen en las cimas densas o en las últimas ramas de la inflorescencia y tienen unos colores verde-amarillento o amarillo claro, cóncavos, densamente cubiertos con pelos cortos visibles, los pétalos son caedizos, ovoides y se extienden con las puntas curvadas. El peso del fruto varía de entre 150g hasta 2Kg. Su forma, aunque es variable, generalmente es ovoide, aplanada, redondeada u obtusa a ambos extremos. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cáscara es gruesa, la carne es de color amarillo o anaranjado, jugosa y muy sabrosa. La semilla es ovoide, oblonga, alargada recubierta por un endocarpio grueso y leñoso con una capa fibrosa externa.

Los principales cultivares que se comercializan en México son “*Kent*”, “*Irwin*”, “*Haden*”, “*Keitt*”, “*Manila*”, “*Palmer*”, “*Sensation*”, “*Tommy Atkins*”, “*Van Dyke*” y “*Ataulfo*”<sup>(28)</sup>.

### **3.1.2 Microbiota del Mango**

Anteriormente se creía que los frutos frescos eran inocuos, debido a su valor bajo de pH; sin embargo a partir de la presencia de brotes de infecciones gastrointestinales, se han incrementado los estudios de la microbiota y de microorganismos patógenos en las frutas frescas o mínimamente procesadas. La superficie de muchos frutos y vegetales, entre ellos el mango, está constituida por ceras que dificultan la adherencia de los microorganismos. Esta capa repele el

agua que podría contener microorganismos. En el caso de los patógenos que se logran adherir, por lo general logran penetrar esta superficie.

La microbiota del mango no se conoce con certeza. Se han estudiado sobre todo los hongos causantes de enfermedades y de la descomposición del fruto; los reportes sobre la microbiota bacteriana son escasos.

Entre las bacterias que se han aislado del mango se encuentran microorganismos coliformes como: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Rahneella aquaris*, enterobacterias como: *Salmonella* spp, *Escherichia coli* EPEC <sup>(1)</sup>.

*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Shigella flexneri* y *Campylobacter jejuni*, son capaces de adherirse a las superficies de frutas y verduras y que se han aislado de productos vegetales pero dentro de los organismos que comúnmente se han detectado como responsables de brotes infecciosos, están *Salmonella* y *E. coli* <sup>(1)</sup>.

El principal microorganismo enteropatógeno asociado a frutas y verduras es *Salmonella* spp. En Estados Unidos en 1990, se presentó un brote de salmonelosis que afectó a varios estados, por el consumo de jitomate crudo. También se ha visto que *E. coli* O157:H7 ha contribuido con un 21% a los brotes de infecciones alimentarias de 1982 al 2002. Los brotes de *E. coli* O157 se han asociado a alimentos como manzanas, lechuga, alfalfa, y otros productos vegetales <sup>(1)</sup>.



### 3.1.3 Contaminación del Mango

Algunas bacterias como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* pueden encontrarse en el suelo y contaminar fácilmente algunos productos. Otras como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* residen en el tracto intestinal de los animales y/o humanos y se encuentran en estos productos por contaminación fecal.

Pueden contaminar las frutas y hortalizas a través de la infiltración de aguas residuales en los campos, el riego con agua contaminada, la presencia de animales en el campo o por el uso incorrecto de abonos <sup>(45)</sup> (3). La contaminación también puede ocurrir en la manipulación durante la cosecha y embalaje, además de otros puntos de la cadena de distribución y comercialización <sup>(74)</sup>.

Pueden encontrarse patógenos entre la microbiota de frutas y hortalizas, ya que es muy fácil que las superficies externas de estos productos entren en contacto con el suelo, con el agua, los líquidos residuales, el aire, las personas o los animales. Algunas condiciones favorables para la multiplicación de estas bacterias son: disponibilidad de nutrientes, temperatura adecuada, entorno no agresivo como buenas condiciones de acidez, humedad y salinidad. Cuando se dan estas condiciones y con el tiempo necesario, serán capaces de sobrevivir o aun de multiplicarse <sup>(3)</sup> (75).

### **3.1.4 Desinfestación de la Fruta del Mango**

La fruta del mango es hospedera de la mosca de la fruta *Thephritide*, que es considerada como un riesgo. Según el país de origen, el mango puede estar infestado por una o más especies de moscas de la fruta. Para que el mango fresco sea aceptado por los mercados más importantes, la fruta debe ser tratada para asegurar que esté libre de moscas de la fruta. Anteriormente se usaban tratamientos químicos como pesticidas para la fruta, pero ahora, se evita su uso. En general los tratamientos libres de sustancias químicas como lo es el tratamiento térmico (temperatura y tiempo adecuados) pueden matar el huevo y los estados de larva de la mosca de la fruta. Los tratamientos son: Tratamiento con Vapor Caliente (VHT), Tratamiento con Aire Caliente (FHAT) y el Tratamiento Hidrotérmico (HWT), siendo éste último el de uso generalizado en Estados Unidos y América Central (31).

### **3.1.5 Situación Actual**

La exportación del mango es importante para México y el estado de Nayarit es uno de los mayores productores. El dato más reciente fue la producción de 239,660 toneladas en el año 2003 aportando así, el 17% de la producción nacional (65). En éste el desarrollo industrial es incipiente y la exportación de mango ayuda a la economía, por lo que resulta necesaria la implantación de sistemas que aseguren la inocuidad de este producto fresco.

### 3.1.6 Exportación

Estados Unidos es, sin duda el mayor comprador de frutas y verduras suministradas por los países pobres <sup>(76)</sup> y México un importante exportador de mango a este país. Se incluyen también como sus principales mercados, además de Estados Unidos, a Canadá, Francia y Japón <sup>(62)</sup>.

Las exigencias establecidas por la legislación estadounidense modifican sustancialmente los métodos de producción ya que afectan las costumbres y la idiosincrasia de las poblaciones rurales, esto es debido a que el mayor vehículo de contaminación es el hombre, quien manipula los productos comestibles durante los procesos de producción, cosecha, empaque y transporte <sup>(76)</sup>.

En 1998, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) propuso medidas para disminuir los riesgos a la salud provenientes de jugos de frutas y hortalizas. Una de las propuestas sobresalientes fue que todos los procesadores de jugos debían instalar el Sistema de Análisis de peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés).

Desde el momento en que las frutas y hortalizas salen del campo hasta que llegan al consumidor, tienen lugar muchas actividades, entre ellas se incluyen actividades relacionadas con la producción, las operaciones tras la cosecha, el envasado, el transporte y el almacenaje. La aplicación de programas como el empleo de Buenas Prácticas Agrícolas así como de Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura <sup>(42)</sup>, constituye pasos importantes para reducir los posibles riesgos asociados con los productos agrícolas a lo largo de la cadena de producción y distribución <sup>(32)</sup> <sup>(76)</sup>.

### **3.1.7 Inocuidad Alimentaria**

Es la garantía de que un alimento no cause daño al consumidor cuando sea preparado o ingerido. Un alimento se considera contaminado cuando contiene microorganismos potencialmente patógenos (bacterias, virus, protozoarios y hongos); sustancias químicas tóxicas (pesticidas y fertilizantes) o material extraño (vidrio) a su composición normal. Los sistemas de aseguramiento de la inocuidad alimentaria constituyen una serie de procesos que aseguran la calidad en la producción y elaboración de los productos alimentarios. Así mismo garantizan la obtención de alimentos sanos, nutritivos y libres de peligros para el consumo humano <sup>(19)</sup> (77).

### **3.1.8 Buenas Prácticas de Producción (BPP)**

Las BPP son el conjunto de procedimientos, controles y actividades encaminadas a reducir los riesgos de contaminación química, física y microbiológica de los productos. Éstas incluyen desde la elección de la ubicación de la unidad de producción, de las áreas destinadas para desechos industriales y basureros, evitar el paso de animales por el campo de cultivo, contar con instalaciones físicas adecuadas para evitar contaminación cruzada durante la producción, instalaciones sanitarias y programas de limpieza y desinfección de instalaciones, equipos y utensilios; manejo adecuado de desechos, control de plagas, higiene y salud de los trabajadores, calidad y manejo de los insumos y movilización de los productos. Las buenas Prácticas de Producción Primaria recomiendan utilizar los siguientes controles:

- Programa de Control de Plagas
- Programa de Control de Enfermedades
- Programa de Capacitación sobre Higiene a los Trabajadores
- Programas de Limpieza y Mantenimiento de Instalaciones
- Control de Calidad
- Uso de Insumos (agua y productos químicos)

La Asociación Nacional de Establecimientos Tipo Inspección Federal (ANETIF), no tiene injerencia en la fase de producción primaria, sin embargo, recomienda la aplicación de las Buenas Prácticas a todo lo largo del proceso de producción y de manufactura.

Con este fin y buscando al mismo tiempo promover los productos mexicanos a nivel nacional e internacional el gobierno mexicano fomenta el uso de las marcas “México Calidad Selecta” y “México Calidad Suprema”, las cuales son otorgadas a productos que durante todas las fases de producción apliquen las Buenas Prácticas de Producción y la Buenas Prácticas de Manufactura.

A la fecha se tienen establecidos Pliegos de Condiciones para miel, aguacate, mango, berenjena y otros productos (77).

### **3.1.9 Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)**

Las buenas prácticas de manufactura son una serie de medidas que se recomienda seguir, con la finalidad de controlar el medio ambiente de las instalaciones en donde se procesa el producto. A través del cumplimiento de las prácticas de limpieza y desinfección así como de prácticas de higiene del personal

es posible preservar los niveles de inocuidad obtenidos en la fase de producción. En el procesamiento de productos agrícolas, uno de los aspectos más importantes a controlar es la calidad microbiológica del agua utilizada en el lavado y desinfección de los frutos (77).

### **3.1.10 Enfermedades Transmitidas por Alimentos**

En América Latina, las diarreas por lo general son provocadas por el consumo de alimentos contaminados por diferentes microorganismos, llegando a ser causal de muerte en muchos casos. En la temporada de 1995-1996, en América Latina el 2% de las enfermedades causadas por alimentos corresponden a enfermedades asociadas con frutas y vegetales frescos. Pero este es un problema que afecta no sólo a los países en desarrollo. En 1996 en el Reino Unido, el 3% de los casos informados fue provocado por enfermedades asociadas con el consumo de frutas y verduras frescas. En 1985, en Francia, un muestreo en establecimientos comerciales que distribuían zanahorias, demostró que el 7 % de las zanahorias contenían *Yersinia enterocolitica*. En Estados Unidos se registraron 6,5 millones de casos cada año afectados por las diarreas; la muerte llegó para 9000 casos.

El 70% de las diarreas en niños son producidas por alimentos en mal estado. Anualmente, el 70% de las enfermedades transmitidas por alimentos, es provocado por *Salmonella*; afectando principalmente a niños y adultos.

Las principales fuentes de contaminación bacteriana en los alimentos son: el hombre, los insectos, los roedores, los animales, el polvo, los desperdicios y la basura (73).

En la tabla 1 se muestran algunos patógenos causantes de brotes asociados a productos frescos o refrigerados.

Tabla 1. Patógenos asociados a brotes por productos frescos

Patógeno	Producto Asociado
<i>Shigella spp.</i>	Lechuga Cebolla
<i>Salmonella spp.</i>	Tomates Sandía Melón Col
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Lechuga Jugo de manzana no pasteurizado Alfalfa
<i>Escherichia coli</i> Enteroroxigénica	Zanahorias
<i>Vibrio cholerae</i>	Leche de coco

En la tabla 2 se muestran el número de casos de brotes de enfermedades transmitidas por productos frescos, los años en que se presentaron y los microorganismos involucrados.

Tabla 2. Brotes de enfermedades asociadas al consumo de productos frescos en Estados Unidos (78).

<b>Año</b>	<b>No. de Estados</b>	<b>No. de casos</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Producto asociado</b>
2001	6	Más de 40	<i>Salmonella</i>	Melón
2000	8	86	<i>Salmonella</i>	Tomates
1998	3	Más de 400	<i>Shigella</i>	Perejil
1997	14	864	<i>Cyclospora</i>	Moras
1997	3	305	<i>Cyclospora</i>	Albahaca
1996	2	49	<i>E. coli O157:H7</i>	Lechuga
1996	2	72	<i>Shigella</i>	Chayotes
1996	20	1500	<i>Cyclospora</i>	Frambuesas
1993	3	84	<i>Salmonella</i>	Tomates
1991	23	400	<i>Salmonella</i>	Melón

### **3.2 ESCHERICHIA COLI**

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia Enterobacteriaceae, cuyas principales características bioquímicas se indican en la tabla 3.



Tabla 3. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* (59).

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>% de positividad</b>
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H <sub>2</sub> S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de D-manosa	98
Nitrato a nitrito	100

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de biota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea (59).

Las principales características bioquímicas de esta bacteria se presentan en la Tabla 3. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman (30), desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que

actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

La serotipificación de *E. coli* requiere de un gran número de antisueros. Debido a que existen pocos laboratorios que la realizan, se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro*, como los de adherencia y ensayos de detección de genes de virulencia. También se pueden realizar ensayos *in vivo*, como el asa ligada o la prueba de Sereny, así como ensayos inmunológicos y pruebas de biología molecular, para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan como marcadores moleculares. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC), cuyas características principales se describirán brevemente y se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea (17).

Grupo	Síntomas Clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes	Factores de patogenicidad
<b>ETEC</b>	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
<b>EHEC</b>	Diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O133:H21, O119, O128, O145	STX A/E Intimina pO157
<b>EIEC</b>	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, O164:H-, O167:H-	Invasividad Plásmido de 140MDa
<b>EPEC</b>	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H-O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70 MDa
<b>EAEC</b>	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas Pet y Pic OMP Plásmido de 60MDa Citotoxina
<b>DAEC</b>	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de uno a cinco años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

LT = toxina termolabil

ST = toxina termoestable

CFA = factor de colonización antigénico

BFP = pili con forma rizada

EAF = factor de adherencia de EPEC

OMP = proteína de membrana externa

STX = toxina shiga

EAST = toxina ST de cepas enteroagregativas

### 3.2.1 ETEC

*Escherichia coli* enterotoxigénica [ETEC], es un tipo patogénico de esta especie que agrupa cepas capaces de producir enterotoxinas proteicas termolábiles [LT] o termoestables [ST], las cuales no se ingieren preformadas ni ingresan al medio interno, sino que se forman y ejercen su acción localmente sobre la mucosa intestinal, promoviendo hipersecreción de agua y electrolitos.

La toxina lábil tiene una estructura y una función muy similares a la toxina de *Vibrio cholerae*; ST es un pequeño polipéptido de mayor jerarquía como factor patogénico, dado que son principalmente las cepas productoras de ST, o de LT y ST, pero no las que producen sólo LT las que se asocian con alteraciones intestinales (55).

ETEC se localiza sobre las células epiteliales del intestino delgado por medio de fimbrias proteicas de diversa composición antigénica y estructural, y allí produce sus toxinas, que se adhieren a receptores celulares, ingresan a los epitelocitos y modifican su función dando lugar a una diarrea líquida, sin fiebre ni inflamación de la mucosa.

Tanto los genes responsables de la producción de toxinas como los que codifican las adhesinas bacterianas están localizadas sobre plásmidos transferibles, por lo cual esta variante patogénica de *E. coli*, incluye numerosos serotipos que han sido capaces de incorporar esos componentes del genoma procariota.

ETEC es agente de diarrea aguda del niño en regiones pobres, y también de enfermedad esporádica o epidémica de origen alimentario, que los microbiólogos del hemisferio norte han llamado diarrea del viajero. En cualquier caso, las dosis

infectantes son relativamente altas, y los vehículos habituales de infección son el agua y los alimentos contaminados que permitan la sobrevivencia y multiplicación de los gérmenes.

En México, ETEC es el virotipo de *E. coli* que sigue en frecuencia a EPEC como agente de diarrea aguda en niños. No ha sido adecuadamente investigado como causante de brotes de ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos). Su investigación requiere la demostración en las cepas de genes codificantes de toxinas, por PCR o por sondas génicas, o de las enterotoxinas por ELISA (70).

### **3.2.2 EPEC**

Las cepas de EPEC producen en el intestino proximal lesiones de tipo AE, fijación y borramiento, caracterizadas por el contacto íntimo con los enterocitos, alteración secundaria de su citoesqueleto, borramiento de sus microvellosidades superficiales con formación de pedestales y modificación de sus flujos de agua y de iones. Genes cromosómicos plasmídicos codifican los productos que intervienen en estas lesiones (15).

La primera etapa del mecanismo de patogenicidad es la formación de microcolonias sobre la superficie del enterocito, proceso reconocido *in Vitro* como “adherencia localizada” (LA) en cultivo de células Hep-2. El fenómeno LA está mediado por el pilus formador de haces (BFP), fimbria tipo IV. El gen *bfpA* está localizado en un plásmido de alto peso molecular (56-60MDa) denominado factor de adherencia de EPEC (EAF).

Los genes necesarios para la formación de lesiones de tipo AE por EPEC están contenidos dentro de una isla de patogenicidad cromosómica de 35 Kb llamada Locus de Enfacelamiento de Entericito (LEE).

### **3.2.3 EHEC**

Las cepas pertenecientes a este grupo son capaces de producir verotoxinas (citotoxinas activas en células Vero). El serotipo O157:H7 es el más frecuente de este grupo. Las *E. coli* de este serogrupo no utilizan habitualmente el sorbitol. EHEC resiste la acidez gástrica, ingresa al intestino y se adhiere a las células del colon, debido a la presencia de adhesinas fimbriales.

El mayor atributo de virulencia y la característica que define a este virotipo, es la producción de citotoxinas STX y VT. Las islas de patogenicidad LEE de EHEC incluyen fagos temperados que codifican la síntesis de las citotoxinas características: STX1, STX2, sus variantes o ambos tipos.

### **3.2.4 EIEC**

Estas son cepas metabólicamente muy similares a *Shigella*, poseedoras de un gran plásmido de virulencia <sup>(33)</sup> y capaces de provocar diarrea líquida o inflamatoria, aunque sus dosis infectivas son mayores.

### **3.2.5 EAEC**

Estas cepas presentan adherencia y colonización del intestino delgado mediadas por fimbrias codificadas en plásmidos. La detección por PCR de las secuencias de

estas adhesinas y la observación del patrón de fijación característico sobre células Hep-2 son los métodos más útiles de identificación de estos cultivos. Además estas cepas causan diarreas persistentes.

### **3.2.6 Determinación de *Escherichia coli* en alimentos.**

Para la determinación de *Escherichia coli* se tiene que llevar a cabo la siguiente metodología:

En condiciones asépticas se pesan 25 gramos de la muestra, éstos se colocan en 225 mL de caldo BHI. Homogenizar de forma manual o de ser necesario hacerlo con ayuda de un Stomacher de manera breve.

Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Reposar por 10 minutos para permitir la sedimentación de la muestra.

Decantar cuidadosamente en un envase estéril e incubar a 35°C por 3 horas para reactivar las células.

Transferir el contenido a 225 mL de caldo TP (Tryptona Fosfato) e incubar por 20 horas a una temperatura de 44°C.

Después de la incubación sembrar por estría en placas con agar EMB y MacConkey.

Incubar a 35°C/20 h.

Las colonias típicas que son fermentadoras de lactosa aparecen con el centro oscurecido y planas, con o sin brillo metálico. Las colonias típicas en MacConkey presentan un color como rojo ladrillo.

Los biotipos no fermentadores de lactosa en ambos agares producen colonias descoloridas o levemente rosadas.

Para realizar la identificación bioquímica se deben transferir colonias presuntivas a agar TSI, agar sangre, caldo de tristona, caldo arabinosa y a caldo urea. Incubar a 35°C por 20 horas. Rechazar las positivas a H<sub>2</sub>S, ureasa positive, arabinosa no fermentadora asi como indol negative.

