



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S D E P O S G R A D O

TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *ENTEROBACTER* AISLADAS DE LA
SUPERFICIE DEL MANGO Y DE SU PROCESO POST-COSECHA, EN
UNA PLANTA EMPACADORA DE NAYARIT, MÉXICO.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

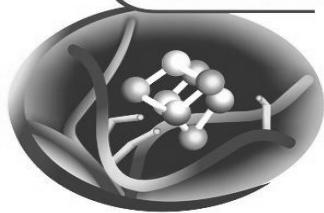
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q.A. KATYA DAFNE GUADARRAMA OROZCO

TUTORA: Dra. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Ciencias
Bioquímicas



MÉXICO,

D.F.

JUNIO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dra. Gloria Soberón Chavéz
Vocal:	Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
Secretario:	Dra. Bertha González Pedrajo
Suplente:	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Suplente:	Dr. Francisco Ruiz Terán

Sitios donde se desarrolló el tema:

*Laboratorio 36, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

*Unidad de Biología Molecular, Instituto de la Fisiología Celular, UNAM.

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, quien mantuvo paciencia ante mi impetuosidad, ayudándome a dar por concluido este proyecto y un logro más en mi vida profesional.

Al Dr. José Molina, inmenso agradecimiento por apoyarme y enseñarme sin razón o interés alguno, en todos mis experimentos de virulencia, por actuar como asesor, como consejero y maestro. Gracias Doc, por escuchar mis problemas, por tener un corazón abierto a ayudarme en cualquier momento, por su paciencia, gracia y sonrisas en las conversaciones. Gracias por soportarme en los días difíciles, ya fuera con los experimentos del laboratorio o en el camino de la vida. Por brindarme la mano sin pensarlo dos veces, con la mejor disposición y cariño, en varias de las ocasiones en que se presentaron momentos importantes y trascendentes en mi vida (buenos, alegres, malos y tristes). Sin su apoyo y sabiduría profesional la realización de esta tesis no hubiera sido deliciosa. Gracias, lo aprecio mucho.

Al Dr. Carlos Eslava por actuar no sólo como un asesor y consejero en el proyecto de posgrado, sino también serlo en mi vida. Gracias por los ánimos en los días oscuros, en los grises y en los pardos, gracias por las sonrisas que ayudo a que florecieran cuando estaban atrapadas dentro de mi pecho y garganta y querían ser lágrimas. Gracias porque por sus consejos la preocupación, estrés, ignorancia y coraje que pudieron algún día inundarme no lo lograron, siendo encausados y logrando el éxito al finalizar a tiempo este proyecto y disfrutar de días tranquilos, con sonrisas, paz y sabiduría. Gracias por su profesionalismo y cariño, tan valiosos y excepcionales para mi.

A la Dra. Laura Ongay Larios por ser tan amable al prestarme el equipo de campos pulsados de la Unidad de Biología Molecular y porque junto con esa amabilidad me regalaba una sonrisa. Gracias ya que sin su apoyo el término de este proyecto hubiera sido más difícil, pues era primordial el equipo.

A la UNAM, por permitirme especializar y obtener mayores conocimientos en la ciencia, y en el mismo camino obtener sabiduría. Siempre la reconoceré como la máxima casa de estudios.

Y mi más profundo agradecimiento a todos y cada uno de los profesores de esta prestigiosa Universidad, que compartieron conmigo sus conocimientos y así cumplíamos con nuestras encomiendas engrandeciendo a la UNAM.

DEDICATORIAS

A ti Yahweh, ¡OH Dios! padre y señor, PORQUE EN TI TODO LO PUEDO, por amarme como lo haces. Gracias porque por tu inmensa divinidad pude finalizar este trabajo, por permitir la presencia de mi familia y de seres excepcionales que me alentaron y apoyaron en diversos aspectos de mi vida y así ver finalizado mi posgrado, por ritmo, color y vaivén de mi vida. Gracias por permitirme ser yo, con mis virtudes y defectos, pero siempre tu hija y sierva. AMÉN

A mi mamita linda, por tu apoyo para iniciar este proyecto, por creer en mi para verlo un día finalizado, y de igual manera animarme para ello y sobretodo enseñarme a no desviar mi camino y finalizar lo empezado, por difícil y complicado que parezca. Gracias porque a lo largo de toda la maestría no puedo negar, pasados los días y momentos vividos, que tus palabras y actitudes, siempre fueron deseando lo mejor para mi. Sin embargo, de situaciones hermosas, tristes y amargas esta hecha la vida, y en esta etapa de posgrado he madurado mas de lo que creí no sólo profesionalmente, sino también humana y emocionalmente y fue en esta etapa de increíble y sorprendente madurez que tu existencia formo parte. Gracias por tu tolerancia y actitud ante mi ingenuidad, impetuosidad y decisiones.

A mi papá por tus inigualables consejos, apoyo, confianza y amor que me ofreciste. Por que en varios momentos se que sufriste y te preocupaste de mi y porque imagino sabes lo difícil emocionalmente que me fue continuar con el pie duro y actitud recta durante todo el posgrado y sacarlo de forma excelente. Gracias por no dudar de mí.

A Ingrid y Jessy porque a pesar de nuestros indescritibles momentos, la hermandad es irrompible, porque ya no sólo la sangre nos une, sino una vida, un corazón y un espíritu divino. Saben cuánto aprecio y bendigo su presencia, apoyo y ánimos en estos momentos de mi vida para poder finalizar esté proyecto. Gracias porque cada palabra dicha, cada mirada, silencio y actitud dirigida hacia mi, fueron formando una parte de lo

que ahora soy. Gracias por sus consejos y porque se que no sólo en las buenas sino también en las tormentosas puedo contar con ustedes y ser hermanas puede ir más allá de lo que logremos imaginar.

A Iván, por estar conmigo en los duros momentos de esta etapa, porque me seguiste sin condiciones, apoyaste y no me dejaste sola en varias ocasiones que necesite a alguien de este mundo para seguir adelante. Porque eres un grandioso hermano, lo demostraste sin palabras sino con hechos, tal y como se distingue a un increíble hombre. Gracias porque en mis caídas y a tu forma de ser me ayudaste a levantarme, raspada y adolorida me ayudaste a curarme muchas veces. Gracias por escucharme, abrazarme y acompañarme. Sin tu apoyo todo hubiera sido más difícil. No habrá día de olvido para la etapa que nos hizo mejores, más humanos y grandes hermanos unidos para todo y en todo.

A Jeshua, Emmanuel y Abdeel, porque ha su corta edad me regalaron lindas e inigualables sonrisas y miradas que me sirvieron para fortalecerme sentimentalmente y salir profesionalmente e individualmente adelante. Gracias.

A Luis por ser parte fundamental e indispensable de mi vida. Eres mi dicha, parte de mi felicidad y de mis sonrisas las cuales son tan tuyas como mías, por ser MI AMOR y el hombre y dueño de mi corazón. Porque sé, que mis alegrías y logros los saboreas y gozas como si fueran tuyos. TE AMO y eres lo único que me hace suspirar con una sonrisa en el rostro con tan sólo imaginarte.

A mi bebé por impulsarme desde el momento que me entere de su existencia a terminar lo que había dejado en el olvido. Es por ti, por quien salió una increíble energía y ánimos para poder obtener el grado a como de lugar. Eres el ser más importante de mi vida en este mundo, eres desde tu concepción parte inseparable de mi vida y no habrá un día más en mi vida en donde lo primero seas tú. Gracias por ser una bendición y un impulso para ser lo mejor que Dios me permita ser.

A Solis por ser compañero y amigo en durante toda mi maestría y continuar siéndolo. Por tus palabras, consejos, bromas y demás momentos que compartiste, miraste y escuchaste... gracias.

A mis muy estimadas amigas Jacqueline, Rocío, Lupita y Martha, porque me alentaron en los tiempos difíciles, porque me escucharon cuando lo necesite, porque me aconsejaron de la mejor forma que su corazón les dictaba, por los días luminosos y llenos de risas que hemos compartido y que faltan por seguir teniendo. Gracias por su cariño y amistad incondicional.

A la sublime y hermosa luna que noches y madrugadas enteras me acompañó en la tranquila soledad durante la escritura, estudio y trabajo en el laboratorio, así como en infinitos momentos que nunca olvidare...

A la obsesión, dicha, ilusión, amor, tranquilidad, fortaleza, tropiezos, paz, bendición, milagros, impetuosidad, esfuerzo, frustración, coraje, tristeza, alegría, valentía, sueños, desesperación, ingenuidad, fidelidad, compromiso, lealtad, soledad, independencia, decisión, incertidumbre, esperanza y demás sabores, colores, aromas, imágenes, pensamientos, sentimientos y realidades que tocaron en la puerta de mi ser y anidaron durante todo el trayecto de este posgrado e hicieron posible su termino.

*"No os afanéis por vuestra vida, que habéis de comer o que habéis de beber;
ni por vuestro cuerpo, qué habéis de vestir.
¿No es la vida más que el alimento, y el cuerpo más que el vestido?
Mas buscad primeramente el reino de Dios y su justicia
y todas estas cosas serán añadidas.
Así que, no os afanéis por el día de mañana,
porque el día de mañana traerá su afán.
Basta a cada día su propio mal."*

Mateo 6

"La soledad no te enseña a estar solo, sino a ser único"

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 El mango.....	4
3.2 Microbiota del mango.....	5
3.3 Situación actual del mango mexicano: economía e importancia microbiológica.....	6
3.4 Tratamientos post-cosecha.....	7
3.5 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	8
3.6 Género <i>Enterobacter</i>	9
3.7 Identificación de <i>Enterobacter sp.</i>	10
3.8 Patogénesis de <i>Enterobacter sp.</i>	10
3.9 Tratamiento de <i>Enterobacter sp.</i> con antibióticos.....	11
3.10 Métodos para la identificación de microorganismos.....	12
3.11 Tipificación de microorganismos.....	12
3.12 Métodos fenotípicos.....	13
3.13 Métodos genotípicos.....	14
3.14 Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción y electroforesis en geles de agarosa por campos pulsados (PFGE).....	19
3.15 Variables que afectan la resolución de PFGE.....	21
3.16 Criterios para la interpretación de resultados de PFGE.....	24
3.17 Inconvenientes de PFGE.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. HIPÓTESIS.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Material biológico.....	27
6.2 Comprobación de la pureza de las cepas.....	28
6.2.1 Tinción de Gram.....	29

6.2.2	Prueba de oxidasa.....	29
6.2.3	Identificación fenotípica de <i>Enterobacter</i> sp.....	29
6.3	Evaluación de los factores de Virulencia.....	30
6.3.1	Resistencia a antibióticos mediante el sistema VITEK®.....	30
6.3.2	Actividad hemolítica.....	30
6.3.3	Adherencia a células HEp-2.....	31
6.3.4	Invasividad a células HEp-2.....	33
6.3.5	Actividad tóxica de sobrenadantes de las cepas de <i>Enterobacter</i> en células VERO.....	34
6.4	Tipificación de cepas de <i>Enterobacter</i> por PFGE.....	35
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1	Comprobación de la pureza de las cepas identificadas como <i>Enterobacter</i>	38
7.2	Evaluación de los factores de virulencia.....	40
7.2.1	Resistencia a antibióticos mediante el sistema VITEK®.....	40
7.2.2	Actividad hemolítica.....	43
7.2.3	Adherencia a células HEp-2.....	43
7.2.4	Invasividad a células HEp-2.....	51
7.2.5	Actividad tóxica de sobrenadantes de las cepas de <i>Enterobacter</i> en células VERO.....	52
7.3	Tipificación de cepas de <i>Enterobacter</i> por PFGE.....	60
8.	CONCLUSIONES.....	71
9.	APÉNDICE.....	73
9.1	Medios, soluciones y lavado de material.....	73
9.2	Soluciones para PFGE.....	77
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

1. RESUMEN

México es el principal exportador de mango a nivel mundial; sin embargo los productos frescos mexicanos han sido causa de brotes de enfermedades, lo cual afecta la economía en el país.

Nuestro grupo de trabajo ha detectado tanto *Salmonella* como serotipos patógenos de *Escherichia coli* en los mangos nacionales y en los destinados a exportación, por lo que es necesario asegurar su inocuidad (Pérez, 2007). Dicho trabajo es el seguimiento al muestreo realizado en mangos Ataulfo durante en el 2003, en NATURAMEX SRL de CV en el municipio de Tepic, estado de Nayarit, México. El muestreo se realizó en diferentes etapas del proceso de post-cosecha del mango y de éste se aislaron varias cepas de enterobacterias, identificándose por el sistema VITEK® y predominando cepas de *Enterobacter*. Por ser este género considerado como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos, así como un patógeno oportunista, causante de infecciones nosocomiales como meningitis, neumonía y septicemia (O'Connor-Shaw, 1995), se seleccionó dicho género para determinar las posibles fuentes de contaminación y si presentaban adherencia, invasividad, citotoxicidad y resistencia a antibióticos, así como su tipo de hemólisis.

Para la comprobación de la pureza de las cepas aisladas, se sembraron en agar sangre y en Mac Conkey, siendo su morfología macroscópica homogénea en las colonias y fermentadoras de lactosa. En la tinción de Gram se obtuvieron bacterias pleomórficas, presentándose como cocobacilos, bacilos solos, en diplobacilos o estreptobacilos, siendo bacilos largos, todos con gram negativo y la prueba de oxidasa mostró que carecen de la citocromo oxidasa (Mac Faddin, 1980). Se identificaron con más del 99% de similitud con respecto a los microorganismos de la base de datos del VITEK®, una cepa de *E. hormachei*, una de *E. cancerogenous* y 32 cepas de *E. cloacae*. Al sembrarlas en Agar Sangre de carnero desfibrilada al 5%, todas tuvieron un crecimiento verdoso por debajo del crecimiento colonial, debido a la destrucción parcial de la hemoglobina, identificándose como alfas hemolíticas (Mac Faddin, 1980). El 95.8% de las cepas fue

resistente a por lo menos uno de los antibióticos presentes en la tarjeta GNS-604 V4223, VITEK®. El 88% de las cepas fue resistente a 2 de los antibióticos: amoxicilina/ácido clavulónico (mezcla de betalactámico/inhibidor de betalactamasas) y cefazolina (cefalosporina). Es así que estas cepas sintetizan betalactamasas resistentes a inhibidores de las mismas, evitando que estos antibióticos inhiban la síntesis de su pared celular, sin embargo son sensibles a las quinolonas, las cuales afectan la síntesis de la subunidad ribosomal 30S (Gutiérrez, 2003). En el ensayo de adherencia en células HEp-2 se presentaron ocho tipos de formas de adherencia, 3 de los cuales son los descritos para *E. coli* (Cravioto, 1979) y los otros 5 son la combinación de estos 3. El 76% de las cepas mostraron algún tipo de adherencia, del cual el 21% fue el tipo difuso y el 12% inespecífico. Con estos resultados no es posible establecer un patrón específico de adherencia para una especie de *Enterobacter*. El 85% de las cepas producen una exotoxina que daña o modifica a las células VERO. De dicho porcentaje el 44% son cepas citotóxicas y el 41% son enterotóxicas. De las 34 cepas aisladas, únicamente la cepa 23 fue invasiva, con adherencia inespecífica, resistencia a betalactámicos y producción de enterotoxinas afectando a células VERO.

Al realizar la tipificación de la colección de cepas aisladas de *Enterobacter* por campos pulsados (PFGE), se determinó que no hay clonalidad entre ellas, independientemente de que se hayan aislado en tiempo y espacio similares; por lo tanto no son ecotipos y no hay relación que indique una fuente de contaminación específica durante el proceso de post-cosecha. Sin embargo existió relación entre los factores de virulencia estudiados y el lugar de aislamiento de las cepas, lo cual permite afirmar que el tratamiento hidrotérmico ayudó de alguna forma a disminuir la patogenicidad de las cepas aisladas y la cadena de control microbiológico continuó hasta el empaquetado.