Para probar para la reacción de ONPG, suspender el crecimiento de TSI en solución salina al 0.85% y hay turbiedad perceptible. Agregar un disco ONPG-impregnado e incubar 6 horas a 35°C, el color amarillo indica la reacción positiva. Rechazar las colonias ONPG-negativas.



### 3.3 *SALMONELLA SP*

#### 3.3.1 Aspectos Generales.

*Salmonella* pertenece a la Familia Enterobacteriaceae, al género *Salmonella*. Es un bacilo Gram (-) aerobio y anaerobio facultativo, produce ácido a partir de la glucosa. Se distinguen 7 distintos subgrupos, cada cual con su fenotipo definido y son serotificados por antígeno (O) somático, Vi de superficie y antígenos flagelares (H) fase I y II. Según la última clasificación, se establece la siguiente nomenclatura, estimándose que el 99% de los aislamientos en clínica corresponden a al subgrupo I:

I.-*S.enterica* subsp. Enterica

II-*S.enterica* subsp. Salamae

III a-*S.enterica* subsp. Arizonae

III b *S.enterica* subsp. Diarizonae

IV.-*S.enterica* subsp. Houtenae

V.-*S.bongori*

VI.-*S.enterica* subsp. Indica

Los miembros del género *Salmonella* son gérmenes patógenos causantes de síntomas clínicos en humanos y en animales. No todos los serotipos son igualmente patógenos para humanos y animales, por lo que desde el punto de vista de salud pública es importante su identificación final.

La naturaleza de la enfermedad varía de acuerdo con el serotipo y es así que *S.Typhi* y *S. Parathyphi* producen cuadros septicémicos y fiebres entéricas y otros

serotipos producen síntomas como náuseas vómitos, dolor abdominal, fiebre y diarrea.

El período de incubación de la enfermedad es desde las 6 hasta 48h y la dosis infectante puede ser de 15 a 20 UFC para algunos serotipos.

Los factores más importantes para su control son una adecuada educación al consumidor y por la implementación y mantenimiento de controles adecuados de calidad por parte del laboratorio de la industria de alimentos la que preferentemente utiliza métodos para analizar sus productos mediante estuches rápidos, los que son eficientes en detectar lotes negativos, pero en el caso de reacciones presumiblemente positivas se debe confirmar con los métodos convencionales.

Una de las fuentes principales son los alimentos contaminados con este microorganismo, especialmente los alimentos de origen animal y los productos vegetales regados con aguas contaminadas.

Los alimentos se analizan para investigar *Salmonella* por las siguientes razones:

1. Confirmar que este microorganismo fue el agente causal de la enfermedad transmitida por Enfermedades de Transmisión por Alimentos (ETA).
2. Determinar qué alimentos o ingredientes de alimentos son fuente de contaminación con *Salmonella*.

Es responsable de millones de casos al año de enfermedades transmitidas por alimentos; Su origen frecuentemente es: huevo crudo y mal cocido, pollos y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y verduras.

Los alimentos comúnmente asociados son:

- carne (vacuno, cerdo, pollo)
- productos cárnicos ( jamón, salami, salchichas)
- ensaladas (papas, ejotes)
- productos de pastelería (cremas)
- productos lácteos (queso, crema)

### **3.3.2 Aislamiento e Identificación**

Los métodos para su detección en alimentos están basados fundamentalmente en que generalmente su presencia está en un menor número que el de la microbiota acompañante, que es muy diversa. En el laboratorio, los métodos convencionales para su recuperación consideran todos estos factores, permitiendo recuperar *Salmonella* mediante procesos de: Pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en medios selectivos, identificación mediante pruebas bioquímicas y serotipificación.

### **3.3.3 Fundamento de la Técnica**

Existen métodos rápidos que han sido aprobados por la AOAC y algunos han sido reconocidos por la FDA como buenas alternativas a los métodos convencionales. Sin embargo los resultados positivos de estos métodos deben confirmarse con el método convencional.

La metodología que se emplea en el laboratorio para el aislamiento de *Salmonella* difiere del método empleado en muestras clínicas debido a varios factores entre los cuales están:

- El número de células es usualmente más bajo que en muestras clínicas
- Los procesos tecnológicos que se aplican a los alimentos debilitan a la bacteria.
- La presencia en los alimentos de sustancias tóxicas para las bacterias.
- La constitución propia del alimento: nutrientes, pH,  $a_w$ , influyen en la sobrevivencia o en su multiplicación.

#### **3.3.4 Pre-Enriquecimiento**

Dependerá del grado de daño de las células, lo cual está relacionado con los procesos tecnológicos aplicados (deshidratación, congelación, calor etc.) y en aquellos alimentos en que se espera un número bajo.

El pre-enriquecimiento es realizado en medios líquidos (agua peptonada, caldo nutritivo, caldo lactosado etc.) que son medios inhibidores del resto de la biota acompañante. Sin embargo es importante que en la elección del medio a utilizar se considere el grado de daños subletales derivados del proceso tecnológico.

En el caso del agua peptonada tamponada (pH7.2) ésta asegura el mantenimiento del pH durante 24 horas, lo que sumado al período de incubación permite el incremento de células que son sensibles a la disminución del pH. A estos medios se les puede adicionar sustancias que contrarresten las sustancias inhibitoras que están presentes en algunos alimentos.

### 3.3.5 Enriquecimiento Selectivo

El enriquecimiento selectivo está destinado a inhibir la biota acompañante. Al contener sustancias químicas inhibidoras y sumado a los tiempos y temperatura de incubación óptimas permite su desarrollo por sobre otros microorganismos. Esto se confirma en los medios selectivos elegidos o por otras pruebas de identificación. Normalmente el intervalo de Temperatura de incubación es de 35°C a 43°C por períodos de 16 a 24 h. Comúnmente los caldos selectivos usados son selenito con cistina (SC), verde brillante, tetrionato (TT), y el caldo cloruro de magnesio-verde malaquita de Rappaport-Vassiliadis (RV).

### 3.3.6 Detección en Medios Selectivo

La detección en medios selectivos, cuyos agentes principales de inhibición son sales biliares, desoxicolato, verde brillante, bismuto de sulfito y antibióticos, la diferenciación de *Salmonella* de otros microorganismos es usualmente determinado por los cambios de color del indicador que se detecta por cambio de pH y que corresponde a la fermentación de lactosa o sacarosa; asimismo la producción de H<sub>2</sub>S o la descarboxilación de lisina y de ornitina.

En microbiología alimentaria comúnmente se utiliza medios como xilosa-lisina dexocolato (XLD), sulfito bismuto, verde brillante con o sin sulfadiazina, Hecktoen, MacConkey, desoxicolato citrato y *Salmonella-Shigella* (SS). Debido a la complejidad y variedad de serotipos, los que presentan diversidad en su fisiología y a la variedad de biota acompañante presente en los alimentos, deben utilizarse al menos, dos de estos medios.

### 3.3.7 Identificación

En los procedimientos de identificación final es recomendable realizar una resiembra en un medio nutritivo y posteriormente sembrar en TSI y LIA además de MIO. En general *Salmonella* es negativa a las pruebas de: ureasa, indol, lactosa y sacarosa y positiva a las pruebas de descarboxilación de lisina y ornitina, así como generalmente producen H<sub>2</sub>S, pero existen variantes atípicas con reacciones positivas a lactosa o no descarboxilación de lisina.

La serotipificación es importante sobre todo desde el punto de vista epidemiológico y además el estudio se puede completar con la determinación de biovariedades y fagotipos. Además de pruebas de sensibilidad a bacteriocinas o resistencia a antibióticos y plásmidos.

### 3.3.8 Factores que afectan el crecimiento, muerte y/o sobrevivencia.

Los límites para el crecimiento de *Salmonella* cuando otras condiciones (por Ej.: temperatura, pH, a<sub>w</sub>) son óptimas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Límites de crecimiento de *Salmonella*

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
T (°C)	5.2	35-43	46.2
PH	3.8	7-7.5	9.5
a <sub>w</sub>	0.94	0.99	0.99

Esta tabla muestra las condiciones óptimas de temperatura, pH y  $a_w$  que favorecen el desarrollo de *Salmonella*. Efectos sinérgicos y antagónicos así como condiciones inherentes a la serovariedad pueden influir para modificar los valores.

### 3.3.9 Temperatura

Debido a que el período de incubación es más largo a bajas temperaturas, es recomendable monitorear durante el almacenamiento a menos de 5°C. Tan importante como el crecimiento a bajas temperaturas es la determinación del tratamiento térmico a aplicar para lograr su destrucción y aunque puede ser suficiente una temperatura de 55°C, es recomendable asegurarse con temperaturas de 63°C o mayores. Durante el proceso de congelación ocurre la muerte lenta de las células, siendo más rápida la muerte entre 0°C y menos 10°C que en un rango de menos 17°C a menos 20°C. *Salmonella* es sensible al calor y las cepas termorresistentes son raras. El intervalo de temperatura aplicada para su destrucción es entre 51.4°C a 90°C, en períodos de tiempo que van en algunos casos, desde segundos hasta 1h dependiendo la termorresistencia de las células, de la actividad de agua ( $a_w$ ), de la naturaleza de los solutos, del pH del medio de suspensión. La termoresistencia disminuye a medida que la actividad de agua ( $a_w$ ) disminuye; La reducción del pH reduce la termoresistencia.

### **3.3.10 Actividad de Agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua afecta el crecimiento de *Salmonella*, siendo el límite inferior de 0.94 y puede sobrevivir por años en alimentos con  $a_w$  bajo (chocolate, pimienta, gelatina)

### **3.3.11 pH**

El mínimo de pH es de 3.8. Cuando el pH es mayor o menor que el óptimo (7-7.5), el crecimiento disminuye. La muerte ocurre cuando se sobrepasan los límites extremos.

### **3.3.11 Sobrevivencia en Alimentos y su Vigilancia**

Aún cuando no forman esporas, sobreviven largos períodos en alimentos y en otros sustratos. En mantequilla mantenida a una temperatura de  $-23^{\circ}\text{C}$  puede sobrevivir más de 10 semanas. En leche almacenada a temperatura ambiente puede sobrevivir 6 meses.

En productos vegetales sobrevive 28 días a una temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  y mucho más tiempo a temperatura ambiente. Su supervivencia en chocolate deshidratado con  $a_w$  entre 0.32 y 0.41 puede prolongarse por meses y sobrevive bien en superficies como cerámica, vidrio y en la piel.



### 3.3.13 Control en los Alimentos (*Salmonella*)

Es necesario asegurarse de su ausencia en alimentos. Los procedimientos de control involucran:

- Asegurar su destrucción, especialmente en los productos agropecuarios crudos de origen animal.
- Prevención de la contaminación en los alimentos.
- Considerar la temperatura de almacenamiento o destrucción.
- Los procesos de control deben considerar la estabilidad de *Salmonella* y su capacidad de multiplicarse en el alimento.

El control en los alimentos necesita confirmar mediante análisis la presencia de *Salmonella* en los alimentos. Los métodos de referencia realizados deben ser los recomendados por organismos internacionales y que han demostrado su sensibilidad y efectividad en la práctica del laboratorio. (BAM, American Public Health Association (APHA) ICMSF, ISO y otros)

De acuerdo con las normas internacionales y al Reglamento Sanitario de los Alimentos la sola presencia de *Salmonella* en un alimento es considerada como causa de rechazo.

## **3.4 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN**

### **3.4.1 Tipificación**

El primer paso en la caracterización de agentes de enfermedades infecciosas implica la diferenciación de patógenos de organismos comensales o saprofitos normales.

Tradicionalmente, los agentes infecciosos han sido diferenciados de acuerdo con las siguientes categorías de características fenotípicas: desarrollo y morfología, bioquímica, serología y fisiología o funcionalidad (56).

La identificación de aislados bacterianos normalmente es suficiente para determinar que alimento o producto está contaminado con patógenos humanos y que pueden ser retirados del mercado.

En varios casos, sin embargo, los aislados bacterianos se pueden agrupar debajo del nivel de especie. La tipificación bacteriana puede ser una parte crítica de la investigación epidemiológica sobre todo cuando se sospecha de una fuente de contaminación.

Ejemplos de tipificación incluyen métodos fenotípicos como: serotipificación, fagotipificación, biotipificación y tipificación por resistencia antimicrobiana. También incluye métodos genotípicos de tipificación como: análisis de enzimas de restricción, PFGE (Electroforesis en Gel de Campos Pulsados), ribotipificación, rep-PCR, entre otros (11).

### **3.4.2 Métodos Fenotípicos de Tipificación**

#### **3.4.2.1 Tipificación por Características Morfológicas y de Desarrollo.**

Cuando las bacterias fueron identificadas por primera vez, fueron diferenciadas de acuerdo con su desarrollo y sus características morfológicas. Las diferencias entre los requerimientos nutricionales de estos organismos determinan sus características de desarrollo. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo a las diferencias de desarrollo observado en cultivos en cajas con agar, en caldos o por técnicas de tinción examinadas bajo el microscopio. En cajas, los organismos bacterianos pueden diferenciarse por el color de la colonia, textura, forma, olor.

#### **3.4.2.2 Tipificación Basada en Características Bioquímicas.**

Los ensayos bioquímicos que han sido utilizados para diferenciar bacterias, hongos o parásitos se basan en la actividad metabólica de los organismos. Las cepas diferenciadas por un panel de examen bioquímico pueden ser agrupadas en biotipos y por lo tanto los ensayos semejantes son referidos como técnicas de biotipificación. El poder discriminatorio de la biotipificación depende del número de pruebas bioquímicas aplicadas a los subtipos de cepas. Cuando las pruebas bioquímicas se usan en combinación con técnicas de biología molecular, pueden tener una alta efectividad en la aplicación de estudios epidemiológicos.

Cuando se combina la detección basada en una sonda de DNA con un método convencional y rápido de biotipificación, se simplifica enormemente la

identificación de un organismo como *E. coli*, diferenciando al mismo tiempo si pertenece a un grupo de patógenos de esta especie.

#### **3.4.2.3 Tipificación por Características Serológicas.**

La serotipificación está basada en la existencia de diferencias entre determinados antígenos de organismos pertenecientes a las mismas especies o subespecies, que son reconocidas por hospederos mamíferos infectados.

Estos antígenos incluyen proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos. Las diferencias entre la estructura terciaria de estos antígenos determina la especificidad.

La mayor limitación de la serotipificación es la existencia en algunos casos, de diferentes cepas de la misma especie, o cepas de diferentes especies que pueden reaccionar con antígenos generando falsos positivos.

#### **3.4.2.4 Tipificación por Características Funcionales o Fisiológicas.**

Las bacterias aisladas pueden ser diferenciadas por su variada respuesta a la manipulación específica a la que son sujetas. Esto incluye diferencias en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (antibiogramas), por susceptibilidad a bacteriófagos, inhibición del crecimiento por bacteriocinas, toxigenicidad, sobrevivencia bajo estrés *in vivo* o *in vitro* y expresión metabólica de enzimas.

#### **3.4.2.5 Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana.**

Es posible determinar las diferencias en la susceptibilidad de un organismo a un panel de agentes antimicrobianos mediante la generación de antibiogramas para cada organismo. En general un antibiograma sirve como una herramienta para futuras subdivisiones de cepas, pero por sí solo, no presenta el nivel de especificidad requerido para aplicaciones epidemiológicas.

#### **3.4.2.6 Tipificación por Bioensayos de Toxigenicidad.**

La capacidad de distinguir diferencias en las propiedades de virulencia de microorganismos patógenos es un componente importante de las investigaciones epidemiológicas. Por ejemplo, se pueden detectar toxinas con base en sus efectos citotóxico en las células Vero.

#### **3.4.3 Métodos Genotípicos de Tipificación de Cepas**

Todos los métodos de tipificación basados en los ácidos nucleicos tienen su base en el análisis de las diferencias en el contenido de ácidos nucleicos cromosomales y extracromosomales o en las secuencias de ácidos nucleicos entre las cepas.

La ventaja de la tipificación de sistemas basada en los ácidos nucleicos es que es menos probable que sea afectada por las condiciones de crecimiento o por manipulación en el laboratorio. Otra ventaja de esta tipificación es que se pueden agrupar los sistemas tipificados por medio de tres procedimientos de análisis básicos: hibridación, electroforesis en gel y secuenciación de ácidos nucleicos.

### **3.4.3.1 Métodos de Tipificación Basados en el Genoma.**

Hay tres categorías de métodos de tipificación basados en el análisis del genoma completo contenido en un organismo. La primera se basa en las diferencias en el tamaño de fragmentos de DNA que ocurren cuando se digieren con ciertas endonucleasas de restricción, debido a que reconocen algunos sitios específicos. La segunda categoría implica la comparación de secuencias múltiples del genoma completo. La tercera categoría involucra la hibridación de la muestra con DNA o RNA en miles de pequeños fragmentos fijos sobre un portaobjetos de vidrio o en un filtro de nitrocelulosa.

### **3.4.3.2 Tipificación por Análisis de Enzimas de Restricción**

Este es un método aplicable de manera universal, es rápido, económico y relativamente sencillo de realizar, además de ser muy reproducible. Algunas de sus desventajas son: la selección del número de endonucleasas de restricción a usar puede ser caro en tiempo y dinero, un fragmento obtenido puede contener fragmentos de tamaño similar de diferentes áreas del cromosoma y fragmentos largos pueden no migrar en el gel.

### **3.4.3.3 Tipificación por rep-PCR**

Esta técnica es muy reproducible y moderadamente discriminatoria, utiliza iniciadores conservados que son ampliamente aplicados., sin embargo esta

técnica puede no ser aplicada ampliamente ya que su poder de discriminación es bajo en comparación con otras técnicas como la de campos pulsados PFGE.

#### **3.4.3.4 Tipificación por Campos Pulsados (PFGE)**

Esta es una herramienta para estudios taxonómicos y epidemiológicos, tiene una alta reproducibilidad además, produce alrededor de entre 5 y 30 bandas visibles fácilmente aunque, el equipo requerido es caro y el método es complejo.

### **3.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa PCR [por sus siglas en inglés] es una técnica que permite amplificar [“multiplicar”] pequeñas cantidades de DNA entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de DNA que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas un tanto complejas, por ejemplo, DNA nuclear total.

El método se basa, en su forma más simple, en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. (Figura 1)

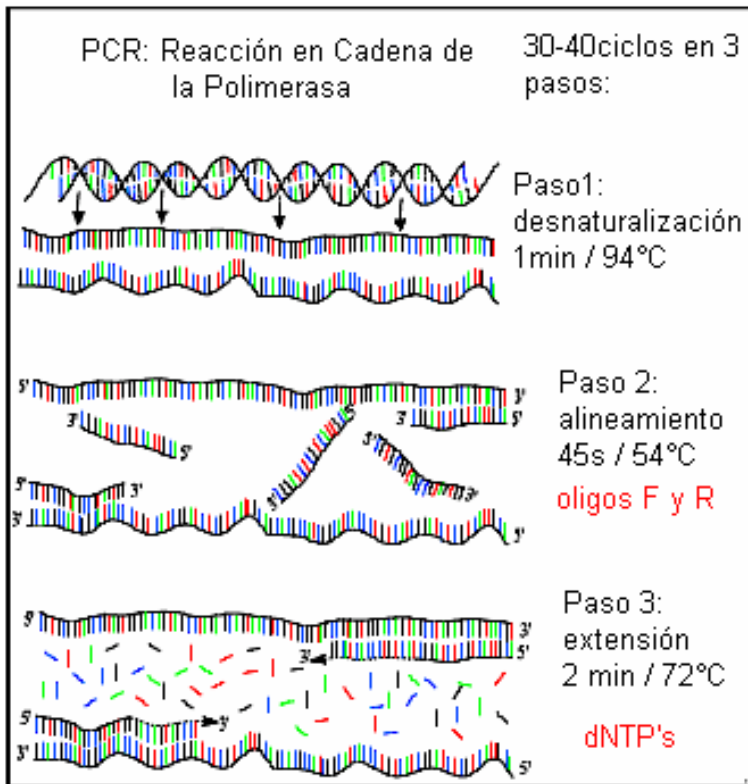


Figura 1. Diagrama PCR (1). Para lograr la duplicación de un tramo de DNA, cada ciclo de la técnica de PCR incluye tres etapas: Desnaturalización [durante la cual se separan las dos hebras constituyentes del DNA], Apareamiento de los *primers* de la región a replicar y extensión de las cadenas de *primers* gracias a la acción de la enzima Taq polimerasa. La repetición de los ciclos permite multiplicar exponencialmente las regiones de DNA elegidos.