Este proyecto contribuye a profundizar en el conocimiento de la ecología microbiana del mango y permitir que posteriormente se sugieran estrategias que aseguren la inocuidad del fruto, así como métodos adecuados para la detección de cepas del género *Enterobacter*.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han presentado problemas relacionados con la inocuidad de productos frescos que han afectado la exportación de ciertos productos mexicanos (Aruscavage, 2006). Siendo México el principal exportador de mango a nivel mundial (FAO, 2003), es esencial asegurar su calidad microbiológica para la seguridad del consumidor. La comprensión del origen de contaminación es necesaria para evaluar los riesgos a la salud, así como para determinar las acciones necesarias para resolver el problema. La utilidad de los microorganismos indicadores radica en determinar de una manera sencilla la posible presencia de patógenos que pudieran estar presentes en el alimento. Además puede mejorarse la utilidad de los microorganismos indicadores, como herramientas para evaluar riesgos, mediante el uso de técnicas de tipificación de microorganismos capaces de definir la fuente de contaminación (Harrigan, 1998). Se han propuesto métodos microbiológicos, fenotípicos y genotípicos capaces de detectar sutiles diferencias que pueden ser usadas para identificar el ambiente del que provenían. Dentro de una especie determinada, existen subgrupos más adaptados a un hospedero o ambiente por varias razones, como diferencias en el pH o disponibilidad de nutrimentos. Una vez que se adaptan a un ambiente particular, su progenie será idéntica genéticamente y producirá una huella genética idéntica entre ellos, pero diferente de la producida por organismos de la misma especie adaptados a un ambiente diferente. Estos se consideran como ecotipos (Riley, 2004).

El objetivo de este trabajo es tipificar las cepas del género *Enterobacter* aisladas del mango Ataulfo, para determinar sus posibles fuentes de contaminación y distinguir los posibles patógenos. Dentro de las técnicas de tipificación molecular se seleccionó la técnica de PFGE (electroforesis en gel con campos pulsados), mediante la cual se generan patrones de bandas o "huellas digitales" de cada cepa después del tratamiento del DNA cromosomal con una endonucleasa de corte raro (Gautom, 1997). Debido a su excelente reproducibilidad y poder discriminatorio, éste es el método de preferencia para realizar la tipificación epidemiológica de bacterias patógenas.

3. ANTECEDENTES

3.1 El mango.

Es conocido desde tiempos prehistóricos y cultivado hace más de 4000 años en la India. Es originario del noroeste de la India y norte de Burma en las laderas de los Himalayas y también de Ceilán. Se distribuye por todo el sureste de Asia y del Archipiélago Malayo desde épocas antiguas. El cultivo de mango es ancestral en la costa ecuatoriana, especialmente el ecotipo conocido como "mango de chupar", aunque hace unos quince años los empresarios ecuatorianos han incursionado en la siembra de mango de diferentes variedades para los mercados internacionales (Comisión Nacional Fruticultura, 1974).

El mango (*Mangifera indica* Linn.), es una fruta dicotiledónea de la familia *Anacardiaceae*. Tiene algunos parientes, como el marañón (*Anacardium occidentale* L.), el pistachero (*Pistacia vera* L.), los mombins (*Spondias spp.*) y la familiar hiedra venenosa o roble venenoso de Norteamérica (*Rhus toxicodendron* L, o *R.radicans* L.), entre otros. El género *Mangifera* comprende más o menos 50 especies nativas del sureste de Asia o las islas circundantes, excepto *M. africana* Oliver que se encuentra en África y sólo 3 ó 4 especies del género producen frutas comestibles (Mukherjee, 1997).

El mango típico se cultiva en climas tropicales y subtropicales, a altitudes menores de 600 metros; en un área de precipitación pluvial anual mayor a los 750mm³, tiene una estación seca de 4 a 5 meses entre noviembre y marzo. No tiene requerimientos especiales en relación al suelo. Es considerado una excelente fuente de vitaminas C, B1 y B2, provitamina A (Mukherjee, 1997), tiamina, riboflavina y minerales como el calcio, hierro, fósforo, además de carbohidratos y agua (León, 1982).

Es un importante fruto tropical, con alta producción y popularidad por su atractivo color, único sabor, apariencia y propiedades nutricionales. La fruta de mango que se utiliza para procesar se debe cosechar en estado de madurez fisiológica, es decir, cuando el fruto está totalmente maduro (Sassi, 2003), además debe tener su tamaño desarrollado y según la variedad, deben lucir un color amarillo o amarillo-rojo y alrededor de la semilla, tener una coloración amarilla. Los mangos deben cortarse del pedúnculo, de tal modo que no se desgarre la piel para que no haya

ninguna parte de la fruta expuesta al ambiente, porque esto puede producir descomposición de la misma, disminuyendo así su calidad. La pulpa de mango se obtiene al separar la pulpa, o parte carnosa del fruto, de la semilla y la cáscara.

3.2 Microbiota del mango

No se conoce mucho acerca de los microorganismos que se encuentran presentes en el mango, de manera natural. Existen algunos estudios que se enfocaron a la detección de la presencia de enterobacterias, como el de O'Connor *et.al.* (1995), quienes realizaron un estudio en muestras de mangos frescos, en puré y rebanados, el mayor porcentaje de los microorganismos cuantificados fue de coliformes (71%), predominando *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. En el estudio de Poubol e Izumi (2005), en mangos precortados se identificaron bacterias gram negativas y el 60% eran de la familia *Enterobacteriaceae*.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo tres estudios sobre la microbiota superficial del mango a partir de métodos tradicionales dependientes del cultivo de microorganismos, utilizando el sistema Vitek. En el primer trabajo de Sassi (2003) se encontró que en la superficie de mangos Manila, recolectados de diferentes regiones de México, estaban presentes las siguientes especies bacterianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus xylosum*, *Pantoea agglomerans* y *Corynebacterium xerosis*. En el segundo trabajo, en mangos Ataulfo se identificaron las siguientes especies: *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter aerogenus*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas stutzeri*. Y en el tercer trabajo, se identificó la presencia de *Enterobacter sp.*, *E. coli* y *Pseudomonas sp.* en mangos Ataulfo, provenientes de una empacadora de Nayarit (Pérez, 2007).

Con base a estos estudios, en los que se ha reportado la presencia de enterobacterias patógenas como indicadores de la seguridad microbiológica del producto, radica la importancia de detectar las fuentes de contaminación para posteriormente proponer medidas para evitarlas.

Aunque *Salmonella* y *E. coli* no forman parte de la microbiota natural en la superficie del mango, su presencia, ya sea en su superficie o en la pulpa (Acharya y Shan, 1999) es debida a la contaminación con tierra, agua, equipo, humanos, animales, empaque, transporte, distribución o en el destino final. Por otra parte se ha demostrado que estas bacterias poseen sistemas de sobrevivencia a la acidez inducidos por valores bajos de pH (aproximadamente 3.65) (Rozenberg-Arska, 1999). Penteado *et.al.* (2004) mostraron evidencia de que *Salmonella* puede internalizarse en mango durante la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos.

3.3 Situación actual del mango mexicano: económica e importancia microbiológica.

El mango es la variedad de fruto tropical dominante producida en todo el mundo; es reconocido en la actualidad como uno de los 3 ó 4 frutos tropicales más finos a nivel mundial. México es el principal exportador mundial de mango y el tercer país productor (FAO, 2003) con una producción anual de 2 334 763 toneladas (INEGI, 2009), cubriendo con esto una tercera parte de la producción total. Los principales destinos del mango son: Estados Unidos con el 44.6% de la producción, la Comunidad Europea con el 20.4% y RAE China de Hong Kong con el 3.9% (FAO, 2003). La producción nacional se concentra en los estados de Yucatán, Guerrero, Jalisco, Campeche, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Tabasco, Michoacán y Colima (SAGARPA, 2009).