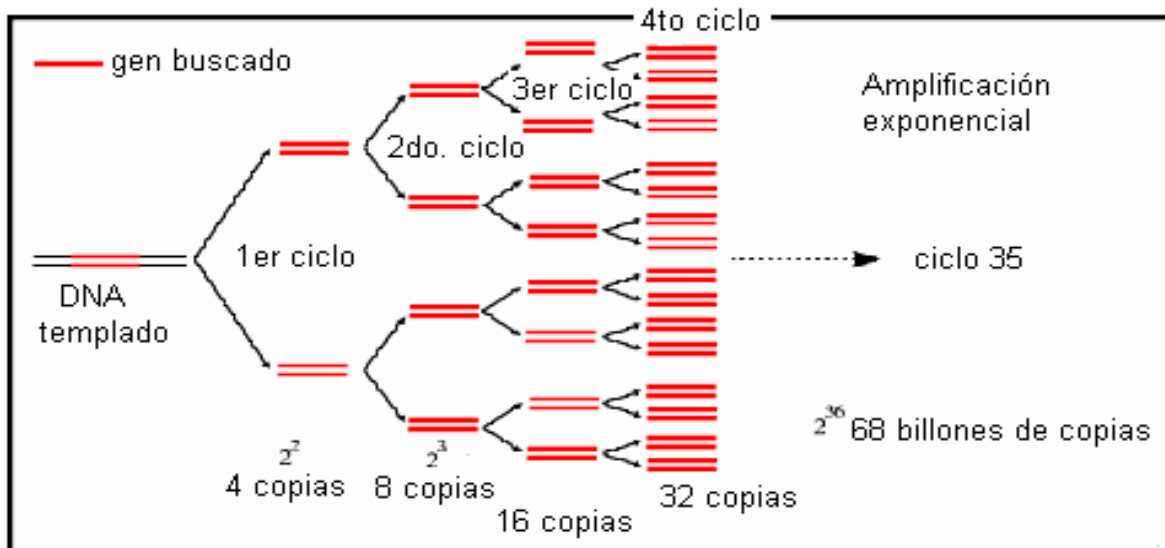


Figura 2. Diagrama PCR (2). Amplificación exponencial de una región de DNA elegida

La muestra se calienta en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que forman el DNA, a este hecho se le conoce como *desnaturalización*.



En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el “apareamiento” de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos [oligonucleótidos] con cada una de las hebras separadas del DNA molde. Se trata de segmentos de DNA de cadena simple, sintetizados en laboratorios especializados y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de DNA que se desea replicar.

Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se les denomina iniciadores o “primers”, debe tener una secuencia complementaria a la del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del DNA molde. En tercer lugar, una enzima DNA polimerasa iniciadora sintetiza las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde en el espacio comprendido entre ambos. Para ello, la DNA polimerasa usa desoxidonucleósidos trifosfato [dNTP's], agregados a la mezcla de reacción.

La temperatura a la que se realiza el tercer paso esta condicionada por aquella a la cual “trabaja” la enzima DNA polimerasa.

Al cabo del primer ciclo de tres reacciones [desnaturalización, apareamiento y extensión] el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos “en cadena” da lugar a la amplificación geométrica del segmento de DNA por los iniciadores (Figura 2).

Para poder replicar el DNA, la técnica de PCR utilizaba en un principio, la DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*, pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para la desnaturalización de la doble cadena de DNA, por lo cual, debía agregarse otra enzima fresca al comenzar el

tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado cuando la enzima procedente de *E. coli* fue reemplazada por la enzima obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa. Esta enzima trabaja eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste más de dos horas a 93°C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados. Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar [en muy poco tiempo] gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. La técnica de PCR es el método de detección de secuencias de DNA más sensible conocido hasta la fecha. Mediante ella, resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática, o un espermatozoide por ejemplo. Es, por lo tanto, un instrumento sumamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco o similitud.

### **3.6 SERUNAM**

La Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Facultad de Medicina, posee el único banco de sueros de México con cepas de diversas bacterias asociadas a la diarrea por lo cual trabaja en la identificación de microorganismos asociados con esa enfermedad, que en México es frecuente causa de muerte entre los niños menores de cinco años.

El doctor Alejandro Cravioto Quintana, quien fuera director de la Facultad de Medicina, proyectó la creación de un banco de sueros propio, que sirviera como instrumento para reconocer e identificar a las bacterias diarreicas en el país.

Desde entonces, él y su equipo de trabajo utilizan sueros para tipificar enterobacterias. Su objetivo es establecer la etiología de la diarrea en México, esto es, las causas y orígenes de la enfermedad.

El "rastreo" de estos microorganismos ha llevado a constituir un creciente banco de sueros, que hoy cuenta con certificación internacional y registro bajo la marca SERUNAM. Está listo para realizar actividades comerciales de vinculación, y un primer convenio específico, lo signó con Laboratorios Silanes para desarrollar un método de diagnóstico de la diarrea que sea rápido y muy sensible.

Los especialistas de la Facultad de Medicina hacen uso de la serología para identificar a las bacterias causantes de diarrea. Mediante los sueros conocen las reacciones entre el antígeno (o agente externo, en este caso la bacteria) y el anticuerpo (la proteína defensora, sustancia interna del sistema inmunológico que intentará combatirla).

Los sueros se preparan utilizando antígenos específicos de la pared celular y el flagelo de la bacteria en estudio. Primero se requieren las cepas de las bacterias, que fueron obtenidas hace años en los bancos de cepas de Atlanta, Copenhague y Londres, donde son aisladas y se utilizan como referencia científica internacional. Obtenida la bacteria específica, se crea la tecnología para poder llevar el suero a una muestra contaminada (por ejemplo de *Escherichia coli*), donde se expresa la reacción entre el antígeno y el anticuerpo. Estos análisis permiten identificar la familia a la que pertenece la bacteria que está causando la infección intestinal. Con este método se han logrado identificar cinco grupos

diferentes de *E. coli*, relacionados con distintos tipos de diarreas. Esto, porque la serología permite un estudio muy fino, que se complementa con estudios posteriores de biología molecular para conocer el daño de la bacteria y su asociación genética.

La marca comercial SERUNAM es propiedad de la Universidad Nacional Autónoma de México e incluye a todos los sueros que esta investigación biomédica ha agrupado durante años para tipificar diferentes bacterias. Hasta ahora se cuenta con 175 sueros contra los antígenos somáticos y 56 que combatan a los antígenos flagelares de la bacteria *Escherichia coli*; 155 contra el *Vibrio cholerae*, 60 en el caso de *Aeromonas* y otros tantos sueros para las bacterias *Salmonella* y *Shigella*.

Estas cinco bacterias fueron elegidas para estudios serológicos porque son los patógenos más importantes causantes de enfermedades intestinales en el país.

Para la obtención de los sueros se inmunizan individualmente a conejos con cada antígeno específico. Previamente se les toma una muestra de sangre para verificar que su suero no responde contra ninguno de los antígenos bacterianos. Después se toma otra muestra que evalúa la respuesta del conejo, y si ésta es positiva se obtiene el suero de ese individuo. Cada suero obtenido se congela, almacena y etiqueta de forma precisa, con un estricto control de calidad.

Con este tipo de estudios, además de acrecentar el bando de sueros y acumular antígenos específicos para cada tipo de diarrea, se espera conocer la virulencia de las bacterias, así como la respuesta inmune del organismo contra ellas. Esto

servirá en el futuro para diseñar métodos de diagnóstico rápido y vacunas específicas que prevengan las diferentes diarreas. De hecho, ya se cuenta con una vacuna contra una cepa de *E. coli*, que al doctor Alejandro Cravioto junto con su equipo les valió el Premio “León Bialik de Desarrollo Tecnológico 1995”<sup>(29)</sup>.

Actualmente, los resultados obtenidos con SERUNAM se validan constantemente con sus pares de Estados Unidos y Europa. Incluso, de diversos países de América Latina, Estados Unidos y Oriente se reciben muestras para analizar sus bacterias, y ello es utilizado para conocer la epidemiología de cada región del mundo.

Debido al desarrollo de no es necesario SERUNAM importar cepas bacterianas generalmente de países como Estados Unidos y Francia y se ofrece una marca probada científicamente que genera beneficios económicos a la UNAM y a los industriales que acceden a ella por su bajo costo y calidad internacional.

El banco de sueros SERUNAM es el único sitio en México que posee una amplia gama de sueros para identificar enterobacterias de interés médico en el país y otros países de América.

### **3.7 SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK PARA IDENTIFICACION**

El sistema Vitek para la identificación automatizada de microorganismos se basa en la identificación de diferentes tipos de microorganismos mediante la realización

de pruebas bioquímicas. Deben seleccionarse las tarjetas adecuadas para la identificación, dependiendo del tipo de microorganismos que se trate. Por ejemplo, con la tarjeta para Gram negativos, se identifican miembros de la familia Enterobacteriaceae y un grupo seleccionado de bacterias Gram-negativas no fermentadoras de glucosa y miembros de la familia Vibrionaceae, está diseñado para usarse conjuntamente con la tarjeta Vitek para identificación de Gram-negativos(GNI)ON

### **3.7.1 Descripción**

La tarjeta se compone de 30 pocillos, de los cuales 29 contienen caldos bioquímicos y un caldo para control de crecimiento. La tarjeta para identificación de Gram-negativos realiza una serie de pruebas bioquímicas convencionales y no convencionales. La mayoría de las pruebas son convencionales tales como las del sulfuro de hidrógeno, descarboxilasas, citrato y TDA que han sido adaptadas al sistema Vitek. Se utilizan tres pruebas no convencionales para completar las identificaciones.

El concepto miniaturizado de la tarjeta GNI proporciona las condiciones aerobias y microaerófilas para cada prueba que las requiera. La facultad de un organismo de fermentar la glucosa determina en que grupo de la base de datos se coloca para su identificación. La tarjeta GNI se basa en los métodos bioquímicos establecidos de Edwards y Swing <sup>(16)</sup>, Gilardi <sup>(23)</sup> y Oberhofer y Rowen <sup>(50)</sup>. La identificación por lo general requiere entre 4 y 13 horas de incubación en el Lector / Incubador Vitek. No obstante, hay excepciones, entre ellas se cuentan de 2 a 13 horas para

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella species* y *Salmonella Typhi*; de 2 a 18 horas para *Acinetobacter calcoaceticus*; 4 a 18 horas para *Pseudomonas aeruginosa* y 6 a 18 horas para otras bacterias Gram-negativas no fermentadoras.

La tarjeta GNI requiere de un tiempo mínimo de preparación. Solamente se requiere llevar a cabo una tinción de Gram, la prueba de la citocromo oxidasa, así como estandarizar el inóculo antes de llenar la tarjeta. Con la utilización de la tarjeta se eliminan los errores de lectura e interpretación subjetivas que pueden darse cuando se utilizan los métodos tradicionales. Reduce las posibilidades de contaminación y al mismo tiempo proporciona un inóculo uniforme en todos los pocillos. El programa informático del equipo Vitek determina si la reacción en cada pocillo es positiva o negativa midiendo la atenuación de luz mediante el sistema óptico. Estos patrones se analizan automáticamente. Cuando finaliza el ciclo de incubación se imprime una identificación para cada tarjeta.

### **3.7.2 Conservación y Manejo**

Las tarjetas GNI deben conservarse entre 2 y 8 °C en sus envoltorios protectores, sin abrir. Antes de la extracción de la tarjeta de su envoltorio protector, dejar que la tarjeta alcance la temperatura ambiente.

### **3.7.3 Preparación del Inóculo**

Los organismos que se van a identificar deben proceder de un cultivo puro no superior a 24 horas en agar tripticaseína de soya (TSA).

### **3.7.4 Resultados**

Los ensayos bioquímicos de la tarjeta GNI son analizados y guardados automáticamente por el sistema informático Vitek. Al término del ciclo de incubación se imprime en el Lector / Incubador un informe para cada tarjeta.

El ciclo de incubación es de 2 a 18 horas. La probabilidad normalizada que figura en los informes indica la semejanza relativa de que el organismo elegido sea identificado correctamente entre el conjunto de organismos dado. La probabilidad se determina a partir del patrón de reacciones bioquímicas establecidas por el ordenador Vitek.

## **3.8 PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS**

### **3.8.1 Importancia de la Resistencia a Antibióticos**

Son varios los mecanismos desarrollados por las bacterias para crear resistencia a los antibióticos. Podemos mencionar la disminución en la permeabilidad de la membrana externa por los bacilos Gram negativos, la alteración de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP), y la producción de diversos tipos de enzimas antidrogas (B-lactamasas) (21).

Tras la introducción en el mercado de las cefalosporinas de amplio espectro, como la ceftazidima y la ceftriaxona, la resistencia a estos antibióticos aumentó rápidamente entre ciertas especies de enterobacterias. *Enterobacter cloacae* produce betalactamasas codificadas cromosómicamente por los genes *AmpC* y



*AmpD*. Su mecanismo de resistencia más importante es la producción de betalactamasas como resultado de la mutación del gen regulador *ampD* que normalmente previene la expresión de estas enzimas en grandes cantidades. El aislamiento de este tipo de betalactamasas de amplio espectro en las cepas de *Enterobacter cloacae* se encuentra en aumento en todo el mundo. La mayor parte de la resistencia se debe a las enzimas TEM y SHV, y las cepas mutantes son conocidas como betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas también fueron aisladas en cepas de *E. coli*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp.

La prevalencia de infecciones provocadas por el género *Enterobacter* está en aumento en la práctica clínica. En la actualidad se ubica entre los 5 patógenos nosocomiales más frecuentes en los hospitales de los EE.UU. y ha reemplazado a *Klebsiella* spp como tercer causa de neumonía intrahospitalaria, registrándose también un aumento de su resistencia a los antibióticos (66).

### **3.9 BIOPELÍCULAS**

Los microorganismos pueden encontrarse en forma libre o formando parte de comunidades complejas. Cuando se encuentran en comunidades de microorganismos que crecen en una matriz de exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo, se les llama biopelículas. Su composición es variable en función del sistema en estudio, en general, el

componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua, las células bacterianas, y los polisacáridos, en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias (4).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas de la biopelícula. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro de la biopelícula se encuentren con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de la biopelícula y dificulta su estudio (34). En la actualidad, son de gran importancia algunas bacterias ubicuas, ya que son capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos con antibióticos y no pueden eliminarse. La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biopelículas normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, y producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias de la biopelícula pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido. La resistencia se atribuye a la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos; el crecimiento de las bacterias de la biopelícula debido

a la limitación de nutrientes; la existencia de microambientes que sean antagonistas a la acción del antibiótico; así como a la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo diferente (34) (69).

La presencia de biopelículas en la superficie del mango tiene grandes repercusiones, a nivel industrial, ya que se busca eliminarlos para lograr la inocuidad de los mangos

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) se ha visto que los flagelos, y las fimbrias de tipo I, IV son importantes para la etapa de adherencia primaria. La movilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la movilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram-positivas inmóviles, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Mycobacterium* son capaces de formar la biopelícula. En el caso de las bacterias Gram-positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar, emiten señales químicas que las “comunican”. Cuando la concentración de estas señales supera un umbral determinado se activan los mecanismos genéticos de producción de exopolisacáridos.

En una etapa posterior la bacteria comienza a excretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poli-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación de la biopelícula. La liberación de las bacterias desde la biopelícula es el proceso que menos se conoce <sup>(34)</sup> (18).

Los microorganismos asociados con la formación de biopelículas se encuentran protegidos a la acción de sanitizantes, lo que provoca que aquéllos que logren pegarse a la superficie de frutos o verduras, agregarse y ser parte de una biopelícula se vuelvan más resistentes a tratamientos de lavado. El uso de cepillos para remover las biopelículas se considera efectivo, sin embargo los cepillos también pueden ser una fuente importante de microorganismos. Alternativas de sanitizantes usados para la eliminación de biopelículas son aquellos productos que contienen lactoferrina <sup>(43)</sup>.

Actualmente se trabaja en el desarrollo de técnicas que permitan estudiar a los microorganismos formadores de biopelículas. Es necesario primero despegar a los microorganismos de la superficie y posteriormente cuantificarlos e identificarlos.

Existen también métodos de observación directa, que son técnicas de microscopía, dentro de los cuales se utilizan microscopios de luz, confocales (lasser), y transmisión de electrones. El uso de microscopía directa es muy útil y permite obtener resultados confiables sobre la formación de biopelículas <sup>(14)</sup> (48).

Es necesario determinar la capacidad de formación de biopelículas por las cepas aisladas del mango.

Esto, junto con la información sobre las fuentes de contaminación permitirá sugerir métodos de control para asegurar la inocuidad del mango.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la fuente de contaminación con enterobacterias durante el tratamiento post-cosecha del mango, así como su capacidad de formación de biopelículas, para que estos datos sean posteriormente utilizados con el fin de establecer procedimientos por medio de los cuales se asegure su inocuidad.

### Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Salmonella sp* y de *Escherichia coli* en la superficie de mangos provenientes del estado de Nayarit.
- Aislar e identificar las cepas de otras enterobacterias presentes en los mangos de exportación.
- Tipificar serológicamente y caracterizar fenotípicamente mediante la determinación de perfiles de sensibilidad a antibióticos las cepas aisladas.
- Determinar la capacidad de formación de biopelículas de las cepas de *Enterobacter cloacae*, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*.

## **5. HIPOTESIS**

Si es posible la identificación y la tipificación de las enterobacterias aisladas en las diferentes etapas del proceso post-cosecha, entonces se podrá conocer la posible fuente de contaminación del mango.

Además si se detecta la capacidad de formación de biopelículas, entonces será necesario el establecimiento de procedimientos especiales de limpieza.

## 6. METODOLOGÍA

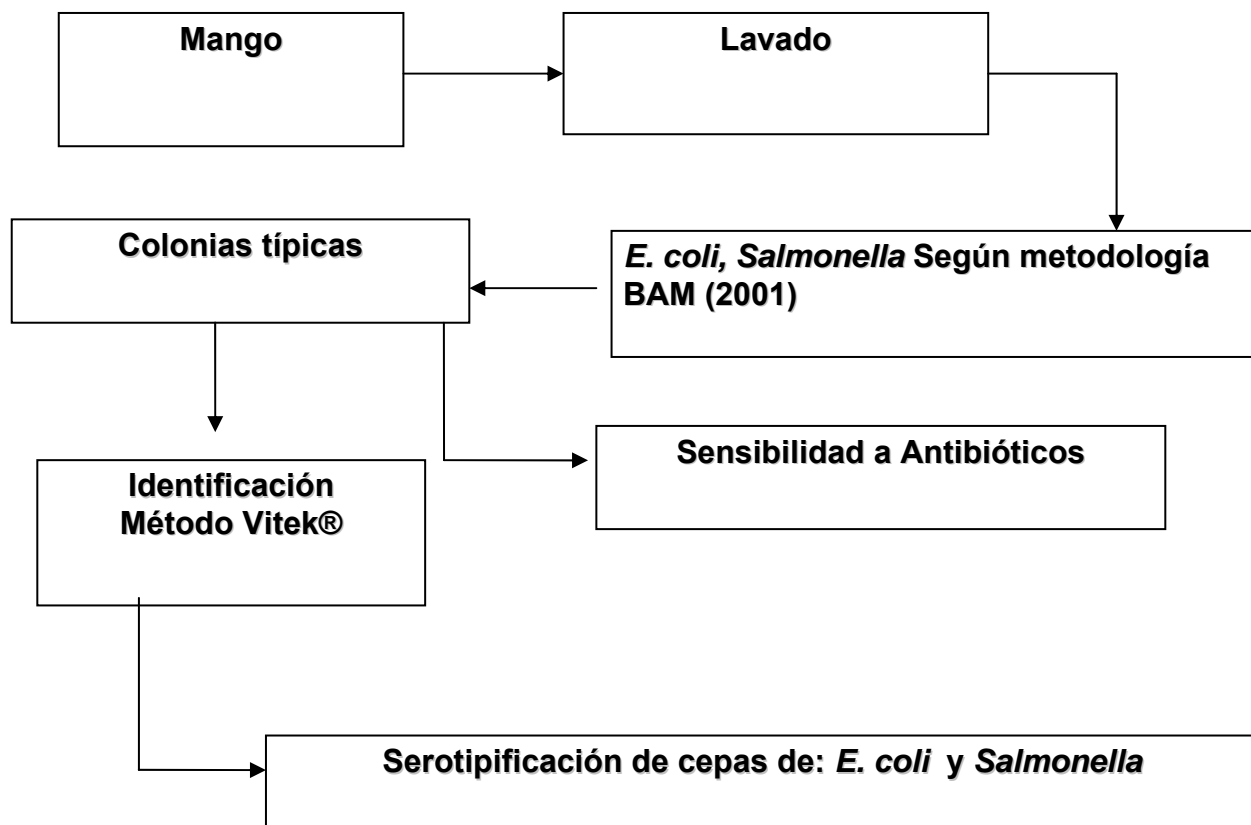


Figura 3. Diagrama de la metodología que se siguió en el proyecto.



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 MUESTREO EN TEPIC, NAYARIT**

Esta parte del proyecto fue realizada por un grupo de investigadores del Tecnológico de Tepic, Nayarit. Ellos muestrearon mangos de la variedad Ataulfo y agua de diferentes puntos de proceso. El nombre de la empacadora de mangos de exportación en donde se realizó el muestreo es NATURAMEX SRL de CV la cual se ubica en el poblado conocido como 5 de Mayo en el municipio de Tepic, Estado de Nayarit, México. Se tomaron muestras de diferentes puntos durante el procesamiento post-cosecha de mangos de Tepic, Nayarit (Figura 4), de acuerdo con el método ICMSF <sup>(27)</sup>. Se tomaron muestras de:

1. Mango de recepción
2. Agua de pozo
3. Mango después de lavado
4. Agua de remojo
5. Agua después de lavado
6. Mango después de tratamiento hidrotérmico e hidrogenfriado
7. Agua de tratamiento hidrotérmico
8. Agua de hidrogenfriado
9. Mango de zona de tolvas
10. Mango empacado

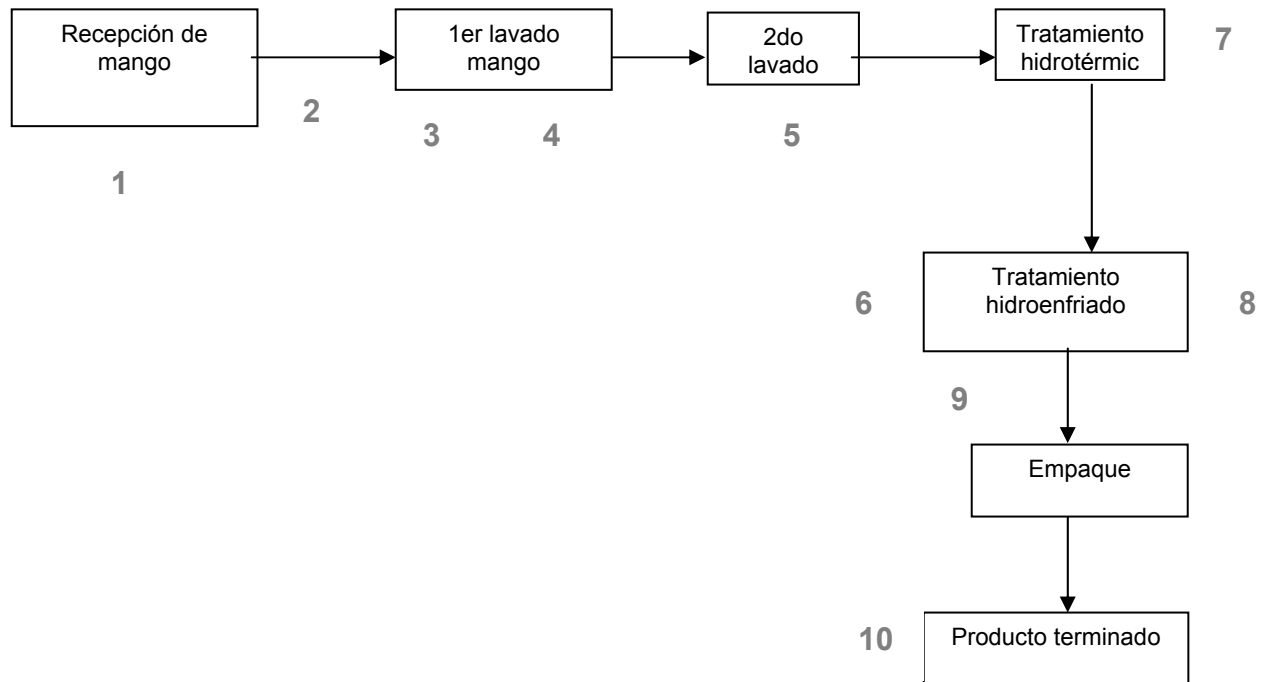


Figura 4. Diagrama del procesamiento de mangos en la empaquera de NATURAMEX SA de CV en Tepic, Nayarit y puntos de muestreo

## 7.2 EXTRACCIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA SUPERFICIE DEL MANGO (EN TEPIC, NAYARIT)

Se colocó cada mango en una bolsa de plástico tipo Ziploc (16.51 x 14.92 cm), se añadieron 100 mL de agua desionizada estéril y se agitó sobre un vortex, masajeando el mango con las manos (por fuera de la bolsa) durante 5 minutos.

Se uso ese extracto para:

### 7.2.1 Detección de *Salmonella*

De acuerdo con la metodología del BAM (2001), se inocularon 25 mL de extracto en 225 mL de caldo lactosado (Oxoid), posteriormente se incubó a 35°C/24h. Después se inocularon 10 mL de caldo tetrionato(Oxoid) y 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis(Oxoid) con 1 mL del cultivo en caldo lactosado(Oxoid), se incubó a 42°C/24h.

Pasado este tiempo, se inoculo por estría en Agar Sulfito Bismuto, Agar XLD y Agar Hektoen (Oxoid), se incubó a 35°C/24h. Después de este periodo de incubación se buscaron colonias típicas en cada uno. De las colonias típicas, se inocularon 1 o 2 de cada medio, en tubos inclinados de Agar nutritivo o Agar de soya y tripticaseina [TSA] (Oxoid).

### 7.2.2 Detección de *Escherichia coli*.

Se siguió la metodología establecida en el BAM (2001). Primero, se inocularon 25 mL de extracto en 225 mL de caldo BHI (Oxoid), incubando a 35°C/3h (para recuperar células dañadas) luego, se incubó a 44°C/20h (enriquecimiento).

Después se inoculó por estría en Agar McConkey, Agar EMB y Agar McConkey-Sorbitol (Oxoid). Posteriormente se incubó a 35°C/20h.

Pasado el tiempo de incubación se aislaron de cada muestra 10 colonias fermentadoras de lactosa y 10 colonias no fermentadoras de glucosa. (BAM, 2001)

Se recibieron entonces aislados de colonias típicas de estos microorganismos, que pueden corresponder a *E. coli*, a *Salmonella* o a enterobacterias relacionadas.

Los aislados fueron colectados en los sitios que se mencionan en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación de las muestras de aislados de la superficie de mangos Ataulfo y Agua de una compañía exportadora de mango de Nayarit, México.

<b>IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS ( Mangos: Ataulfo y Agua)</b>	
<b>MR</b>	<b>Mango de Recepción</b>
<b>DL</b>	<b>Mango Después de Lavado</b>
<b>DH</b>	<b>Mango Después del tratamiento Hidrotérmico e Hidroenfriado</b>
<b>ZT</b>	<b>Mango en Zona de Tolvas</b>
<b>ME</b>	<b>Mango Empacado</b>
<b>AP</b>	<b>Agua de Pozo</b>
<b>AR</b>	<b>Agua de Remojo</b>
<b>ADL</b>	<b>Agua Después de Lavado</b>
<b>AHE</b>	<b>Agua Hidroenfriado</b>
<b>AHT</b>	<b>Agua Hidrotérmico</b>

### **7.3 PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS**

De los aislados de colonias típicas se estrió en placas con Agar Gelosa Sangre (Oxoid) y se incubaron a 37°C/24h. Posteriormente se llevó a cabo una observación microscópica.

Se tomaron colonias puras y aisladas con asa estéril y se estriaron en placas de Agar McConkey (Oxoid). Al verificar la presencia de colonias típicas se hizo una transferencia a tubos inclinados de Agar TSA (Oxoid) para su posterior identificación por el método Vitek (bioMérieux) (5).

### **7.4 PRUEBA DE LA OXIDASA**

Esta prueba se realizó previo a la identificación, para esta prueba se colocó una muestra del crecimiento bacteriano (una colonia) en un papel filtro impregnado con diclorohidrato de tetrametil-p-fenildiamina al 1% (reactivo de Kovacs (Oxoid)). El cambio de color a azul - púrpura en diez segundos, indicó una reacción positiva.

### **7.5 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO VITEK**

Una vez confirmada la pureza de las cepas, cada una de ellas fue suspendida en solución salina estéril (0.85%) en tubos de ensaye para Vitek ajustando la transmitancia en un valor de 0.8 (de acuerdo con las instrucciones del equipo Vitek). Posteriormente se colocó la manguera a la tarjeta correspondiente para cada cepa. Se utilizaron tarjetas GNI+ (Gram Negative Identification). La charola con las muestras y las tarjetas se colocaron dentro de una cámara de vacío en el

equipo Vitek durante tres minutos para introducir la mezcla a la tarjeta por medio de vacío. Posteriormente, se introduce cada tarjeta en la cámara de corte donde se corta la manguera con una cuchilla caliente. Se debe de asegurar que la manguera esté bien cortada, de no ser así, se corta con una navaja los restos de manguera. Las tarjetas con la muestra se colocan en los rieles del equipo y se incuban a 24 h/20°C. El equipo donde se incuban las tarjetas realiza lecturas cada treinta minutos. El equipo compara los resultados obtenidos con su base de datos y presenta el resultado de la identificación con datos sobre la confiabilidad de la misma.

## **7.6 TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS**

### **7.6.1 Determinación del Patrón de Sensibilidad a Antibióticos Mediante el Método Vitek.**

Al igual que para la identificación, se prepararon tubos de ensaye con solución salina al 0.85%, se inocularon y se ajustaron con el nefelómetro a 0.8 de Trasmítancia; para después tomar 50µL de esta solución que se colocaron en otros tubos que contenían 1.8 mL de solución salina estéril. Posteriormente se procedió al llenado de las tarjetas GNS (Gram Negative Sensibility) y se siguió la misma técnica de uso del equipo Vitek que se realizó para las tarjetas de identificación.

Tabla 6. Tipos de antibióticos utilizados en esta prueba

<b>GRUPO</b>	<b>VITEK</b>	<b>SENSIDISCOS</b>
<b>AMPICILINAS</b>	Ticarcilina /CA	AMP (ampicilina)
<b>β-LACTMICOS</b>	Amoxicilina / CA Piperacilina	AMC (amoxicilina) PRL (piperacilina)
<b>CEPHEMS</b>	Cefazolina Cefepime Ceftriaxona Ceftazidime Cefuroxime-axetil	KF (cefazolina)
<b>CARBAPENEMS</b>	Meropenem	
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>	Gentamicina Amikacina	GN (gentamicina)
<b>TETRACICLINAS</b>		TE ( tetraciclina)
<b>FLUOROQUINOLONAS</b>	Ciprofloxacina Norfloxacina Ofloxacina	
<b>FOLATE PATHWAY INHIBITORS</b>	Trimetoprima Trimetil-sulfa	W (trimetoprima) S3 (sulfametoxazol)
<b>PHENICOLS</b>		C (cloranfenicol)
<b>NITROFURANTOINAS</b>	Nitrofurantoina	

## 7.6.2 Serotipificación

Se llevó a cabo de acuerdo con los métodos establecidos por Orskov y Orskov, (1984) <sup>(53)</sup>. Se realizaron reacciones de aglutinación para determinar tanto el antígeno somático (O) como el flagelar (H), usando los sueros específicos SERUNAM (Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM).

### 7.6.2.1 Determinación del antígeno somático para *Escherichia coli*.

Para esta determinación se sembró en tubos inclinados de TSA una colonia de *E. coli* tomada de placa de TSA (Oxoid) con asa estéril. Se incubó 37°C/24h. Posteriormente se agregaron 10 mL de solución salina a cada tubo de TSA. Se homogenizó y se transfirió a otro tubo de ensaye etiquetado con cinta tipo masking tape. Después de ello se sometió a un efluente de vapor (105-110°C) durante 60 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron aproximadamente 10 mL de formalina (0.06%) a cada tubo [la finalidad es diluir el antígeno y conservarlo]. Cada tubo se tapó con parafilm y se conservó a temperatura ambiente.

Por cada cepa, se utilizaron 3 placas de plástico con 96 pozos donde se colocaron los sueros específicos (175 RAC) además del antígeno (50µL de cada uno). Las placas se cubrieron con papel plástico y se incubaron a 50°C/24h.

El reporte de la aglutinación de cada pozo (si la hubo) se marcó desde +1 hasta +4 dependiendo la intensidad de dicha aglutinación. En aquellos en los que se observó reacción se realizó el ensayo de titulación utilizando sueros homólogos.



#### **7.6.2.1.1 Determinación de la reacción con sueros homólogos.**

De cada uno de los sueros seleccionados con los que se observó reacción, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  (sueros diluidos 1:100) en la primera línea de la microplaca de 96 pozos (A) y al resto (B-H) 50  $\mu\text{L}$  de solución salina 0.85%. A partir de los sueros colocados en la primera línea de la microplaca (A) se tomaron 50 $\mu\text{L}$  y se realizaron diluciones al doble (1:200 hasta 1:12800), desechando la última alícuota. Una vez realizadas las diluciones se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del antígeno a evaluar, las microplacas se cubrieron perfectamente con plástico adherente y se incubaron a 50°C durante 24 horas. Después del período de incubación se efectuó la lectura de cada una de las placas, la intensidad de la reacción de la aglutinación se determinó, cuando se cuantificó arbitrariamente de +1 a +4 con los sueros en los que se observó aglutinación. Se seleccionaron los sueros que presentaron la reacción de aglutinación con la mayor dilución a la reportada o bien cercana a ésta.

Por lo general después de esta acción, se lleva a cabo la confirmación del serogrupo por medio del uso de sueros puros sin embargo, en este caso en que teníamos dos cepas de *E. coli*, ambas dieron positivo para el mismo suero sin tener aglutinación con ninguno otro por lo tanto, no fue necesario utilizar los sueros puros.

### **7.6.2.2 Determinación del antígeno flagelar para *Escherichia coli*.**

Para llevar a cabo esta determinación se prepararon tubos con 1g de biotriptasa en 50mL de agua destilada. Una vez que este medio se esterilizó, se tomaron 10mL y se transfirieron a otros tubos de ensaye.

Con asa estéril se tomó una asada del crecimiento de la *E. coli* en el medio semisólido de TSA (el cual estuvo en incubación de 30°C/360h). Se incubó a 30°C/24h. Posteriormente se agregó formalina a cada uno de los tubos y se homogenizaron.

Al igual que para el antígeno somático se utilizaron microplacas de 96 pozos. Se colocaron 50 µL de cada uno de los diferentes sueros a probar (56 RAC) y 50 µL del antígeno obtenido. Las microplacas, se cubrieron perfectamente con plástico adherente, una por una y se incubaron a 50°C durante 2 horas. La lectura de las microplacas se efectuó después del tiempo de incubación y en los pozos en los que se observó aglutinación se determinó la intensidad, asignando de 1+ a 4+. Los sueros en los cuales se observó aglutinación se seleccionaron para realizar el ensayo con sueros homólogos.

#### **7.6.2.2.1 Determinación de la reacción con Sueros Homólogos**

De los sueros seleccionados (diluidos 1:100), se colocaron 100 µL en la primera línea de la microplaca de 96 pozos (A) y al resto (B-H) 50 µL de solución salina 0.85%. Partiendo de los 100 µL de suero a probar (A), se tomaron 50 µL y se realizaron diluciones al doble (1:200 hasta 1:12800) y se desechó la última

alícuota. Una vez realizadas las diluciones se agregaron 50  $\mu$ L del antígeno a evaluar. Las microplacas, se cubrieron con plástico adherente, una a una y se incubaron a 50°C durante 2 horas. La lectura se efectuó de la forma mencionada anteriormente. Partiendo de estos resultados se seleccionaron los sueros que presentaban aglutinación con la dilución superior a la reportada o bien cercana a ésta. Como en el caso del antígeno somático, por las razones ya explicadas, no fue necesario llevar a cabo el ensayo con sueros puros.

#### **7.6.2.3 Determinación del antígeno somático para *Salmonella*.**

La biomasa de *Salmonella* en las placas con TSA se colocó en tubos con 0.5mL de solución salina. Se agregaron 10 $\mu$ L de formaldehído puro.

Se hicieron las pruebas de aglutinación sobre algunos portaobjetos colocando unos 10  $\mu$ L del suero específico y otros 15  $\mu$ L del antígeno.

La aglutinación ocurrió en el primer minuto después de hacer la mezcla sobre el portaobjetos. Se registró el suero con el que se obtuvo aglutinación.

#### **7.6.2.4 Determinación del antígeno flagelar para *Salmonella*.**

Primero se sembró por picadura en medio semisólido de TSA. Se incubó a 37°C/24h. Después de este tiempo se tomó una asada del crecimiento de la superficie. Se sembró posteriormente en caldo BHI, se incubó a 37°C/24h.

Se agregaron 10 mL de formalina al 0.06%, se homogenizó y se colocaron 10 $\mu$ L de los sueros: 1, 2, 3,4, L, EN, I y PV en cada pozo desde A1 hasta A8 de una

placa de plástico, así como 100µL del antígeno. Se cubrió la placa con papel plástico y se incubó a 50°C/2h. Posteriormente se hace la lectura de la aglutinación.

## **7.7 VIROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI.**

### **7.7.1 Extracción de DNA**

Una vez que se aseguró la pureza de las cepas de *E. coli* se realizó la extracción del material genético.

Se colocaron aproximadamente 500 µL de amortiguador TES (Tris-EDTA-cloruro de sodio) en microtubos estériles en los cuales se resuspendió con asa estéril aproximadamente una asada del tamaño de un grano de arroz del crecimiento del microorganismo obtenido en el agar Soya Trypticaseína (TSA).