Estados Unidos es el principal socio comercial de México y a quien envía la mayor parte de su producción de mango, por lo que es de suma importancia la inocuidad de este fruto. Desafortunadamente en los últimos años se han presentado problemas en dicho aspecto y no sólo con el mango sino también con otros productos frescos para exportación dentro de los cuales está el melón, lechuga iceberg, cebollín, zanahoria, fresas (Ackerman, 2002). En enero del 2000, las autoridades de Virginia, E.U.A., reportaron un brote epidemiológico debido al consumo de mangos provenientes de Brasil, la infección fue debida a *Salmonella enterica* serotipo Newport y tuvo como fuente de contaminación la etapa de enfriamiento, además de deficientes prácticas sanitarias de la empacadora (Slutsker L., *et.al.*, 1998).

En los últimos años el gobierno de Estados Unidos ha iniciado investigaciones para confirmar cuáles alimentos frescos exportados de México son causa de enfermedades gastrointestinales, por lo que es necesario garantizar la inocuidad en la industria agroalimentaria, independientemente del mercado al que sean destinados.

Algunos de los problemas relacionados con la inocuidad en el mango pueden asociarse directamente con los tratamientos térmicos poscosecha, comúnmente aplicados al fruto para extender la vida de anaquel. Estos tienen la finalidad de evitar la incidencia de plagas como la mosca de la fruta, enfermedades como la antracnosis y desordenes fisiológicos como daños por frío, y así mejorar la calidad del fruto. Sin embargo, dichos tratamientos pueden destruir o reducir la microbiota natural del mango y permitir la presencia de algún patógeno con un crecimiento no restringido o restringido en menor proporción.

Entre las poblaciones microbianas mixtas existen influencias entre las especies, que determinan cuales crecen, sobreviven o predominan (Atlas, 1993). Hay estudios que demuestran un equilibrio dinámico entre los microorganismos que se desarrollan en la superficie de los frutos y la reducción de la microbiota de competencia, debido a que en ciertos pasos del procesamiento, como en el lavado, se puede favorecer el desarrollo de patógenos (Rollán et.al. 1998).

3.4 Tratamientos post-cosecha.

Con la finalidad de extender la vida útil del mango y mejorar su calidad para el consumidor, es necesario utilizar métodos post-cosecha. Debido a que las principales causas de pérdidas post-cosecha del fruto son de orden fisiológico y patológico, para controlarlas se recurre a cuidadosas prácticas de manejo durante la cosecha y almacenamiento; sin embargo, no son suficientes para controlar el desarrollo de patógenos, por lo que se llevan a cabo tratamientos post-cosecha, tales como el tratamiento térmico, que se estableció en 1988 como método de cuarentena para países que pretendan comercializar como Estados Unidos. Todos los mangos de exportación deben recibir un tratamiento hidrotérmico con el fin de eliminar las larvas de la mosca de la fruta, así como mohos, pero este método puede ser fuente de contaminación de patógenos como *Salmonella* (Penteado et.al. 2004). Esto obliga

a buscar nuevos métodos, entre los que esta la irradiación con UV-C (190-280nm), que parece ser uno de los más prometedores, debido a su efecto germicida y a que se provoca una respuesta en los frutos con relación al fenómeno de resistencia contra patógenos. Se ha reportado que con la exposición a la radiación UV-C (254nm) se induce la biosíntesis de sustancias (principalmente fenoles) tóxicos para los patógenos, se acumulan compuestos antibacterianos como fitoalexinas (Erkan et.al. 2001) y se estimula la actividad de enzimas de la pared celular para reforzar la protección contra la invasión de patógenos, desafortunadamente este método además de eliminar algunas enterobacterias patógenas para humanos y para el fruto, podría afectar y cambiar importantemente la microbiota en la superficie del fruto, existiendo la posibilidad de destruir microorganismos capaces de combatir a las bacterias patógenas, cabe aclarar que es poca la información existente del uso de la radiación UV-C como método alternativo para el tratamiento del mango. Actualmente existe un gran interés por desarrollar tecnologías basadas en el uso de tratamientos físicos para procesos de post-cosecha del mango.

3.5 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 la causa de muerte en muchos casos. De 1995 a 1996, en América Latina el 2% de las enfermedades causadas por alimentos correspondió a enfermedades asociadas con frutas y vegetales frescos (U.S. Departamento of Health and Human Services, FDA, 1998). Pero éste es un problema que no sólo afecta a los países en desarrollo. En 1996 en el Reino Unido, el 3% de los casos informados fue provocado por enfermedades asociadas al consumo de frutas y verduras frescas. En 1985 en Francia, un muestreo en establecimientos comerciales que distribuían zanahorias demostró que el 7% de las mismas contenían *Yersinia enterocolítica* (Rivera, 2005). 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 (U.S. Departamento of Health and Human Services, FDA, 1998).

En la tabla 3.5.1 se muestran algunos patógenos causantes de brotes asociados a productos frescos o refrigerados (Castro-Rosas, 2005-A y 2005-B; Cruz, 2004; Rivera, 2005; Romero, 2003; Soriano, 2001).

Tabla 3.5.1 Patógenos asociados a brotes por productos frescos

PATÓGENO	PRODUCTO FRESCO
<i>Salmonella sp.</i>	Tomates, Sandía, Melón, Col, Lechuga, Cebolla.
<i>Escherichia coli 0157:H7</i>	Lechuga, Jugo de manzana no pasteurizado, Alfalfa.
<i>Escherichia coli Enterotoxigénica</i>	Zanahorias.
<i>Vibrio cholerae</i>	Leche de coco.

En la tabla 3.5.2 se muestran el número de casos de brotes de enfermedades transmitidas por productos frescos en Estados Unidos, los años en que se presentaron y los microorganismos involucrados (JIFSAN, 2009).

Tabla 3.5.2 Brotes de enfermedades asociadas al consumo de productos frescos en Estados Unidos

AÑO	No. DE ESTADOS	No. DE CASOS	MICROORGANISMO	PRODUCTO ASOCIADO
2001	6	Más de 40	<i>Salmonella</i>	Melón
2000	8	86	<i>Salmonella</i>	Tomates
1998	3	Más de 400	<i>Salmonella</i>	Perejil
1997	14	864	<i>Cyclospora</i>	Moras
1997	3	305	<i>Cyclospora</i>	Albahaca
1996	2	49	<i>E. coli 0157:H7</i>	Lechuga
1996	2	72	<i>Salmonella</i>	Chayotes
1996	20	1500	<i>Cyclospora</i>	Frambuesas
1993	3	84	<i>Salmonella</i>	Tomates
1991	23	400	<i>Salmonella</i>	Melón

3.6 Género *Enterobacter*

Son parte de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, algunos están encapsulados, son lisina + (excepto *E. cloacae*), ácido sulfhídrico -, indol -, rojo de metilo -, citrato +, descarboxilación de ornitina +, Voges-Proskauer +, crecimiento en presencia de KCN y con capacidad de fermentar la lactosa, generalmente móviles con flagelos peritricos, se encuentran en el intestino del hombre y animales, en suelo, agua y alimentos (Blanco, J., et.al. 2001).

El habitat de *Enterobacter* es el tracto intestinal de mamíferos, el suelo, el agua y alimentos (Murray P.R., et.al. 1999), por ejemplo *Enterobacter cloacae* A-11 se ha encontrado en semillas de pepino, de rábano, de soya, de girasol y de maíz dulce (Watanabe K., 2000).

3.7 Identificación de *Enterobacter sp.*

Puede haber confusión de *Enterobacter* con *Klebsiella* por estar estrechamente relacionados, mas se pueden distinguir por la prueba de motilidad, ya que *Klebsiella* es negativa (Arbeit 1995). Además *Enterobacter* puede descarboxilar ornitina, lo que no hace *Klebsiella*. *Enterobacter* tiene principalmente fimbrias y una forma bacilar delgada. También, generan gas a partir de glucosa, fermentan sacarosa, arabinosa, manitol, meliobiosa, rafinosa, ramnosa, trealosa y xilosa. La mayoría son DNAsa y fenilalanina desaminasa negativas. Para su identificación se realiza la prueba diferencial IMViC (indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, y citrato), a partir de colonias puras (Arbeit, 1995).