A esta mezcla se agregaron 20 µL de lisozima (10mg/ µL) y se incubaron a 37°C (Felisa termo baño) en un baño de agua por 15 minutos o bien un máximo de 60 minutos, hasta observar viscosidad. Posteriormente se agregaron 8 µL de pronasa (20mg/ µL) y 8 µL de RNAasa (10mg/ µL), la mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por 60 minutos en un baño de agua. Al término de este tiempo se agregaron 120 µL de SDS (10% p/v), se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por diez minutos en un baño de agua. Al término, la mezcla de reacción se dejó enfriar y se adicionaron 600 µL de fenol-cloroformo (Sigma cat P4557), se agitó vigorosamente (extracción) hasta formar una emulsión blanca, después se centrifugó (centrífuga HERMLE Z160M) por 10 minutos a 5000 r.p.m. y se observó

la formación de tres capas, se extrajo la primera de ellas y se colocó en un microtubo estéril, las dos capas de abajo se desecharon. A esta primera capa se le adicionó 1mL de etanol (96%) frío (J.T. Baker 9401-03), se agitó suavemente y se centrifugó a 14000 r.p.m. por 10 minutos, al término de este tiempo y con mucho cuidado se retiró el etanol y el tubo eppendorf se invirtió sosteniéndolo en una superficie y se dejó secar toda la noche, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L de agua destilada estéril, se dejó hidratar por 2 minutos y se agitó.

Los productos de la extracción se visualizaron a través de un gel de azarosa al 1.8%. Para ello, se pesaron 0.81g de agarosa (Boehringer Mannheim cat 13889991) y se agregaron 45 mL de amortiguador TBE 1X, se introdujeron al horno de microondas por 1 minuto, la mezcla se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se viertió en un acrílico, a éste se le introdujo un peine para la formación de pozos donde posteriormente se cargaron las muestras.

Una vez gelificado, se cargaron 2  $\mu$ L de muestra mezclados con 2  $\mu$ L de amortiguador TBE 1X Y 2  $\mu$ L de azul de bromofenol, el gel se colocó en una cámara de electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) y se recubrió completamente con amortiguador TBE. Posteriormente, se conectó a una fuente de poder (BIORAD) y se aplicó un voltaje de 65V por un período de 60 minutos, al término de este tiempo, el gel se reveló con bromuro de etidio (5  $\mu$ g/  $\mu$ L) y el gel se observó usando un equipo Fluor-S (BIORAD).

### 7.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (para cepas de *E. coli*)

Se llevó a cabo una técnica de PCR múltiple, para buscar la presencia de los genes de patogenicidad que corresponden a diferentes grupos de *E. coli*. Los genes buscados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Genes correspondientes a cada grupo de *E. coli*.

Grupo de <i>Escherichia coli</i>	Genes
ETEC	<i>lt, st</i>
EPEC	<i>eaeA, bfpA</i>
EIEC	<i>ial</i>
EHEC	<i>stx<sub>1</sub>, stx<sub>2</sub></i>

Para este ensayo de PCR se utilizaron las siguientes cepas como controles positivos: ETEC O78:H11, EPEC O127:H6, EHEC O157:H7 ATCC 4076 Y EIEC O24: NM y como control negativo *E. coli* K12.

Los reactivos utilizados para la PCR son los siguientes: amortiguador (Tris-HCl [10mM,pH 8.3], KCl [50mM]), MgCl<sub>2</sub> [2mM], dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) [200mM], Taq polimerasa (INVITROGEN) [0.5U/23μL], oligos o iniciadores (40) los cuales se muestran en la tabla 5, lisado bacteriano y agua desionizada estéril. La PCR se llevó a cabo usando el termociclador Gene Amp (Applied Biosystem) con las condiciones que se muestran en la figura 5. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la tabla 8 (12).

Figura 5. Ciclos de la PCR.

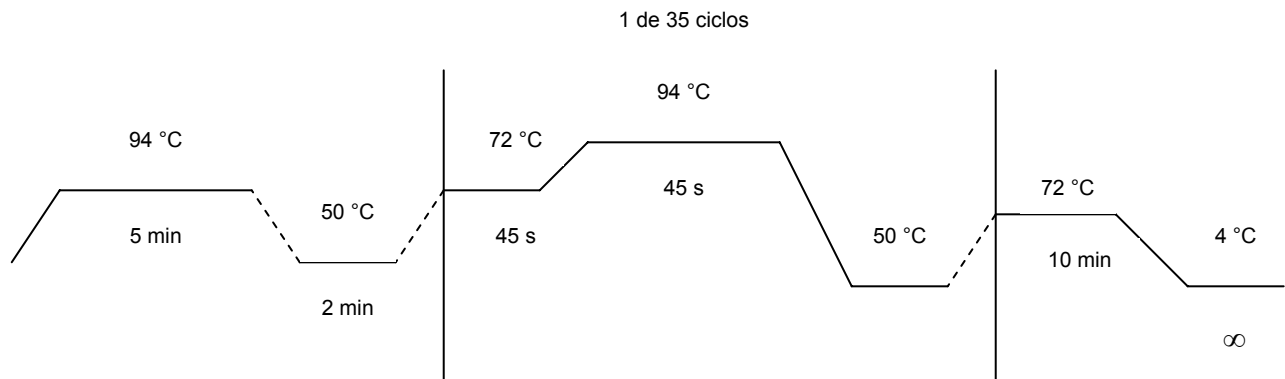


Tabla 8. Ciclos de la PCR.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 min
Alineación	50°C	2 min
Amplificación	72°C	45 seg
	94°C	45 seg
	50°C	45 seg
Extensión final	72°C	10 min
Enfriamiento	4°C	∞

} 35 ciclos

Los volúmenes y concentraciones utilizados de cada reactivo se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Reactivos para PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen
Buffer (amortiguador)	10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2mM	1.0 µL
dNTP's	200mM	2.0 µL
Oligo R	20ppm/µL	1.75 µL
Oligo F	20ppm/µL	1.75 µL
Taq polimerasa	0.5U/23µL	0.2 µL
Agua destilada estéril		13.9 µL
Lisado bacteriano (DNA)		2.0 µL

Tabla 10. Iniciadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.

Cepa de <i>Escherichia coli</i>	Gen	Iniciadores	Tamaño del amplificado (pb)	Iniciador en la mezcla de reacción (pmol)
ETEC O78:H11	<i>lt</i>	F:5'GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC3' R:5'CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT3'	450	5.0
ETEC O78:HAA	<i>st</i>	F:5'ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T3' R5'CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3'	190	6.47
EPEC O127:H6	<i>bfpA</i>	F:5'AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC3' R:5' GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3'	324	2.5
EPEC O127:H6	<i>eaeA</i>	F:5'GAC CCG GCA CAA GCA RAA GC3' R:5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA CC3'	384	3.88
EHEC O157:H7	<i>stx1</i>	F:5'CTG GAT TTA ATG TGG CAT AGT G3' R:5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3'	150	3.88
EHEC O157:H7	<i>stx2</i>	F:5'GGC ATC GTC TGA AAC TGC TCC3' R:5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT3'	255	2.5
EIEC O124:NM	<i>ial</i>	F:5'GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA3' R:3'GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC3'	650	10.25



**ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica

**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena

**EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica

**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva

**lt:** Gen que codifica para la toxina termolábil en el grupo de *Escherichia coli* enterotoxigénica

**st:** Gen que codifica para la toxina termoestable en el grupo de *Escherichia coli* enterotoxigénica

**bfpA:** Gen que codifica para los pilis formadores de haces en el grupo de *Escherichia coli* enteropatógena

**eaeA:** Gen que codifica para la intimina en los grupos de *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica

**stx1:** Gen que codifica para la toxina semejante a la Shiga tipo I en el grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágica

**stx2:** Gen que codifica para la toxina semejante a la Shiga tipo II en el grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágica

**ial:** Gen que codifica para una invasina en el grupo de *Escherichia coli* enteroinvasiva (40).

## **7.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.**

Se utilizaron las cepas correspondientes a *E. coli*, *Salmonella* y *Enterobacter cloacae*.

### **7.8.1 Preparación del Inóculo.**

Se verificó la pureza de cada cepa, sembrándolas por aislamiento en Agar Gelosa Sangre (Oxoid) se incubó a 37°C por 24 h, posteriormente se sembró por aislamiento en Agar MacConkey (Oxoid) y se incubó a 37°C por 24 h y de ahí se sembró por estría abierta en Agar TSA (Agar Soya Trypticaseína (Oxoid)) y se incubó a 37°C por 24 h.

En solución salina al 0.85% se ajustó al 0.5 de MacFarland (nefelometro) con las cepas incubadas previamente.

### **7.8.2 Ensayo con placas de poliestireno**

Se colocó 1 mL de medio MEM con 0.45 de glucosa (Gibco) en cada pozo de una placa de poliestireno (Costar® Cell Culture Cluster). En cada pozo se colocaron 100 µL de la suspensión bacteriana, se realizaron 3 pozos por cepa, dejando un pozo con el medio sin inóculo como blanco. Se incubó a 37°C por 48h.

Posteriormente se retiró el medio de cada pozo y se lavó con agua destilada estéril 3 veces. Se tiñó con cristal violeta cada pozo y se lavó con agua destilada

estéril 3 veces más. El cristal violeta se extrajo con 1 mL de alcohol etílico al 96% dejándolo actuar por 3 minutos y lavándolo 3 veces antes de medir la absorbancia. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio 20) con un blanco de alcohol etílico al 96%.

### **7.8.3 Determinación de la Capacidad de Formación de Biopelículas.**

Para determinar la capacidad de adherencia, se utilizó la lectura de absorbancia de las muestras. Los intervalos se determinaron de acuerdo con este valor. Si el valor obtenido por una muestra es igual o menor al valor obtenido del control se determina que no hay adherencia, si el valor obtenido de una muestra es el doble del blanco una unidad por arriba del blanco se marca con una cruz y se considera que es formadora de biopelícula.

Si el valor de la muestra se encuentra entre el cuádruple del valor y el doble del valor más una unidad se marca con dos cruces, si el valor de la muestra es mayor del cuádruple del valor del control más una unidad se considera formadora de biopelícula pesada.

Tabla 11. Fórmulas para calcular la formación de biopelículas

<b>Valor de lectura</b>	<b>Formación de biopelícula</b>	<b>Marca</b>
$OD \leq OD_c$	No formadora	[ 0 ]
$OD_c < OD \leq 2 OD_c$	Ligera	[ + ]
$2 OD_c < OD \leq 4 OD_c$	Media	[ + + ]
$4 OD_c < OD$	Pesada	[ + + + ]

OD: Densidad óptica de la muestra.

OD<sub>c</sub>: Densidad óptica del blanco.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PROVENIENTES DE TEPIC, NAYARIT.

Se recibieron de la compañía empaedora aislados que correspondían de manera presuntiva a colonias típicas para *Salmonella* o para *Escherichia coli*, las cuales fueron sembradas para su conservación en tubos con agar tripticaseína de soya [TSA].

De los 50 aislados que se recibieron, se recuperaron 47 después de sembrar en agar gelosa sangre. Del crecimiento dado en gelosa-sangre se resembraron colonias aisladas en placas con agar McConkey. Se incubaron por 24 horas a 37°C. De las colonias que crecieron en las placas con agar McConkey se resembraron algunas de ellas para hacer la siembra en placas con TSA pudiendo recuperar después de 24 horas de estar incubadas a 37°C, 46 de las 47 colonias recuperadas inicialmente. Por lo tanto, se trabajó con 46 cepas en este estudio.

Estas cepas fueron acondicionadas [como se menciona en el apartado de materiales y métodos] para que fueran identificadas por el equipo automatizado Vitek, el cual consiste en la aplicación de pruebas bioquímicas de manera simultánea para lograr la identificación de los microorganismos en estudio.

Los resultados arrojados por el equipo Vitek se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados obtenidos después de la lectura de pruebas bioquímicas hecha por el equipo automatizado Vitek, sitios de aislamiento y resultado de la prueba de la oxidasa.

No. de cepa	Microorganismo Identificado	Sitio de Aislamiento	Oxidasa
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	AHE	(-)
2	<i>Citrobacter freundii complex</i>	AHE	(-)
3	<i>Escherichia coli</i>	AHT	(-)
4	<i>Escherichia coli</i>	AHT	(-)
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	AP	(-)
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DLS	(-)
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	ZT	(-)
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SDL	(-)
9	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ZT	(+)
10	<b>NO IDENTIFICADO</b>	DL	(-)
11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DH	(+)
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	AHE	(-)
13	<i>Enterobacter cloacae</i>	AP	(-)
14	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DH	(+)
15	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DH	(+)
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AHT	(-)
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ZT	(-)
18	<i>Citrobacter freundii complex</i>	MR	(-)
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	ZT	(-)
20	<i>Enterobacter cloacae</i>	DH	(-)
21	<i>Enterobacter cloacae</i>	DL	(-)
22	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ME	(-)
23	<i>Enterobacter cloacae</i>	ME	(-)
24	<i>Salmonella especies</i>	MR	(-)
25	<i>Enterobacter cloacae</i>	ZT	(-)
26	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DL	(-)
27	<b>NO IDENTIFICADO</b>	DH	(-)
28	<i>Enterobacter cloacae</i>	MR	(-)
29	<i>Citrobacter freundii complex</i>	MR	(-)
30	<b>NO IDENTIFICADO</b>	MR	(-)
31	<i>Enterobacter hormaechei</i>	MR	(-)
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ME	(-)
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DL	(-)
34	<i>Enterobacter cloacae</i>	DH	(-)
35	<i>Enterobacter cloacae</i>	ZT	(-)
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DL	(-)
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DL	(-)
38	<b>NO IDENTIFICADO</b>	ME	(-)
39	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ME	(-)
40	<i>Citrobacter freundii complex</i>	ME	(-)
41	<b>NO IDENTIFICADO</b>	ZT	(+)
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ZT	(-)
43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DL	(+)
44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EMR 2	(+)
45	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i>	DH	(-)
46	<b>NO IDENTIFICADO</b>	DL	(+)

Tabla 13. Claves de los sitios de aislamiento

<b>IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS ( Mango Ataulfo y agua)</b>	
<b>MR</b>	<b>Mango de Recepción</b>
<b>DL</b>	Mango <b>Después de Lavado</b>
<b>DH</b>	Mango <b>Después</b> del tratamiento <b>Hidrotérmico e Hidroenfriado</b>
<b>ZT</b>	Mango en <b>Zona de Tolvas</b>
<b>ME</b>	<b>Mango Empacado</b>
<b>AP</b>	<b>Agua de Pozo</b>
<b>AR</b>	<b>Agua de Remojo</b>
<b>ADL</b>	<b>Agua Después de Lavado</b>
<b>AHE</b>	<b>Agua Hidroenfriado</b>
<b>AHT</b>	<b>Agua Hidrotérmico</b>

Del total de cepas, seis [13%] no pudieron ser identificadas, por lo que únicamente se contó con 40 que si fueron identificadas, lo que representa el 87%.

Para fines prácticos, estas 40 cepas identificadas ahora representan el 100% de cepas. En la tabla 3, se presentan los porcentajes correspondientes a la cantidad de veces en que aparece un microorganismo en la tabla 12, tomando 40 como el 100%.



Tabla 14. Número y Porcentaje de microorganismos identificados por el equipo automatizado Vitek.

<b>Microorganismo identificado</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	13	32.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	22.5
<i>Citrobacter freundii complex</i>	4	10.0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4	10.0
<i>Escherichia coli</i>	2	5.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	5.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	5.0
<i>Salmonella especies</i>	1	2.5
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	2.5
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1	2.5
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i>	1	2.5

Para confirmar que se trataba de enterobacterias (oxidasa negativa) se realizó la prueba de la oxidasa para cada una de las cepas. Cuarenta de las cepas resultaron negativas a esta prueba mientras que seis de ellas fueron positivas. Este resultado se muestra también en la tabla 12.

En la tabla 15 se muestran los organismos presentes en cada uno de los sitios de muestreo.

Tabla 15. Sitios de muestreo y número de microorganismos aislados

<b>Sitio De Muestreo</b>	<b>Microorganismo identificado</b>	<b>No. de aislados</b>
Mango de Recepción	<i>Citrobacter freundii cpx</i>	2
	<i>Salmonella spp</i>	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Enterobacter hormachei</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Agua de Pozo	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
Mango después de Lavado	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Agua de Remojo	No se identificaron	
Agua después de Lavado	No se identificaron	
Mango después tratamiento Hidrotérmico e Hidroenfriado	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
	<i>Acinetobacter calcoaceticus baumannii cpx</i>	1
Agua Hidrotérmico	<i>Escherichia coli</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
Agua Hidroenfriado	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
	<i>Citrobacter freundii cpx</i>	1
Mango Zona de Tolvas	<i>Enterobacter cloacae</i>	4
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
Mango Empacado	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Citrobacter freundii cpx</i>	1

### **8.1.1 Importancia de las bacterias encontradas en la superficie del mango.**

#### **8.1.1.1 Género *Enterobacter***

*Enterobacter cloacae* ocupó el primer lugar de cepas presentes en el proceso con un 32.5% predominando en la zona de tolvas con 4 cepas detectadas. También fue detectado en el mango de recepción (1 cepa), en el agua de pozo (2 cepas), en el mango después de lavado (1 cepa), por lo que probablemente la contaminación se da desde de la huerta. Posiblemente dentro del proceso hay otra fuente de contaminación ya que esta bacteria vuelve a aparecer en el mango después de los tratamientos hidrotérmico e hidrogenfriado (2 cepas), en el agua de hidrogenfriado (1 cepa) y en el mango empacado (1 cepa).

*Enterobacter cloacae* es un microorganismo patógeno oportunista, se encuentra ampliamente distribuida en el agua, los afluentes cloacales, la tierra y los vegetales. Es parte de la biota comensal entérica y se cree que no causa diarrea. En pacientes con baja resistencia a infecciones como son infecciones crónicas, cáncer o diabetes *Enterobacter cloacae* es considerado como patógeno (51). La presencia de esta enterobacteria es relevante sobre todo en productos cárnicos, debido a la producción de histaminas (72). Sin embargo se le considera un patógeno potencial transmitido por una variedad de alimentos. Se le ha detectado en lechuga y carne (68), en alimentos preparados (39), en pescado y leche(52). Su presencia en alimentos es indicadora de malas prácticas de higiene en la elaboración de los mismos (63).

*Enterobacter aerogenes* también es un patógeno oportunista. Esta asociado con infecciones nosocomiales, incluyendo infecciones en el tracto urinario y

bacteremia <sup>(41)</sup>. Su presencia en este trabajo fue de 5% en el mango empacado por ello, es probable que la contaminación ocurra también por las manos de los trabajadores, ya que en el proceso anterior al empacado del mango no se detectó.

#### **8.1.1.2 Género *Klebsiella***

*Klebsiella pneumoniae* tuvo una presencia de 22.5% con un número mayor de cepas con 5 cepas detectadas en el mango después de lavado lo cual nos indica que la posible fuente de contaminación es el agua con la que se lava el mango. Después de este punto no se detecta hasta el agua de tratamiento de hidrotérmico (1 cepa), la zona de tolvas (2 cepas) y en el mango empacado con 1 cepa. *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria que causa gastroenteritis con rápida disfunción de los órganos gastrointestinales. Se ha detectado en diversos alimentos de origen animal y vegetal, en hamburguesas <sup>(61)</sup>, en jugos de frutas <sup>(22)</sup>, en leche cruda, pasteurizada y acidificada (Gran y cols. 2003), además en lechuga y carne<sup>(68)</sup>. Su presencia en alimentos es considerada como indicativo de malas prácticas higiénicas <sup>(63)</sup>.

#### **8.1.1.3 Género *Citrobacter***

*Citrobacter* es considerado un patógeno potencial en alimentos, puede causar enfermedades si es consumido en alimentos contaminados. *Citrobacter freundii* ha sido aislado de productos cárnicos <sup>(36)</sup>, de leche pasteurizada y pescado <sup>(37)</sup>. *Citrobacter freundii* fue detectado en un 10% en: mango de recepción (2 cepas), agua del tratamiento de hidrofriado (1 cepa) y en el mango empacado (1 cepa).

Lo anterior muestra que la contaminación con este microorganismo está en el mango desde la huerta, posteriormente no se detecta hasta llegar al agua de tratamiento de hidrogenfriado por lo que presumiblemente el agua es la fuente de contaminación y su presencia en el mango empacado habla de que las manos de los trabajadores podría ser la otra fuente de contaminación.

#### **8.1.1.4 Género *Pseudomonas***

Las propiedades de algunas especies de *Pseudomonas* que las hacen importantes en los alimentos son: su capacidad para producir diversas sustancias que influyen desfavorablemente en el sabor, la actividad proteolítica o lipolítica de algunas especies, su tendencia aerobia les permite un crecimiento rápido y generar productos de oxidación y mucosidad en superficies de alimentos, entre otras (20).

*Pseudomonas aeruginosa* es considerada como un microorganismo con alto nivel de virulencia y de importancia clínica también alta (26).

*Pseudomonas stutzeri* se detectó en el mango después de los tratamientos hidrotérmico e hidrogenfriado (3 cepas) y en la zona de tolvas (1 cepa) mientras que *Pseudomonas aeruginosa* en el mango de recepción (1 cepa) y en el mango después de lavado (1 cepa).

#### **8.1.1.5 *Escherichia coli***

Esta especie, que incluye cepas patógenas fue detectada en el agua del tratamiento hidrotérmico (2 cepas). El hecho de haber sido localizado en este

punto nos indica como probable fuente contaminación el agua para este tratamiento. La presencia de *E. coli* ya no fue detectada en ningún otro sitio del proceso.

#### **8.1.1.6 *Salmonella***

Únicamente se detectó una cepa de *Salmonella* en el mango de recepción, por lo tanto, esto sugiere que el mango ya estaba contaminado desde la precosecha. No fue detectado en ninguna otra parte del proceso.

#### **8.1.1.7 Contaminación en mango y otros productos frescos**

En relación a la presencia de microorganismos detectados en mango, no se encuentran reportes en números elevados, sin embargo, en un trabajo realizado por Branquinho y colaboradores (6), en el cual utilizaron mangos de la variedad Tommy Atkins fue detectada la presencia de *Salmonella* en la superficie, la cual además, presenta penetración de la cáscara a la carne del mango, esto sucede después del tratamiento hidrotérmico por el que pasan los mangos.

Ellos plantean que la presencia de *Salmonella* en productos frescos es indicadora de que la cosecha, el proceso y/o la distribución bajo condiciones inadecuadas de higiene, son factores que contribuyen a la presencia de microorganismos contaminantes.

También hacen referencia de que estudios previos han demostrado que *Salmonella* es capaz de crecer en melón, jitomate y fresas, además de la sobrevivencia de cepas de *E. coli* O157:H7 en manzanas.

En relación a reportes de contaminación de otros productos frescos se puede mencionar lo siguiente: un estudio llevado a cabo en el Estado de Puebla, México, específicamente en las regiones de Atlixco y Huaquechula caracterizados por el cultivo de maíz, frijol, trigo, cebada, cacahuate, lechuga y cebolla entre otros, reveló utilizando como producto indicador la lechuga, la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal como son: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* y *Citrobacter* además, de la detección de cepas de *Shigella sp.* (60).

En otro estudio llevado a cabo en el Estado de Sinaloa, México, se realizó un muestreo en los principales centros comerciales de las ciudades de Guasave y Los Mochis, Sinaloa; analizando 80 frutas y hortalizas de consumo en fresco utilizando la técnica de PCR simple.

Los resultados arrojaron la presencia de *Shigella* en cilantro y rábano (57).

Castro-Rosas y colaboradores (8) reportaron la presencia de de cepas de *Escherichia coli* y de *Salmonella* en muestras de jugo de betabel colectadas en la ciudad de Pachuca en el Estado de Hidalgo, México. Dicho muestreo fue realizado en mercados públicos y puestos ambulantes. A pesar de que dichos microorganismos estuvieron presentes en índices bajos, su presencia sugiere una bebida de riesgo para la población.

En otro estudio realizado por Castro-Rosas y colaboradores también en el Estado de Hidalgo, fueron muestreadas 130 ensaladas de verduras crudas listas para su consumo recolectadas en restaurantes de diversos niveles de higiene, detectando

la presencia de cepas de *Escherichia coli* que pertenecen a los grupos patógenos de ETEC, STEC y EIEC (7).

## 8.2 SEROTIPIFICACIÓN

Dentro de la población de microorganismos aislados se identificaron las cepas número 3 y 4 como *Escherichia coli* y la cepa 24 como *Salmonella*.

Para determinar si las cepas de *Escherichia coli* pertenecen a alguno de los grupos patógenos reportados [EHEC, ETEC, EIEC, EPEC] se llevó a cabo una tipificación serológica. La cepa de *Salmonella* también se tipificó serológicamente ya que, aunque todas las cepas de *Salmonella* son potencialmente patógenas era importante conocer su serotipo ya que éste puede dar información sobre la fuente de contaminación. En la tabla 16, se muestran las cepas a las cuales se les realizó la tipificación serológica.

Tabla 16. Claves de serología

<b>Microorganismo Identificado</b>	<b>Clave de Serología (FMU)</b>	<b>Número de cepa</b>
<i>Escherichia coli</i>	3A - 3 - 1 / 111817	3
<i>Escherichia coli</i>	4A - 4 - 1 / 111818	4
<i>Salmonella especies</i>	23A - 24 1 / 111819	24

FMU = Facultad de Medicina UNAM



### 8.2.1 Serotipificación de *E. coli*

Los resultados obtenidos después de realizar la serotipificación para *Escherichia coli* se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Serotipificación para *Escherichia coli*.

Cepa	Antígeno	Suero	Título	Título Homólogo	Serotipo
3	O	139	1:200	1:3200	O139:H26
3	H	26	1:400	1:1600	
4	O	139	1:100	1:3200	O139:H26
4	H	26	1:400	1:1600	

Por lo tanto, el serotipo para ambas cepas de *Escherichia coli* es:

*Escherichia coli* O139:H26, que es reportada como patógena perteneciente al grupo de *E. coli* enterotoxigénica [ETEC] <sup>(59)</sup>.

### 8.2.2 Serotipificación de *Salmonella*

Los resultados obtenidos por serotipificación para *Salmonella* se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Serotipificación para *Salmonella*.

Cepa	Antígeno	Suero	Serotipo
24	O	11	O11:H4H <sub>23</sub>
24	H	Z <sub>4</sub> Z <sub>23</sub>	

La cepa de *Salmonella* no presentó aglutinación con los sueros más comunes y más usados: Polivalente, que contiene los grupos A, B, D, E1, E2, E3, E4 y L, el suero C y los serogrupos 56, 57, 58, 60 y 61. Fue entonces necesario usar los sueros C, F, G, H, poli A y poli B; obteniendo un resultado positivo con el F, cuyo serogrupo es el O11.

Respecto al antígeno flagelar de *Salmonella*, también fue necesaria la aplicación de más de un ensayo, ya que resultaba difícil encontrar los sueros con que se daba la aglutinación, debido a que la cepa esta no presentaba la fase II de crecimiento. Para esta determinación se utilizaron los sueros: Z, Z<sub>4</sub>, Z<sub>4</sub>Z<sub>24</sub>, Z<sub>10</sub>, Z<sub>13</sub>, Z<sub>23</sub>, Z<sub>28</sub>, Z<sub>29</sub>, Z<sub>32</sub>, Z<sub>36</sub>, Z<sub>41</sub>, Z<sub>24</sub> y poli C, obteniendo resultados positivos para los sueros Z<sub>4</sub>Z<sub>23</sub>.

Varios antígenos flagelares se expresan en diferentes fases, algunos serotipos son difásicos (expresan dos antígenos flagelares) y algunos otros (en menor proporción) son monofásicos (expresan un antígeno flagelar). Según datos reportados <sup>(67)</sup> el antígeno flagelar encontrado en fase 1 (Z<sub>4</sub>Z<sub>23</sub>), como el identificado en este trabajo, corresponde a la serovariedad Parera por lo tanto, el serotipo para la *Salmonella* identificada es: *Salmonella* O11: H Z<sub>4</sub>Z<sub>23</sub>, que está reportada como *Salmonella* Parera IV <sup>(30)</sup>.

## 8.3 VIROTIPIFICACIÓN

### 8.3.1 Detección de Genes de Virulencia de las Cepas Aisladas de *Escherichia coli*, mediante PCR Múltiple.

Es necesario realizar la detección de genes de virulencia en las cepas de *Escherichia coli* ya que la determinación serológica del antígeno somático (O), no es suficiente para identificar a una cepa como diarreica, porque en muchos casos no existe una correlación con la presencia de los factores de virulencia (71).

Al llevar a cabo los ensayos de PCR para buscar los genes asociados a la patogenicidad, no únicamente los hicimos con los genes LT y ST, que corresponden al grupo enterotoxigénico también, se buscaron otros genes (*eaeA*, *stx1*, *stx2*, *bfpA*, *ial*) que corresponden a los otros grupos de *E. coli*.

Después de realizado el PCR múltiple, las bandas que se encontraron tanto en la mezcla de los siete genes buscados, como en los ensayos realizados con ellos de manera individual resultaron ser inespecíficas, es decir, las bandas encontradas no corresponden al peso molecular de ninguno de los genes, como se puede observar en la figura 6. Esto se pudo establecer al comparar las bandas obtenidas de cada muestra contra las bandas correspondientes a los controles positivos.

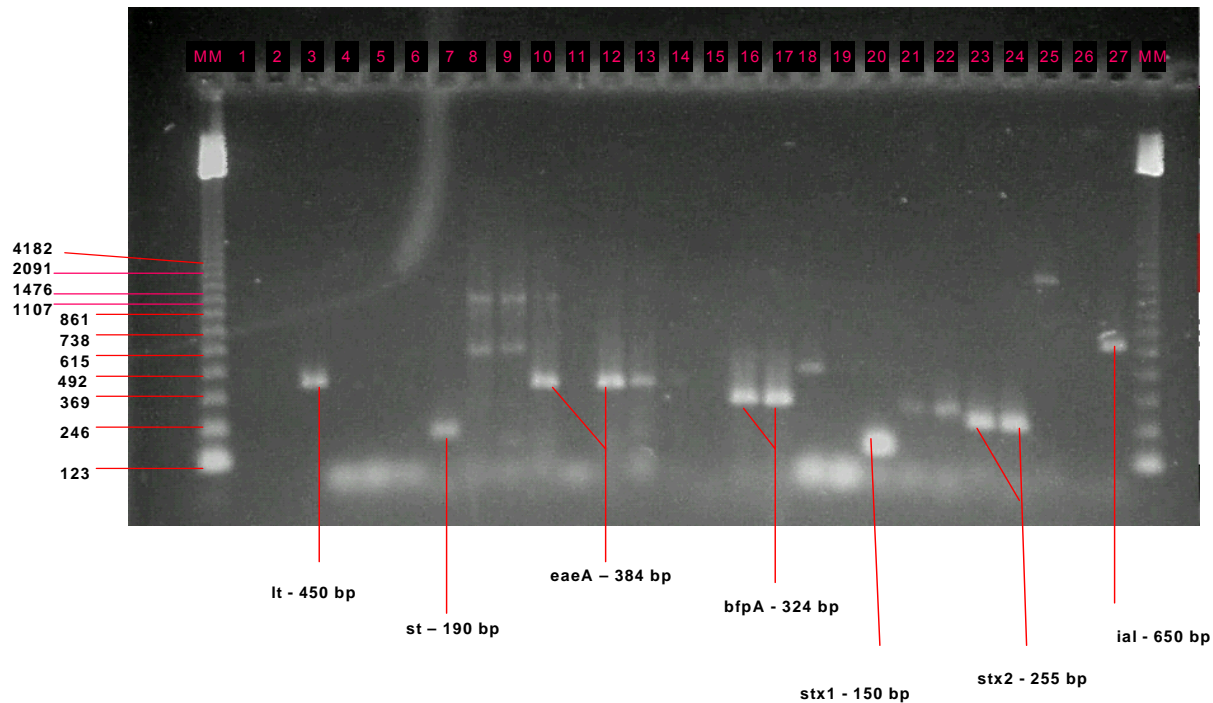


Figura 6. PCR múltiple de *E. coli*. Se utilizó un marcador molecular de 123 pares de bases el cual se localiza en los carriles marcados con MM, la cepa número 3 de *E. coli* se encuentra en los carriles 1, 4, 8, 13, 18, 21 y 25. La cepa número 4 de *E. coli* se localiza en los carriles 2, 5, 14, 19, 22 y 26. El control positivo para el *It* (ETEC) está en el carril 3. En los carriles 6 y 7 están los controles positivos para *st* (EPEC). Los controles positivos para *eaeA* (EPEC) están en 10, 11 y 12. En los carriles 15, 16 y 17 están los controles positivos para *bfpA* (EPEC). El control positivo para *stx*<sub>1</sub> (EHEC) se ubica en el carril 20. En los carriles 23 y 24 encontramos los controles positivos para *stx*<sub>2</sub> (EHEC). Por último en el carril 27 se localiza el control positivo para *ial* (EIEC).

De acuerdo con la figura 2 vemos que ninguna de las dos cepas de *E. coli* amplificó para los genes de patogenicidad. Las bandas que se observan en los carriles donde están las muestras de *E. coli* son inespecíficas en relación con las bandas que amplifican para cada uno de los genes.

Lo anterior se corrobora con los pesos obtenidos de las bandas que aparecen en los carriles en donde se encuentran las muestras de *E. coli* los cuales se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Pesos de bandas en PCR múltiple de *E. coli*

No. de carril	Peso de la(s) banda(s)
4	451
8	241.3
13	451
14	451
18	374.9
19	519.3
21	189.2
22	329.6
25	270.6
26	2688.4

Con lo anterior se puede establecer que aunque el serogrupo de las cepas de *E. coli* indique que éstas pertenecen al grupo de ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigénica), su patogenicidad se encuentra en un status de potencial, ya que aunque no se detectaron los genes correspondientes a cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* no se puede asegurar que estas cepas no sean patógenas o no representen un peligro a la salud <sup>(54)</sup>.

#### **8.4 PERFILES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.**

Los resultados de sensibilidad a antibióticos de las cepas identificadas se muestran en la tabla 20.







Tabla 20. Continuación

# de cepa	36	37	39	40	42	43
microorganismo	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>Citrobacter freundii cpx</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
antibiótico						
Amikacin	S	S	S	S	S	S
Amoxicillin/CA	R	R	R	R	S	R
Cefazolin	R	I	R	R	S	R
Cefepime	S	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxone	S	S	S	S	S	I
Cefuroxime-sodium	S	S	I	S	S	R
Cefuroxime-axetil	S	S	I	S	S	R
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoin	S	S	I	S	S	R
Norfloxacin	S	S	S	S	S	S
Ofloxacin	S	S	S	S	S	S
Piperacillin	S	S	S	S	S	S
Ticarcillin/CA	S	S	S	S	S	S
Trimeth-sulfa	S	S	S	S	S	R

Tabla 20. Continuación

# de cepa	44	45
microorganismo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter calcoacéticus-baumannii cpx</i>
antibiótico		
Amikacin	S	S
Amoxicillin/CA	R	S
Cefazolin	R	R
Cefepime	S	S
Ceftazidime	S	S
Ceftriaxone	I	S
Cefuroxime-sodium	R	R
Cefuroxime-axetil	R	R
Ciprofloxacin	S	S
Gentamicin	S	S
Meropenem	S	S
Nitrofurantoin	R	R
Norfloxacin	S	
Ofloxacin	S	S
Piperacillin	S	S
Ticarcillin/CA	S	S
Trimeth-sulfa	R	S

Tabla 20. Continuación

# de cepa	3	4	24
microorganismo	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella especies</i>
antibiótico			
Amikacin	S	S	S
Amoxicillin/CA	S	S	S
Cefazolin	S	S	S
Cefepime	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S
Ceftriaxone	S	S	S
Cefuroxime-sodium	S	S	S
Cefuroxime-axetil	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S
Gentamicin	S	S	S
Meropenem	S	S	S
Nitrofurantoin	S	S	S
Norfloxacin	S	S	S
Ofloxacin	S	S	S
Piperacillin	S	S	S
Ticarcillin/CA	S	S	S
Trimeth-sulfa	S	S	S



Tabla 20. Continuación

# de cepa	23	25	28	34	35
microorganismo	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
antibiótico					
Amikacin	S	S	S	S	S
Amoxicillin/CA	R	R	R	R	R
Cefazolin	R	R	R	R	R
Cefepime	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S
Ceftriaxone	S	S	S	S	S
Cefuroxime-sodium	S	S	S	S	S
Cefuroxime-axetil	S	S	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	S	S
Nitrofurantoin	S	S	S	S	S
Norfloxacin	S	S	S	S	S
Ofloxacin	S	S	S	S	S
Piperacillin	S	S	S	S	S
Ticarcillin/CA	S	S	S	S	S
Trimeth-sulfa	S	S	S	S	S

Tabla 21. Resistencia a antibióticos con el método de Sensidiscos para las cepas de *Enterobacter cloacae*.