3.8 Patogénesis de *Enterobacter sp.*

Forman parte de los coliformes, que por ser habitantes del intestino y mostrar comportamiento similar al de las bacterias patógenas, se consideran como indicadores de contaminación fecal y su presencia indica la posible presencia de patógenos. Por otra parte, son patógenos oportunistas, ya que no causan problemas en individuos sanos, sino en aquellos que tienen un precario sistema inmune (inmunocomprometidos), especialmente que están hospitalizados y es difícil tener un control de infecciones sobre ellos, causando infecciones nosocomiales como meningitis, neumonía y septicemia. La vía urinaria y el tracto respiratorio son los sitios de infección más comunes (Gurtler ,J.B., et.al. 2004). En últimas fechas la especie *E. sakazakii* se ha implicado en casos de enfermedades graves transmitidas por alimentos, causando meningitis o enteritis, especialmente en neonatos e infantes, con tasas de mortalidad de entre 20% y 50%.

Algunos síntomas por infección a partir de *Enterobacter* incluyen bacteremia, leves infecciones en el tracto respiratorio, infecciones en la piel, infecciones leves en tejidos, infecciones en la vía urinaria, ITU, endocarditis, infecciones intra-

abdominales, artritis séptica, osteomielitis e infecciones oftalmológicas (Burchard K.W., et.al., 1986).

Dentro del género *Enterobacter* las principales especies causantes de infecciones en humanos son: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. sakazakii*. Otras especies son: *E. amnigenus*, *E. asburiae*; *E. cancerogenus*; *E. cowanii*; *E. dissolvens*; *E. gergoviae*; *E. hormaechei*; *E. intermedius*; *E. kobei*; *E. nimipressuralis*; *E. pyrinus*; *E. sakazakii* (Murray P.R., et.al. 1999).

Dos importantes especies de importancia clínica son *E. aerogenes* y *E. cloacae*, que no causan diarrea, pero están asociadas a infecciones de la vía urinaria y tracto respiratorio (John J.R. Jr, 1982). La sepsis producida por *E. cloacae* es grave y proporciona una tasa elevada de mortalidad (Watanabe K., 2000). La propagación de estos microorganismos se realiza a través de las manos del personal del hospital, de la administración de fluidos intravenosos contaminados y del material médico (Hoffmann y Roggenkamp, 2003).

3.9 Tratamiento de *Enterobacter sp.* con antibióticos

La mayoría de las cepas de *Enterobacter* son resistentes a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación (Chow J.W., et.al., 1991). Asimismo, son capaces de desarrollar resistencias, durante el tratamiento, a las cefalosporinas de tercera generación y a otros betalactámicos de amplio espectro, por la producción de una betalactamasa cromosómica inducible (Gouby A. et.al. 1994). Por lo tanto, en las infecciones por estos microorganismos es imprescindible el estudio de la sensibilidad antimicrobiana para seleccionar el fármaco más adecuado. La asociación de un antibiótico betalactámico con un aminoglicósido parece ser el tratamiento de elección en las infecciones más graves. Las fluoroquinolonas o el co-trimoxazol pueden constituir alternativas terapéuticas para cepas sensibles a estos antibióticos. Los carbapenemes son probablemente la elección para el tratamiento. La sensibilidad a la quinolona es variable y la resistencia puede desarrollarse durante el tratamiento, esto también puede ocurrir con carbapenemes. Algunos organismos son sensibles a co-trimoxazol (John J.R. Jr, 1982).

3.10 Métodos para la identificación de microorganismos

Los trabajos realizados por Carl R. Woese en los 70's, empleando la comparación de secuencias de la molécula de rRNA para estudiar la filogenia de los procariontes, promovieron el desarrollo de la taxonomía bacteriana y la filogenética de todos los seres vivos (Vanadame et.al. 1996). Actualmente se usa una combinación de las pruebas tradicionales y de técnicas de biología molecular como la PCR, permitiendo una identificación más precisa de los microorganismos y a la vez de un mejor conocimiento de las especies (Jones, et.al. 1997). El empleo de la información genotípica y fenotípica de forma aislada, ha generado en algunos casos resultados que difieren al momento de compararlos (Hames y Vogel, 1995). Hoy día, la taxonomía bacteriana emplea la información genotípica o la derivada de ácidos nucleicos y la fenotípica o la derivada de proteínas y sus funciones, así como también marcadores quimiotaxonómicos y un amplio rango de características expresadas (Vandamme et.al. 1996). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y las enzimas de restricción son muy usadas en los nuevos métodos de identificación de microorganismos.

3.11 Tipificación de microorganismos

La tipificación es un proceso para la caracterización de los microorganismos, ya sea en base de su fenotipo o genotipo, con el fin de diferenciar las cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. La esencia del uso de estos métodos es la de detectar diferencias entre cepas de la misma especie y agruparlas de acuerdo con esas diferencias. Cuando dos aislamientos estudiados dan resultados diferentes según uno o más métodos de tipificación, en general puede concluirse que derivan de diferentes líneas clonales. Para poder ubicar distintos aislamientos en una misma línea clonal se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación.

Los métodos de tipificación deben cumplir tres requisitos esenciales:

- 1) Poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado)
- 2) Poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados)

3) Reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes).

A la hora de evaluar un método de tipificación, además de considerar estos requisitos, se considera también la sencillez de realización y de interpretación de resultados.

3.12 Métodos fenotípicos

Se basan en la información derivada del fenotipo o características que expresa un organismo. Estos métodos constituyen la base de las descripciones formales taxonómicas desde familia, género, especie y subespecies. Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden su morfología, fisiología y bioquímica. Individualmente muchas de estas características han sido consideradas irrelevantes, pero consideradas en conjunto dan información descriptiva valiosa para reconocer los taxa.

Dentro de las técnicas fenotípicas se encuentra la tipificación por:

- **Crecimiento y características morfológicas**.- basadas en las propiedades de crecimiento en un medio sólido o líquido o al ser teñidas.
- **Características bioquímicas**.- basadas en la actividad metabólica de los organismos. Las cepas se identifican por una serie de pruebas bioquímicas y se clasifican en biotipos. El poder de discriminación de la biotipificación depende del número de pruebas bioquímicas aplicadas. La principal desventaja es que las pruebas bioquímicas son susceptibles a las condiciones de crecimiento, por ello la información que se genera muchas veces no es reproducible. Con el fin de disminuir costos y tiempo y aumentar la reproducibilidad se han introducido sistemas de huella digital fenotípica miniaturizados y automatizados reemplazando a los análisis fenotípicos clásicos. El procedimiento de estos sistemas incluye la comparación de un gran número de propiedades fenotípicas de un organismo con las mismas de otros considerados como referencia y el grado de similitud respecto a las cepas tipo es calculado con programas de cómputo. Los sistemas API (bioMérieux), Enterotubo II y Tubo Oxi-Ferm (Becton Dickinson Microbial Systems), Sistema Pasco MIC/ID (Difco Laboratories), Sistema Biolog (Biolog, Inc.), Sistema MicroID (General Diagnostic, Div., Warner Lambert

Co.), Sistema Vitek entre otros, son ejemplos de sistemas miniaturizados comercialmente válidos (Busse, et.al. 1996).

- **Características serológicas.-** basadas en las diferencias de los determinantes antigénicos de los organismos que pertenecen a la misma especie que son reconocidas por los anticuerpos de los mamíferos. Los determinantes antigénicos pueden ser proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos. La mayor limitante es que diferentes cepas de la misma especie o de diferentes especies pueden presentar reacciones cruzadas, lo que genera falsos positivos. Además algunas cepas no expresan antígenos en la superficie del organismo, por lo que no son serotificables. Los ensayos son sencillos pero a veces requieren muchos sueros para una bacteria, lo cual los vuelve costosos.
- **Características funcionales o fisiológicas.-** se basan en la diferencia de respuesta a manipulaciones específicas a las que son sometidas las células. Estas incluyen la diferencia de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos o a la lisis por bacteriófagos, la inhibición del crecimiento por bacteriocinas, la toxigenicidad y la expresión metabólica de enzimas.
- **Otros métodos de tipificación no basados en ácidos nucleicos.-** incluyen la tipificación basada en proteínas como la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto celular completo o de las proteínas de membrana; el análisis por cromatografía de líquidos o gases, de carbohidratos, ácidos grasos, lipopolisacáridos (Riley, 2004).