No. Cepa	1	5	7	12	13	19	20	21	23	25	28	34	35
Antibiótico													
<b>AMP</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>AMC</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>KF</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>CN</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>TE</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>S3</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<b>W</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>C</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<b>PRL</b>	I	I	I	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S

Claves:

R: RESISTENTE

I: INTERMEDIO

S: SENSIBLE

AMP: ampicilina

AMC: amoxicilina

KF: cefazolin

CN: gentamicina

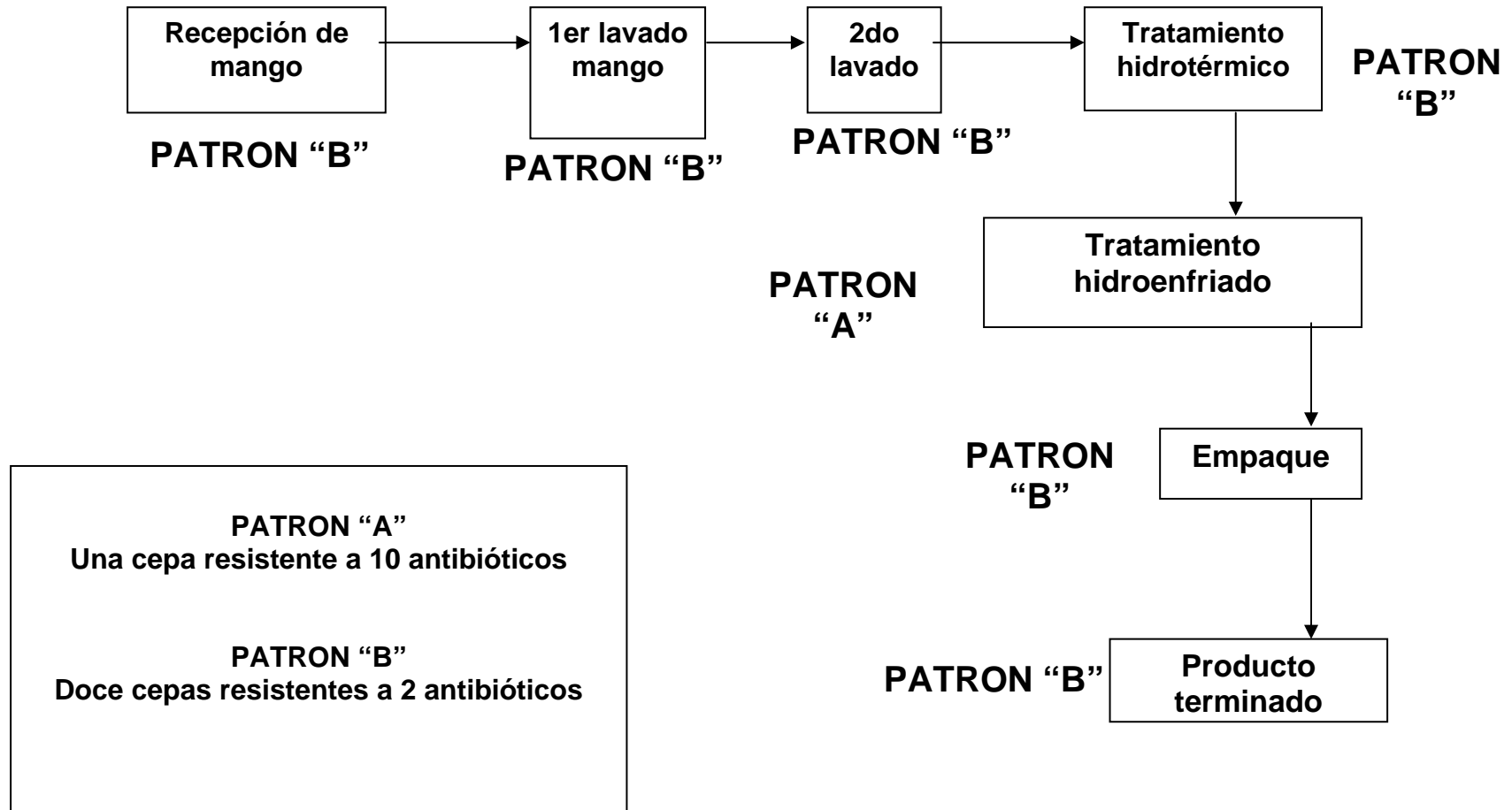
TE: tetraciclina

S3: sulfametoxazol

W: trimetoprim

C: cloranfenicol

PRL: piperacilina

Figura 7. Presencia de *E. cloacae* a lo largo del proceso y sus patrones de resistencia a antibióticos

De las pruebas de sensibilidad a antibióticos vemos lo siguiente: del total de cepas (40) el 25% de ellas (10 cepas) son sensibles a todos los antibióticos aplicados. De estas cepas sensibles a todos los antibióticos el 60 % corresponde a las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 20% es *Escherichia coli*, 10 % es representado por *Salmonella* y *Citrobacter freundii cpx* también representa un 10%. El 75% de las cepas son resistentes al menos a uno de los antibióticos empleados.

Las cepas que fueron resistentes a dos antibióticos representan un 55%, teniendo mayor frecuencia *Enterobacter cloacae*. El 5% de las cepas es resistente únicamente a un antibiótico. El 2.5% de las cepas son resistentes a tres antibióticos y el 10% de las cepas es resistente a más de tres antibióticos.

Cefazolina es el antibiótico al que más cepas (24) presentan resistencia (60%), seguido de Amoxicilina con resistencia de 22 cepas (55%). En tercer sitio aparece Cefuroxime sodico y Axetil Cefuroxime con 8 cepas (20%) cada uno. El siguiente antibiótico es Nitrofurantoina con 5 cepas (12.5%) con resistencia a él y por último esta Trimetil sulfa con 2 cepas resistentes a él. Lo que representa un 5%.

Al observar el patrón de sensibilidad a antibióticos que presenta *E. cloacae*, que es el microorganismo que se aisló prácticamente durante toda la estancia del mango dentro de la planta empacadora, tenemos que con los resultados obtenidos con el equipo Vitek hay dos patrones:

El patrón A en donde hay resistencia sólo de una cepa (cepa no. 1) a diez antibióticos mientras que el patrón B, nos muestra que todas las cepas de *E. cloacae* son resistentes a dos de los antibióticos (Amoxicilina y Cefazolina).



En cuanto a la prueba de Sensidiscos, el patrón de resistencia B es decir, resistencia a Amoxicilina y Cefazolina se repite para todas las cepas de *E. cloacae* además, también muestra la resistencia que tienen dichas cepas ante Ampicilina.

Los valores de sensibilidad determinados permiten fundamentar la discusión siguiente: la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (amoxicilina) responde a que las bacterias han desarrollado alguno de los mecanismos de resistencia frente a los efectos inhibitorios en las etapas de la síntesis de petidoglucano de la pared bacteriana (9). El nivel de acción de los  $\beta$ -lactámicos ocurre sobre la actividad transpeptidasa de las proteínas fijadoras de la penicilinasasa PBP, que redundan en la síntesis de la pared bacteriana.

En la tabla 22 se muestra el espectro antimicrobiano reportado en la literatura para algunos de los antibióticos usados en este trabajo.

Antibiótico	Espectro antimicrobiano reportado en la literatura
β-lactámicos Ampicilina	<b>Activo frente a :</b> <i>E. coli, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Serratia sp, Citrobacter sp, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Salmonella sp, Shigella sp, Ps. aeruginosa, Acinetobacter sp.</i>
Cefazolina	<b>Activo frente a:</b> <i>Neisseria sp, E. coli, Klebsiella sp. P. mirabilis, Salmonella sp. Shigella sp. Clostridium sp.</i>
Cefepime	<b>Activo frente a:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa, Enterobacterias sp</i>
Ceftazidime	<b>Activo frente a:</b> <i>P. aeruginosa., Acinetobacter sp., Serratia sp.</i>
Amikacina	<b>Activo frente a:</b> <i>Cepas de S. aureus resistentes a la Gentamicina</i>
Gentamicina	<b>Activo frente a:</b> <i>E. coli, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Serratia sp, Proteus sp, Salmonella sp, Shigella sp, P. aeruginosa y P. no aeruginosa, Acinetobacter sp.</i>

Tabla 22. Espectros antimicrobianos reportados en la literatura para la serie de antibióticos usados en este trabajo.

Por su parte, la resistencia a antibióticos es un problema creciente en muchos patógenos bacterianos, y esta resistencia puede ser inducida por mecanismos que involucran la disminución de la acumulación intracelular de antibióticos, su destrucción o modificación física y la alteración de la enzima o sitio blanco<sup>(26)</sup> (58).

Para el caso de *Enterobacter cloacae*, resulta de alta importancia conocer su perfil de resistencia a antibióticos debido a que este microorganismo forma parte de los microorganismos coliformes. Su presencia en las muestras sugiere la posible presencia de microorganismos patógenos y además, dicho microorganismo es un

patógeno oportunista, por lo que dependiendo de las condiciones inmunológicas de la persona que consume alimentos (mango para este caso) contaminados con enterobacterias, éste podría actuar y generar problemas de salud.

## 8.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

Se evaluó la capacidad de formar biopelículas de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* así como también a las cepas de *Enterobacter cloacae*, ya que es una característica importante para establecer procedimientos necesarios para asegurar la inocuidad del mango. Los resultados de dicha evaluación se muestran en las tablas 23 y 24.

Tabla 23. Capacidad de las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* para formar biopelículas.

Cepa No.	Lecturas de Densidad Óptica						Promedio [DO]	Resultado
	1	2	3	4	5	6		
3	0.124	0.091	0.078	0.169	0.074	0.086	0.1036	[ 0 ]
4	0.064	0.060	0.058	0.080	0.075	0.078	0.0691	[ 0 ]
24	0.067	0.083	0.073	0.096	0.091	0.075	0.0808	[ 0 ]
C1	0.526	0.476	0.558	0.352	0.286	0.268	0.4110	[ + + ]
C2	0.584	0.558	0.513	0.395	0.247	0.246	0.4238	[ + + ]
Blanco [ODc]	0.165	0.120	0.132	0.128	0.111	0.102	0.1263	[ ]

Tabla 24. Capacidad de *Enterobacter cloacae* para formar biopelículas

Cepa No.	Lecturas de Densidad Óptica						Promedio [DO]	Resultado
	1	2	3	4	5	6		
1	0.179	0.121	<del>0.087</del>	<del>0.236</del>	0.107	0.108	0.1212	[ + ]
5	0.178	<del>0.084</del>	0.109	0.150	0.138	0.144	0.1438	[ + ]
7	0.12	0.106	<del>0.095</del>	<del>0.220</del>	0.178	0.149	0.1385	[ + ]
12	0.106	0.078	0.097	0.121	0.093	0.106	0.1001	[ 0 ]
13	0.134	0.125	0.123	0.175	0.186	0.176	0.1531	[ + ]
19	0.078	0.092	0.103	0.106	0.095	0.134	0.1013	[ 0 ]
20	0.332	0.259	0.268	0.352	0.319	0.331	0.3101	[ + + ]
21	0.087	0.096	0.083	0.131	0.129	0.136	0.1103	[ 0 ]
23	0.061	0.063	0.055	<del>0.109</del>	0.097	0.083	0.0718	[ 0 ]
25	0.117	0.105	0.102	0.112	0.115	0.109	0.1100	[ 0 ]
28	<del>0.089</del>	0.138	<del>0.190</del>	0.090	0.101	0.125	0.1385	[ + ]
34	0.070	0.063	0.070	<del>0.137</del>	0.075	0.078	0.0712	[ 0 ]
35	<del>0.085</del>	<del>0.066</del>	0.102	0.144	0.138	0.172	0.1390	[ + ]
C1	0.352	0.286	0.268	0.323	0.386	0.308	0.3205	[ + + ]
C2	0.395	0.247	0.246	0.293	0.522	0.409	0.3520	[ + + ]

Blanco [ODc]	0.128	0.111	0.102	0.147	0.115	-----	0.1206	[ ]
-----------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	-----

**nota:** Algunos valores no fueron considerados para obtener los promedios requeridos para establecer la capacidad de formar biopelículas de las cepas utilizadas debido a que, esos valores o eran demasiado bajos o altos con respecto a los valores de Densidad Óptica de las otras lecturas, por lo tanto, para evitar errores de medición y/o falsos positivos, estos valores fueron tachados.

De las tablas anteriores podemos interpretar lo siguiente:

Ninguna de las cepas de *Escherichia coli* así como de *Salmonella* resultaron positivas a la formación de biopelículas, es decir, éstas resultaron con adherencia nula. Las cepas de *Enterobacter cloacae* que resultaron ser no formadoras de biopelículas fueron seis (46.15%); las cepas de *Enterobacter cloacae* que presentaron adherencia ligera fueron seis (46.15 %) y sólo una cepa (7.69%) de *Enterobacter cloacae* presentó adherencia media.

Es importante el hecho de que el 53.8% de las cepas de *Enterobacter cloacae* hayan presentado cierta capacidad para formar biopelículas. Además este microorganismo es resistente a antibióticos como Amoxicilina, Cefazolina y Ampicilina no debemos restar importancia a su presencia ya que, al asociarse a problemas de salud pública estas características de adherencia y resistencia a antibióticos pueden constituir factores de virulencia de este patógeno oportunista

## 8.6 DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL MANGO

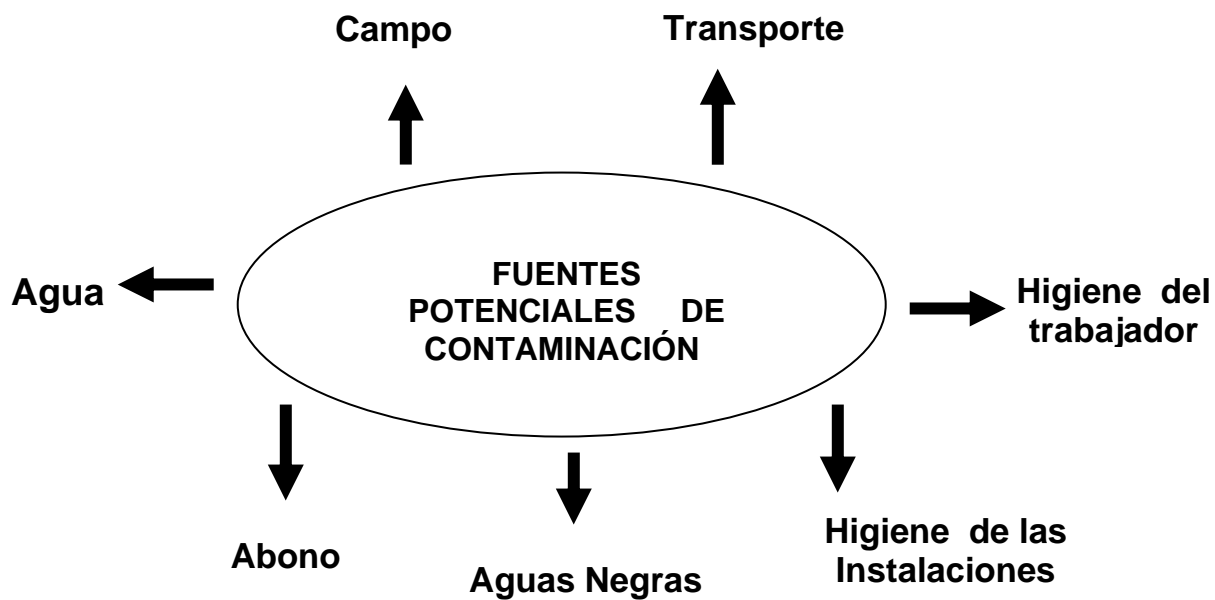


Figura 8. Posibles fuentes de contaminación del mango con microorganismos patógenos.

Las posibles fuentes de contaminación de patógenos en el mango se pueden clasificar de acuerdo con las diferentes partes del proceso en las que se presentan.

En pre-cosecha las fuentes más importantes son el agua del riego y el uso de abono como fertilizante. Numerosos estudios han demostrado la larga sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* en el abono. Otras fuentes además de las antes mencionadas son las aves migratorias, ya que se ha encontrado en su excremento *Escherichia coli* y en el plumaje *Salmonella* y *Campylobacter*. La presencia de contaminación del suelo o materia fecal en la superficie del producto, puede provocar alteraciones en la ecología microbiana y también puede alterar el comportamiento de los patógenos y otra microbiota. Los modelos de crecimiento en este ambiente pueden ocasionar cambios en el pH incrementándolo, favoreciendo así el crecimiento de patógenos, colonizando y formando biopelículas (43) (3).

En la cosecha se consideran como fuentes de patógenos importantes el equipo utilizado para recolectar la cosecha y la higiene de los trabajadores, ya que en México más del 90% de la recolección de frutos y verduras se realiza a mano. En el manejo post-cosecha (empacado y reparto de los frutos), el agua que se utiliza para lavarlos, ya que no en todos los casos se utiliza agua con sanitizantes, lo que puede provocar una contaminación por el agua con elevada carga microbiana (43).

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (42) señalan que el empaque del mango debe estar en un área que no presente riesgos de contaminación química y biológica. La construcción debe tener un diseño exterior e interior funcional que

facilite su mantenimiento y operaciones de limpieza, de preferencia no a nivel de suelo. Los alrededores deberán estar pavimentados o con algún material que no permita formación de polvo o lodo, así como libres de malezas que puedan resguardar plagas tales como roedores, cucarachas e insectos. De la misma manera, deberá evitarse localizar los empaques cercanos a establos, industrias, zonas habitacionales o basureros que generen desechos químicos o biológicos que puedan provocar contaminación.

La empacadora donde se realizó el muestreo se encuentra en una zona grande, de fácil acceso y de fácil mantenimiento. A su alrededor no se encuentran fábricas o empresas que pudieran generar desechos que a su vez, afecten a la planta. Los pisos al interior de la planta se encuentran debidamente pavimentados, sin embargo existen áreas en las que el piso es de terracería, como es la entrada de personal, en la cual en ocasiones se forman charcos o se generan polvaredas cuando ingresan camiones que transportan el mango. Además, el personal que ingresa a pie introduce tierra y lodo en sus zapatos. Otro problema que presenta la planta es que sus instalaciones son abiertas y la entrada de polvo se da de manera continua. En los alrededores de la planta hay maleza y en consecuencia insectos y algunos animales rastreros. Aunque la empacadora está rodeada de una malla ciclónica resulta necesaria la instalación de un muro de concreto ya que los orificios de dicha malla permiten el ingreso de roedores e insectos, además de tierra y polvo. En las BPM se indica que los pisos, las paredes y los techos deben



de ser de materiales durables, lisos y fáciles de limpiar. Los pisos deberán contar con sistemas de drenaje cubiertos con rejillas y malla, para facilitar el desagüe y evitar la entrada de plagas. Se debe contar con un tapete sanitario en las entradas a las áreas de proceso de la unidad de empaque, al cual se le aplique un desinfectante como yodo o cloro. Se deberá evitar el proceso de empaque en campo, a orilla de canales, drenes o caminos, o en espacios insalubres.

#### **8.6.1 Instalaciones Sanitarias**

En la unidad de empaque se debe contar con instalaciones sanitarias de preferencia fuera del área de empaque, en proporción uno por cada 20 trabajadores, deberán estar diferenciadas por sexo, accesibles a todos los trabajadores y limpios. Así mismo los baños deben contar con los medios adecuados para el lavado, desinfectado y secado higiénico de las manos como: agua limpia, jabón, desinfectante, papel y depósitos de basura. En la empresa muestreada los sanitarios se encuentran al interior de la empacadora, a unos tres o cuatro metros del área donde se almacenan los mangos y las puertas tanto de los sanitarios de hombres como de mujeres se mantienen entreabiertas. La empacadora cuenta con drenaje cubierto por rejilla pero no con malla, por lo que puede haber ingreso de roedores o insectos. Los trabajadores no laboran con el

equipo necesario como cofias, guantes, mandiles, zapatos cerrados, de hecho, varios de los trabajadores laboran portando relojes, collares o aretes.

Seguramente el hecho de hallar *Enterobacter cloacae* en la recepción así como en el agua de pozo y en el mango después de lavado, obedece a que el área de recepción es una zona abierta (ya que ahí llegan los camiones a descargar el mango) y ésta se encuentra a unos tres metros del área de primer y segundo lavado, el polvo entra y puede depositarse en el pozo de agua así como en las lavadoras.

### **8.6.2 Lavado**

Para el lavado del producto se deberá utilizar agua que haya demostrado ser apta para uso poscosecha. Aplicar un desinfectante al agua, el cual puede ser cloro, yodo u ozono, o cualquier otro producto que demuestre ser efectivo, los cuales deben monitorearse de manera frecuente y registrarlo en una bitácora.

En esta etapa del proceso, sí se utiliza solución de cloro como desinfectante la cual, deberá mantenerse en una concentración entre 50-150 ppm de cloro libre en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5, los productos que se utilicen para ajustar el pH deben ser de grado alimenticio. Si se utilizan tinajas para el lavado, se debe cambiar el agua por lo menos dos veces al día, o cuantas veces sea necesario, para evitar la acumulación excesiva de materia extraña y sólidos sedimentables. En caso de

utilizar cepillos para remover suciedad difícil y residuos de látex. Se debe aplicar un programa de lavado, desinfección y mantenimiento periódico.

Al encontrar contaminación en las dos áreas de lavado pensamos que lo anterior no se está cumpliendo, ya que existe gran cantidad de materia orgánica en los tanques de lavado. Como consecuencia de esto, seguramente la concentración de cloro residual es inferior al que marcan las BPM. También el agua en las tinas de lavado se aprecia turbia e incluso existe lodo en el fondo de las mismas.