3.13 Métodos genotípicos

Se basan en la información derivada de los ácidos nucleicos, es decir en el análisis del contenido de ácidos nucleicos o en el polimorfismo de la secuencia de los genes entre las diferentes cepas. Estos permiten distinguir microorganismos a nivel de especie y de cepa (Figura 3.13.1). Idealmente, estas técnicas son universalmente aplicables, reproducibles, fáciles, altamente discriminatorias y han reemplazado en muchos laboratorios a las técnicas clásicas (Maslow, et.al. 1993a; Tenover et.al 1995). Una de sus ventajas es que son menos susceptibles a las condiciones de crecimiento de los microorganismos en estudio o a su manipulación en el

laboratorio. Por lo general se usan alguno de los siguientes procedimientos analíticos: pcr, hibridación, electroforesis en gel y secuenciación de ácidos nucleicos. La aplicación de técnicas moleculares permite detectar grupos filogenéticos con base en las secuencias de ADNr y en los genes. En el caso de los alimentos, las técnicas moleculares nos permiten tener datos confiables sobre la diversidad e identificación taxonómica de los microorganismos del alimento, datos cuantitativos que describan los cambios en la población microbiana durante la producción, el impacto de factores intrínsecos, extrínsecos sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad en los microorganismos, lo que a su vez permite el producir los alimentos en condiciones controladas y asegurar su calidad (Díaz y Wachter, 2003).

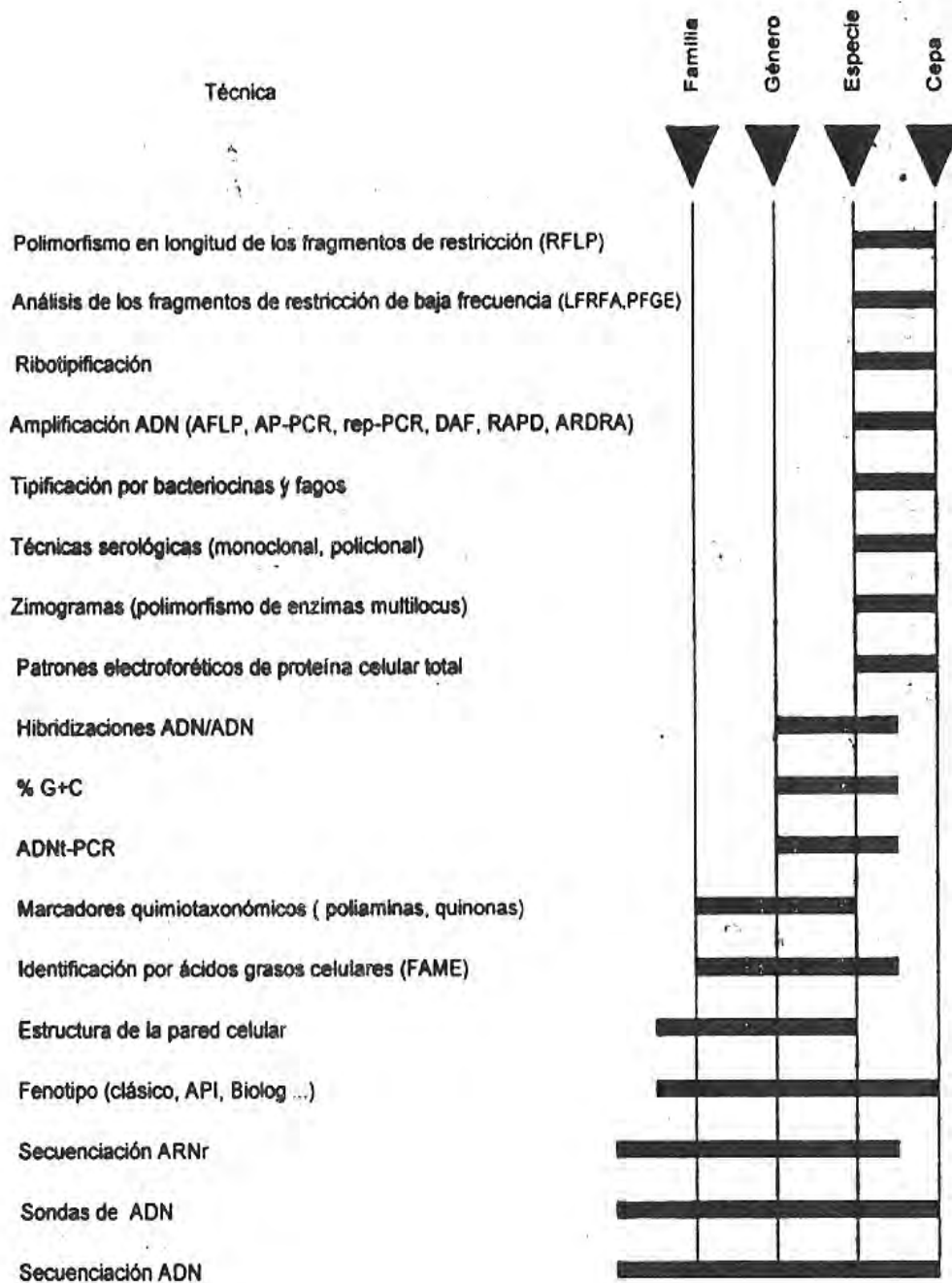


Figura 3.13.1 Resolución taxonómica de algunas de las técnicas más empleadas en la clasificación bacteriana (Vandamme, 1996)

Los sistemas de tipificación genotípica del ADN se dividen en los siguientes grupos:

- ❖ **Sistemas basados en elementos del DNA extracromosomal (plásmidos).** Se basan en las diferencias de peso molecular y número de los plásmidos que contiene una bacteria. Cada cepa puede representarse mediante un perfil o "huella digital" por el número y peso molecular de sus plásmidos. Una

limitante es depender de la presencia de al menos un plásmido, de hecho, el poder de discriminación depende del número de plásmidos que contenga una cepa. A pesar de que el número de plásmidos de una cepa tiende a ser constante, algunas cepas a veces los pierden durante un almacenamiento prolongado, lo cual afecta la reproducibilidad del método, sobretodo los plásmidos pueden adquirirse o perderse durante eventos de transferencia horizontal.

❖ **Sistemas basados en el genoma.** Se basan en características del genoma:

- ❖ ***Diferencias posibles en los sitios de reconocimiento para una endonucleasa entre dos o más alelos:*** El análisis de restricción por endonucleasas (RFLP o REA) consiste en la digestión del DNA genómico total extraído de una cepa por enzimas de restricción (endonucleasas), generándose fragmentos de DNA de diferente peso molecular. A la comparación de los fragmentos mediante una electroforesis en gel de agarosa, se le llama análisis de restricción por endonucleasas (REA) o bien, análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Las endonucleasas cortan al DNA en los sitios de reconocimiento, generando patrones de bandas muy complejos que no pueden ser interpretados fácilmente. Sin embargo, se desarrollaron ciertas técnicas para resolver este inconveniente: la ribotipificación, la hibridación por Southern Blot y el uso de endonucleasas de corte, con las que se obtienen fragmentos grandes de ADN, que luego pueden ser analizados en una electroforesis de campo pulsado (**PFGE**), facilitando de esta manera la interpretación de los patrones de bandas (Schneegurt, et.al., 1998).
- ❖ ***Diferencias o similitudes de las secuencias del genoma completo.*** Gracias a la automatización de la secuenciación del ADN se generó una nueva disciplina llamada "genómica comparativa", sus aplicaciones están en el campo de la taxonomía y la filogenética. Se puede aplicar a bacterias u otros organismos para los cuales más de una cepa ha sido secuenciada por completo.

❖ **Patrones de hibridación.** La hibridación de DNA-DNA provee un alto poder de resolución y cuando los resultados dan aproximadamente del 70% de relación DNA-DNA con 5°C o menos de diferencia a la temperatura de fusión, se considera que las cepas son de la misma especie (Temmerman, et.al. 2004). Las técnicas de sondeo están basadas en la hibridación de secuencias de oligonucleótidos específicas de ADN bacteriano diseñadas y sintetizadas; estas sondas unidas a marcadores radioactivos o fluorescentes permiten la detección visual del objetivo después de la hibridación bajo condiciones controladas. La especificidad de la sonda es altamente dependiente de la secuencia, a la vez la hibridación y las condiciones de lavado también son muy severas y críticas. La desventaja de los métodos basados en sondas es su alta carga de trabajo, además de que el uso de cebadores y de sondas restringe el número de aplicaciones posibles en las bacterias. La comparación de microarreglos se basa en los patrones de hibridación generados por miles de pequeñas piezas de DNA (sondas) cuya secuencia es conocida y que se encuentran acomodadas en una membrana de nitrocelulosa. Los microarreglos son usados para diferenciar cepas mediante la identificación de las variaciones genéticas de una sola base en un gen de interés, para la obtención de patrones de la expresión genética basados en la composición de mRNA y para el análisis de los patrones de hibridación total, ya sea genotípicos o de expresión (Riley, 2004).

❖ **Sistemas basados en ensayos de PCR.** En los cuales no se requiere una biblioteca de clonas y se parte del principio de la diversidad resultado de las secuencias amplificadas, tal diversidad se observa en la migración de las secuencias amplificadas en una electroforesis con geles de agarosa o de poliacrilamida y la migración depende del tamaño (ARDRA, t-RFLP, RAPD) y de los fragmentos generados.

3.14 Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción y electroforesis en geles de agarosa por campos pulsados (PFGE)

La tipificación molecular de microorganismos mediante PFGE tiene como objeto reconocer la relación existente entre los aislados y derivados recientes de un microorganismo. A la vez de diferenciar aislados no relacionados, independientemente de que pertenezcan a la misma especie microbiológica o taxón (Eisenstein B.I. 1989).

Esta técnica emplea campos de electroforesis alternados, es decir que cambian la orientación y/o polaridad del campo eléctrico a lo largo del recorrido, para permitir la separación de fragmentos largos de DNA cromosómicos (mayores de 20kb), obtenidos de la digestión con enzimas de restricción de corte raro. En cada modificación del campo eléctrico, el ADN deberá reorientarse en paralelo al nuevo campo de manera que cuanto mayor sea la molécula, mayor deberá ser el tiempo de reorientación (Figura 3.14.1). Esta electroforesis se realiza en geles de agarosa al 1% y separa moléculas de 20 Kb hasta 12 Mb (Gordillo, M.E., et.al., 1993).

Su procedimiento consta de varias fases:

1. Extracción del ADN cromosómico bacteriano.
2. Restricción del ADN, utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte.
3. Separación de los fragmentos obtenidos mediante PFGE (Hartstein A.I. et.al. 1995).

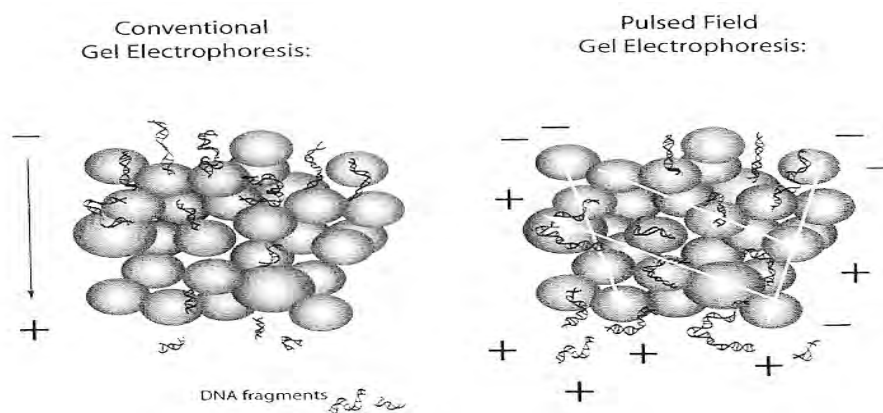


Figura 3.14.1 La electroforesis convencional y PFGE de fragmentos de ADN en geles de agarosa (Chu et.al. 1986).

Mediante este procedimiento se consigue dividir el cromosoma bacteriano (que contiene entre 2000 y 5000kb) en patrones sencillos (de 10-30 bandas de 10 a 800kb), lo cual facilita la comparación de unos aislados con otros, permitiendo establecer grados de similitud genética entre las bacterias estudiadas (Lipuma J.J., 1998).

La técnica de PFGE tiene un alto poder discriminativo para diferenciar de manera excelente subespecies de un número grande de microorganismos (McCartney, 2002), ya que es muy sensible a la microvariación existente entre las cepas. Es una de las técnicas más utilizadas, ya que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados, por ejemplo en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido.

El uso de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, (Tabla 3.14.1) es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentra raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión, permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30) (Hartstein A.I. et.al. 1995). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente como PFGE.

Tabla 3.14.1 Enzimas de restricción de corte raro. El sitio de corte es indicado en la secuencia de reconocimiento por una diagonal (Hartstein A.I. et.al. 1995).

Enzima	Secuencia de Reconocimiento	de
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	
<i>Asc</i> I	GG/CGCGCC	
<i>Fse</i> I	GGCCGG/CC	
<i>Srf</i> I	GCCC/GGGC	
<i>Bss</i> HII	G/CGCGC	
<i>Eag</i> I	C/GGCCG	
<i>Sac</i> II	CCGC/CC	
<i>Nae</i> I	GCC/GGC	
<i>Nar</i> I	GG/CGCC	
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	

En esta técnica, el procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también queda embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente (al pipetear o agitar) lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica, por otra parte es necesario utilizar enzimas de baja frecuencia de corte (Hartstein A.I. et.al. 1995).

Se han diseñado distintos tipos de aparatos con diferencias en la geometría de los electrodos o en la trayectoria migratoria del ADN. Todos los sistemas son capaces de separar un amplio rango de moléculas de ADN de diferentes tamaños (entre 1 y 7000 Kb), aunque difieren en la velocidad de separación y en la resolución obtenida en un rango de peso molecular dado. De todos los sistemas desarrollados, el más extendido y popular ha sido el CHEF (electroforesis en campo eléctrico con un contorno fijo y homogéneo). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal (Figura 3.14.2).

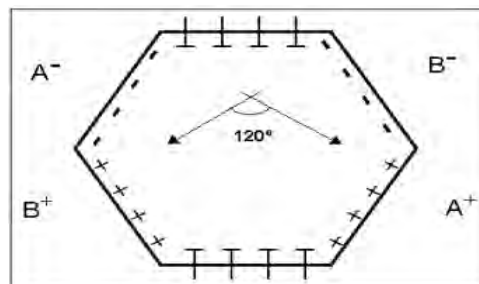


Figura 3.14.2 Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B (Chu et.al. 1986).

3.15 Variables que afectan la resolución de PFGE.

Los resultados de las técnicas de PFGE son muy sensibles a variaciones en prácticamente todos los parámetros electroforéticos. Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango de tamaño de las moléculas a separar y de la enzima de restricción seleccionada, pero también intervienen variables técnicas como la duración y alternancia de los pulsos eléctricos,

el voltaje, la temperatura de la cubeta, el tiempo de electroforesis, el amortiguador utilizado o el ángulo de reorientación (Finney, M.1993).