### **8.6.3 Tratamiento Hidrotérmico e Hidroenfriado**

El tratamiento hidrotérmico se aplica con la finalidad de controlar la larva de mosca de la fruta, consiste en sumergir el mango en agua, a una temperatura constante de 46.1 grados centígrados. En el hidrotérmico se debe utilizar agua, que cumpla con la NOM-127-SSA1-1994 “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización” la cual se haya demostrado por medio de análisis microbiológicos, ser apta para uso poscosecha. Durante el tratamiento hidrotérmico, se deberá aplicar al agua algún desinfectante que asegure la disminución de la carga microbiana y establecer un sistema de monitoreo, para verificar la concentración del desinfectante. Asimismo, para el caso de utilizar

cloro, antes de cada carga se deberá verificar que la concentración de cloro libre sea de 200 ppm.

El agua a utilizar en el hidrogenado debe ser apta para uso poscosecha, para lo cual se deben realizar análisis químicos y microbiológicos. Cambiar el agua por lo menos una vez al día, o cuantas veces sea necesario para evitar la acumulación excesiva de materia extraña y sólidos sedimentables.

Debe aplicarse un desinfectante al agua, para reducir el riesgo de contaminación microbiana, como hipoclorito de sodio ó hipoclorito de calcio en una concentración de 50 a 150 ppm de cloro libre a un pH de 6.5- 7.5. Establecer un sistema de monitoreo, para verificar la concentración del desinfectante.

Se desconoce si el agua utilizada en la empacadora pasa por pruebas para saber si es apta o no para ser utilizada. El desinfectante añadido es cloro pero éste se añade en cantidades menores a lo especificado en la norma, ya que en voz de algún trabajador las concentraciones de cloro especificadas en BPM generaban “blanqueo” del mango.

#### **8.6.4 Empacado**

Se deben usar cajas, bolsas, hojas de papel, envases y bandas plásticas nuevas, no tóxicas, que estén limpias y en buenas condiciones. Estas deberán estar libres de plagas y ser adecuadas para la transportación, refrigeración, almacenaje y estiba.

Las cajas de cartón e insumos de embalaje deben estar almacenados en un lugar libre de humedad, protegidas contra el polvo, identificadas y no deben estar en contacto directo con el suelo.

En la empacadora se usan cajas de cartón para el empaclado, las cuales son nuevas y aparentemente están limpias, pero se encuentran apiladas en un sitio a donde llega polvo y algunas están en contacto directo con el suelo.

Sobre las tolvas hay cajas, además de que se encuentran muy sucias, ya que los trabajadores en su afán de desatorar algunos mangos se suben en ellas y dejan restos de lodo. También para desatorar los mangos hacen uso de escobas, pero dichas escobas no son de uso exclusivo para este fin, sino que son escobas con las que barren el área próxima a las tolvas.

Para empaclar el mango en las cajas, los trabajadores no usan guantes y no se lavan las manos siendo que el mango ya pasó por el proceso de lavado. Esta es entonces una etapa que debería controlarse.

## 9. CONCLUSIONES

- Se consiguió el aislamiento y la identificación de enterobacterias de la superficie del mango de exportación.
- Se identificaron entre otros microorganismos cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Citrobacter* lo cual, constituye un riesgo potencial para la salud pública como agentes transmisores de enfermedades gastrointestinales.
- Se determinó la presencia de *Escherichia coli* en la superficie de mangos de exportación, encontrando que su serotipo es O139:H26, de acuerdo a éste las cepas de *Escherichia coli* se colocan dentro del grupo de *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC).
- Las cepas de *Escherichia coli* fueron detectadas en el agua del tratamiento hidrotérmico, lo cual nos indica como probable fuente de contaminación el agua utilizada en este punto de proceso.
- Se llevó a cabo una virotipificación de las cepas de *Escherichia coli* y no se detectaron genes de virulencia en las mismas.
- Se determinó la presencia de *Salmonella* en la superficie de mangos de exportación cuyo serotipo es O11:H Z<sub>4</sub>Z<sub>23</sub> el cual corresponde a *Salmonella* Parera IV, un tipo de *Salmonella* del cual no se tiene conocimiento de reportes en alimentos.
- La cepa de *Salmonella* fue detectada en la recepción lo que nos indica que posiblemente el mango este contaminado desde la precosecha.

- La presencia de *Salmonella* muestra la necesidad de un control de calidad estricto ya que, son varios los puntos dentro de la cadena de producción en que se puede dar la contaminación de productos frescos, entre ellos están: contaminación fecal de animales y empleados, uso de agua de riego contaminada, manipulación de los trabajadores, y uso de equipos contaminados entre otros.
- Se obtuvieron perfiles de sensibilidad a antibióticos de todas las cepas aisladas encontrando que el 25% de ellas fueron sensibles a todos los antibióticos empleados. Para las cepas de *Enterobacter cloacae* las cuales fueron detectadas a lo largo de todo el proceso se obtuvo un perfil de sensibilidad a antibióticos por método Vitek y el método de Sensidiscos, obteniendo dos patrones de resistencia. El patrón A en donde hay resistencia sólo de una cepa (cepa no. 1) a diez antibióticos mientras que el patrón B, nos muestra que todas las cepas de *E. cloacae* son resistentes a dos de los antibióticos (Amoxicilina y Cefazolin). En cuanto a la prueba de Sensidiscos, el patrón de resistencia B es decir, resistencia a Amoxicilina y Cefazolin se repite para todas las cepas de *E. cloacae* además, también muestra la resistencia que tienen dichas cepas ante Ampicilina.
- Se determinó la capacidad de formación de biopelículas por las cepas de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Salmonella* obteniendo que las cepas de *Escherichia coli* y de *Salmonella* no presentaron capacidad para formar biopelículas mientras que para *Enterobacter cloacae* seis cepas

presentaron adherencia ligera, una cepa presentó adherencia media y las seis restantes no presentaron adherencia.

- Los resultados obtenidos de resistencia a antibióticos y adherencia para *Enterobacter cloacae* nos indican el hecho de otorgar mayor importancia ante la presencia de este microorganismo ya que al ser un patógeno oportunista y presentar estos perfiles puede generar problemas importantes asociados con la salud pública.
- La contaminación posiblemente se origina por malos manejos, incumplimiento de la normatividad vigente así como, por la negligencia de los trabajadores y directivos de la planta empacadora.
- La reducción y/o pérdida de la calidad, y la contaminación por microorganismos patógenos en productos frescos puede ocurrir en cualquier punto de proceso lo cual posiblemente podría evitarse implementando sistemas de control eficientes que permitan prevenirlas.



## 10. PERSPECTIVAS

- Es necesario llevar a cabo un análisis molecular de las cepas de *Enterobacter cloacae* encontradas a lo largo del proceso para saber si estas cepas son clonas o si se trata de cepas distintas.
- Resulta necesaria una inspección exhaustiva de la planta procesadora a fin de identificar los puntos críticos de control durante el proceso que lleva el mango antes de ser exportado.
- Es necesario mejorar las prácticas de manufactura en la planta empacadora.
- Implementar mecanismos adecuados para garantizar la inocuidad del mango y así mantener su presencia en el mercado internacional.
- Es necesario establecer procedimientos especiales de limpieza ya que algunos microorganismos presentaron capacidad de formar biopelículas, lo que implica una mayor resistencia para su eliminación y un potencial riesgo de salud pública.

## 11. REFERENCIAS

1. Aruscavage D., K. Lee, S. Miller, y J.T. Lejeune. Interactions Affecting the Proliferation and Control of Human Pathogens on Edible Plants. *Journal of Food Science*. Vol 71. No. 8, (2006).
2. Bacteriological Analytical Manual (2001). Disponible en:  
[www.fda.gov/bam-toc.html](http://www.fda.gov/bam-toc.html)
3. Beuchant, L.R. 2002 Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. 4: 413-423
4. BIOFILM ONLINE disponible en:  
[www.biofilmsonline.com](http://www.biofilmsonline.com) Última actualización: 2006.
5. bioMérieux Inc. 2002. manual de procedimientos para la identificación de Gram negativos para uso diagnóstico *in Vitro*. Hazelwood, MO, USA.
6. Branquinho M.E., Austuriano C., Jakabi M., Scala D. (2006). Incidente, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. *Food Control* 18(2007) 1002-1007.
7. Castro-Rosas J., Cerna J., Reyes E., Santos E., Zúñiga A., Gómez C., Estrada T. (2005). Frecuencia y concentración de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y grupos patógenos de *E. coli* en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas de restaurantes. *Inocuidad Alimentaria*. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.)

8. Castro-Rosas J., Ramírez L., Santos E., Zuñiga A., Sánchez I., Gómez C. (2005). Frecuencia de microorganismos indicadores de higiene y Salmonella en jugo de betabel. Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
9. Celaya M., Moreno J., Estudio bacteriológico y determinación de la sensibilidad a 21 antibióticos, en una población de pacientes atendidos en el Hospital General de México durante el año 1999. 2001.
10. Comisión Nacional de Fruticultura, (1974). El Mango en México. Serie de investigaciones fisiológicas No.3 SAG/México.
11. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, fourth edition, American Public Health Association, Washington, DC 2001.
12. Cruz Córdova A. del C., 2004. Determinación de patógenos entéricos en germinados de alfalfa. Tesis de maestría. IPN, México.
13. Díaz R. G., Wachter R. C. 2003, Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 45, No. 1-2
14. Djordjevic D., M. Wiedmann, L. A. McLandsborough. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 6. (2002) 2950–2958)
15. Donnenberg M.S. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells. Clin. Infect. Dis. 1999.
16. Edwards, P.R. and W.H. Swing. 1972 Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co., MN.

17. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaría de Salud. México, 1994.
18. Exopol online. Base Científica de las AUTOVACUNAS inmunopotenciadas con liposomas Biofilms bacterianos: el papel de los exopolisacáridos bacterianos en la formación de biofilms y en la cronicación de infecciones. Última actualización: 2006. Disponible en:  
[www.exopol.com/autovac/basecientifica2.html](http://www.exopol.com/autovac/basecientifica2.html)
19. Forysthe S.J. 2002. Food Safety Assurance in the EU. Department of Life Sciences, The Nottingham Trent University, Clifton Lane, Nottingham.
20. Fraizer W.C., Westhoff D.C., Microbiología de los Alimentos 4ª edición, editorial Acribia, Zaragoza, España, 1993.
21. Garau J.: Beta-lactamases: current situation and clinical importance. Intensive Care Med. 1994.
22. Ghenghesh K.S., belhaj K., El-Amin W.B., El-Nefathi S.E., Zalmum A. 2005. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli-Libya. Food Control. 16(10): 855-858.
23. Gilardi, G.L., 1978. Glucose Non-fermenting Gram.negative Bacteria in Clinical Microbiology. CRC Press, Inc., West Palm Beach, FL.
24. Grimont P.A. Isolation and characterization of injured coliformes from the drinking water distribution network of La Plata, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2001.

25. Hulme, A.C. (1971). The mango, Capítulo 6, en :Hulme A.C. "The Biochemistry of fruits and their products". Vol. 2 Hulme, A.C. Academic Press Inc. London, Pp233-254
26. Hsueh P., teng L., Pan H., Chen Y., Sun C., Ho S., Luh K. 1998. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens*. Bacteremia among Oncology Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(10): 2914-2917.
27. ICMSF (2002) *Microorganisms in Foods 7. Microbiological testing in food safety management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp. 145-165.
28. Infoagro(2003) .disponible en:  
[www.infoagro.com/frutas/frutas\\_frutas\\_tropicales/mango.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_frutas_tropicales/mango.htm)
29. Investigación y Desarrollo, num.26, julio de 1995
30. Kauffman F., Clasificación of Bacteria, A realistic scheme with special reference to the classification of *Salmonella* and *Escherichia* species, State Serum Institute, Copenhagen, First Edition, 1975, Copenhagen, Denmark.
31. Kerly K.J., Elspeth A., MacRae S.E., Hetherington. 2001. Postharvest heat desinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae*. 89:171-193
32. Konecka-Matyjek E., Turlejska H., Pelzner U., Szponar L. 2005. Actual situation in the area of implementing quality assurance systems GMP, GHP and HACCP in Polish food production and processing plants. *Food Control*. 16: 1-9
33. Lana, Lumb B., Ryan D., Reeves P.R. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 2001.
34. Lasa I. Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM* 37 (2004) 14-18.

35. León, F.M. (1982) Industrialización de variedades de mango Kent y Keitt. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F.
36. Li Y., Mustapha A. 2004. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *Food Microbiology*. 21(3): 369-375.
37. Lindberg A.M., Ljungh A., Ahrné S., Löfdahl S., Molin G. 1998. Enterobacteriaceae found in high numbers of fish, minced meat and pasteurized milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*. 39(1-2): 160-171.
38. Lizada M.C.C.(1993) Mango, en:Seymour G.B, Taylor J.E., Tucker G.A.(Eds), *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman & Hall, London
39. Loiseau-Marolleau M.L., Laforest H. 1976. Contribution à l'étude de la flore bactérienne des aliments en milieu hospitalier. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 6 (5) :160-171.
40. López, C. S., J. F. Cerna, N. Villegas, R. Thompson, F. R. Velásquez, J. Torres, P. I. Tarr y T. Estrada. 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9:127– 131
41. Mammeri H., Laurans G., Eveillard M. Castelain S., 2001. Coexistence of SHV-4 and TEM-24-Producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-Producing strains in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (6): 2184-2190.
42. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura.

43. Matthews, K.R. Microbiology of Fresh Produce. ASM Press. USA, Washington, D.C. 2006. pp. 1-7; 92-95.
44. Medlicott A.P., Reynolds S.B. y Thompson A.K. (1986) Effects of temperature on the ripening of mango fruit (*Mangifera indica* var. Tommy Atkins). *Journal of Science of Food Agriculture* 36, 561-566
45. Meng J., Doyle M.P. 2002. Introduction. Microbiological food safety. *Microbes and Infection*. 4:395-397
46. Mitra S.K.y Baldwin E.A. (1997). Mango, en Mitra S.K (Ed.), *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK Pp 85-110.
47. Mukherjee, S.K. (1973). History, origin and botany, Capítulo 1 en: "The Mango Handbook" Indian Council of Agriculture Research. New Delhi.
48. Niu C., E.S. Gilbert. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilms formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 70, No. 12 (2004) 6951-6956.
49. NOM-127-SSA1-1994 "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización"
50. Oberhofer, T.R. and J.W. Rowen. 1977, Characterization and Identification of gram-negative, Non-fermentative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*.
51. Okharavi N., Ficker L., Mathenson M., Lightman S. 1997. *Enterobacter cloacae* endophthalmitis: Report of Four Cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 48-51.

- 
52. Olsson C., ahmné S., petterson B., Molin G. 2004. DNA Based Classification of Associated Enterobacteriaceae. Previously Identified by Biolog GN Microplates. Systematic and Applied Microbiology. 27(2):219-228.
  53. Orskov F., Orskov Y. (1984) Serotyping of *Escherichia coli* in: T. Bergan (ed) Methods in Microbiology. Academic Press Ltd., London, 14, 43-112.
  54. Pass M.A., Odedra R. and Batt M., Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2000.
  55. Reis M.H., Guth B.E. Gomes T.A.T., Murhovski J., Trabulsi L.R., Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin or heat stable toxin or both in children with and without diarrhea in Sao Paulo. J. Clin. Microbiol. 1982.
  56. Riley Lee (2004) Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. ASM Press, Washington D.C. Pp 29-55.
  57. Rivera F., Leyva-López N., Méndez J. (2005) Detección molecular de las bacterias Salmonella y Shigella por PCR en frutas y hortalizas de consumo en fresco. Inocuidad Alimentaria. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México.
  58. Rivera-Tapia JA. Antibiotic resistance, Public Health Problem. An Med Asoc Med Hosp ABC 2003.
  59. Rodriguez Angeles G. (2002) Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. Salud Pública, México Vol. 4, No. 5
  60. Romero G., Bonilla N., Cabrera C., Silva G. (2003). Bacteriological contamination of water and lettuce in Puebla (Mexico). Facultad de Ciencia Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.



61. Sabota J.M., Hoppes W.L., Ziegler J.R. Jr., DuPont H., Mathewson J., Rutecki G.W. 1998. A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. *The American Journal of Gastroenterology*. 93 (1): 118-119.
62. San Agustín y Tafoyas, 2002 Análisis de posibilidades de incrementar las exportaciones de mango mexicano a Japón. Disponible en: [www.chapingo.mx/investigacion/pronisea/tema10.html](http://www.chapingo.mx/investigacion/pronisea/tema10.html)
63. Sharma M., Anand S.K. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food dairy processing industry- a case. *Food Control*. 13 (6-7):469-477.
64. Sheikh J., Hicks S., Dall M., Phillips A. D y Nataro J. P. Roles for Fis and YafK in biofilms formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 41 (5), 983-997. (2001)
65. SIAP-SAGARPA, 2004 Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Fuente: Avance de Siembras y Cosechas perennes 2003.SIAP, con información de las delgaciones SAGARPA en los estados.  
Disponible en: [www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comargr2c.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comargr2c.html)
66. Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) 2002.
67. Sonne-Hansen J., Jenabian S.M. of *Salmonella*: identification of the phase 1 H antigen base on partial sequencing of the clic gene. Denmark, 2005
68. Soriano J.M., Rico H., Moltó J.C., Mañes J. 2001. Incidente of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potatoe omelette from restaurants. *Food Microbiology*. 18(2): 159-163.

69. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Svabić-Vlahović M. A modified microtite-plate test for quantification of staphylococcal biofilms formation. *Journal of Microbiological Methods* 40 (2000) 175-179.
70. Svennerholm A.M., Lindblad M., GM<sub>1</sub>-ELISA method for demonstration of *E. coli* heat-stable enterotoxin. *FEMS Microbiology letters*, 1985.
71. Toma C., Lu Y., Higa N., Nakasone N., Chinen I., Baschkier A., Rivas M. and Iwanaga M., Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*, 2003.
72. Tsai Y., Lin C., Chang S., Chen H., Wei C., Hwang D. 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*. 22(5):461-467.
73. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (F.D.A). 1998. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiológico en los Alimentos, en el caso de Frutas y Vegetales Frescos.
74. Zagory D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology* 15: 313-321
75. [www.aesa.msc.es](http://www.aesa.msc.es)
76. [www.coveca.gob.mx/pdf/inocuidad.pdf](http://www.coveca.gob.mx/pdf/inocuidad.pdf)
77. [www.inca.gob.mx](http://www.inca.gob.mx)
78. [www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS\\_espanol/espanol.pdf](http://www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS_espanol/espanol.pdf)

---

---

## 12. ANEXO

A) Soluciones para la extracción de DNA.

a) Amortiguador TES, pH=8

La solución debe contener los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Preparación de 200mL
Tris Sigma trisma Base cat T1503	0.05 M	1.513 g
EDTA JT Baker cat 8193-01	0.005 M	1 mL EDTA 0.5M pH=8
NaCl JT Baker cat 3624-01	0.05 M	0.2922 g

b) SDS Sigma cat L-4390

Se pesaron 10 g y se disolvieron en 100mL de agua destilada estéril, la solución se preparó bajo condiciones de esterilidad.

B) Formalina

Solución salina 0.85%

Formol 0.6%

Mezclar disolviendo 8.76 g de NaCl con 6 mL de formaldehído en 1000 mL de agua destilada.





---



---

**RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN POR EQUIPO VITEK**

Cepa: 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45  
46

DP3	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
INO	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
TLA								-					-	-	+	
OFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ADO	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
GC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XYL	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
COU	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
ACE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
H2S	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LYS	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
ESC	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
PXB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
ONP	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
ORN	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
PLI	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+		-	-	-
LAC	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		-	+	-
SUC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	+
RHA	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+		-	-	+
OXI	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-		+	-	+