Pulsos, duración y alternancia. Los sistemas de PFGE consiguen separar fragmentos grandes de ADN al inducir la reorientación de las moléculas mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración de los campos eléctricos que se alternan determina el tamaño del ADN que puede separarse. Así pues, denominamos *pulso* al campo eléctrico alternante y su *duración* o *intervalo* hace referencia a cuánto tiempo está actuando en una dirección u otra. Los pulsos pueden durar fracciones de segundo, para separar moléculas de pocas kb, o pueden durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb. Puesto que nos referimos a la aplicación de PFGE en la tipificación bacteriana, el rango de peso molecular que interesa separar suele oscilar entre las 20 kb y las 600-800 kb, lo cual se consigue con tiempos que oscilan entre los 0,5 segundos y los 50-60 segundos. En general, cuanto mayor es la molécula de ADN, mayor tiempo de reorientación se requiere. Las moléculas pequeñas, que pueden reorientarse con rapidez invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel (Finney, M., 1993).

Voltaje. El gradiente de voltaje es la diferencia entre el potencial eléctrico de los electrodos, este valor representa la fuerza que conduce el ADN a través del gel. Por ejemplo, si la fuente de electroforesis genera un voltaje de 180 V a una cubeta en la que los electrodos están separados 30 cm, el gradiente de voltaje será de 6 V/cm. El tamaño del gel utilizado no modifica este parámetro, siempre que la distancia entre los electrodos o el voltaje aplicado no varíe. El uso de distintos voltajes afecta no sólo la distancia de migración sino también el rango de tamaños que pueden separarse. Así, para obtener una resolución comparable en los geles procesados a diferentes voltajes, debe modificarse no sólo el tiempo de electroforesis, sino los intervalos de pulsos para compensar las diferencias en la migración de ADN. Utilizar un voltaje inferior requiere intervalos de pulso más largos para obtener resultados similares. A voltajes bajos, las moléculas de ADN requieren más tiempo para reorientarse y avanzar tras la alternancia del pulso eléctrico (Finney, M.1993).

Temperatura de electroforesis. Como se ha mencionado previamente, la recirculación del amortiguador de electroforesis y el mantenimiento de una

temperatura constante son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles. Temperaturas entre 12°C y 15°C son las más habituales. A medida que la temperatura aumenta, el ADN avanza más rápido pero disminuye la resolución de las bandas en el gel. Por ejemplo, a 24°C el ADN avanza un 50% más rápido de lo que lo haría a 13°C, sin embargo la disminución en la calidad de los patrones de bandas no justifica la reducción del tiempo de electroforesis. Temperaturas más bajas, 8°C-10°C, pueden ser recomendables para microorganismos cuyo ADN se degrada con facilidad (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* o *Clostridium difficile*), de este modo se obtienen patrones con bandas mejor definidas, para compensar la lentitud de la electroforesis y deben modificarse otros parámetros como voltaje, duración de la electroforesis, etc (Finney, M.1993).

Tiempo de electroforesis. Debe intentarse mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del ADN, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel (Finney, M.1993). Para mejorar la resolución de una PFGE, deben intentar ajustarse otras variables, como el intervalo de los pulsos, aumentar el tiempo de electroforesis sólo aumentará el espacio entre las bandas que ya se hubieran separado, no ayudará a separar bandas que migran conjuntamente al inicio del gel (Swaminathan B., et.al., 2001).

La precisión en la determinación de los tamaños moleculares depende en gran medida de una buena resolución de los fragmentos de ADN. El tiempo y el voltaje aplicados así como los controles de peso molecular utilizados para realizar las curvas de calibración son factores determinantes. El tiempo depende del tamaño molecular de los fragmentos a separar; debe ser mayor cuanto mayor es el tamaño de los fragmentos. La aplicación de un bajo voltaje suelen determinar una mejor resolución. Los controles de peso molecular serán elegidos dependiendo del tipo de ADN y del tamaño que se quiere analizar. Cuando se desconozca el tamaño de los pesos moleculares objeto de estudio, será conveniente correr un gel inicial para aproximar el tamaño de los fragmentos o plásmidos a estudiar y por tanto los controles y las condiciones más adecuadas a utilizar (Gautom R.K. 1997).

Amortiguador de electroforesis. En general se recomienda el uso de TBE (0.5x). En el caso de necesitar separar moléculas de gran tamaño (>2 Mb), se recomienda utilizar TAE (x1), puesto que es más rápido al generar una corriente eléctrica más potente.

Ángulo de reorientación. Como se ha mencionado, por ángulo de reorientación, es el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. Para obtener una resolución adecuada por PFGE se requieren ángulos de reorientación de más de 90°. El estándar, cuando el sistema de PFGE tiene este parámetro fijo, es de 120°. Actualmente hay modelos que permiten modificar este ángulo, disminuyéndolo, lo cual es útil para separar moléculas de ADN de gran tamaño (> 2 Mb).

3.16 Criterios para la interpretación de resultados de PFGE

La comparación e interpretación de los patrones de restricción tiene un importante componente de subjetividad por parte del observador (Soll D.R., et.al., 2003). A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento (figura 3.16.1).

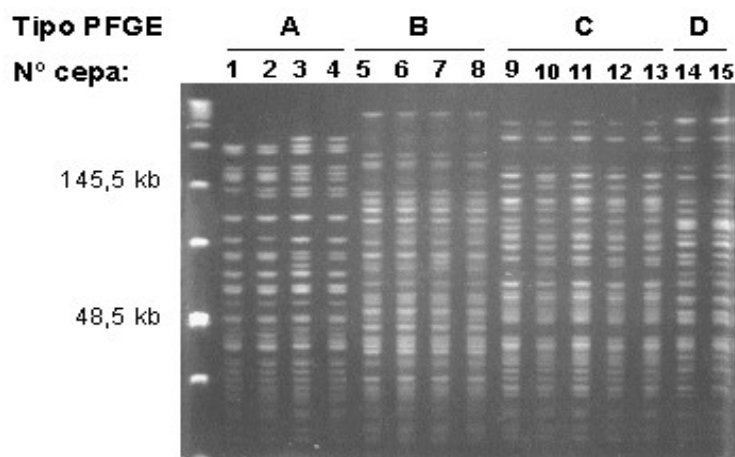


Figura 3.16.1 Electroforesis en campo pulsante del ADN cromosómico, tras la restricción con *SmaI*, de 15 cepas de *Acinetobacter baumannii*. Las cepas en las líneas 1 al 4 están genéticamente relacionadas y pertenecen al tipo clonal "A". Las cepas de los clones "B", "C" o "D" son idénticas entre ellas; (kb, kilobases) (Finney, M.1993).

Se pueden también analizar los patrones de PFGE mediante sistemas informáticos que determinan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una "distancia genética". En estos sistemas, se precisa captar la imagen del gel primero, normalizarlo e identificar las bandas que quieren ser incluidas en el análisis. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto (Soll D.R., et.al., 2003).

3.17 Inconvenientes de PFGE

Existen algunas especies bacterianas en las que la degradación del ADN cromosómico hace que muchas de sus cepas sean "no tipificables" por PFGE. Este es el caso de algunas subespecies de *Salmonella*, algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* o algunos patógenos entéricos de *E. coli*. Se han publicado algunas modificaciones para disminuir la degradación del ADN y mejorar la resolución de la electroforesis, como por ejemplo, añadir tio-urea al amortiguador de electroforesis o utilizar una formulación que contenga HEPES en lugar de Tris (en este caso es necesario reducir el voltaje a 4 V/cm). Asimismo, se han publicado procedimientos técnicos que permiten obtener resultados en 24-48 h, mejorando otro de los inconvenientes de la técnica (Soll D.R., et.al., 2003).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Tipificar mediante PFGE cepas del género *Enterobacter* aisladas de diferentes muestras ambientales y de la superficie del mango Ataulfo provenientes de la empacadora NATURAMEX SRL de CV del municipio de Tepic, en el estado de Nayarit, México, para definir si tienen un origen en común y evaluar su posible potencial patógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Realizar la recuperación de las cepas de *Enterobacter* aisladas durante estudios previos.
- ❖ Corroborar la identidad de los microorganismos mediante identificación por VITEK®.
- ❖ Evaluar el perfil de sensibilidad de las cepas de *Enterobacter* a diferentes antimicrobianos.
- ❖ Evaluar mediante ensayos *in Vitro* si las cepas de *Enterobacter* incluidas en el estudio presentan propiedades relacionadas con la virulencia (actividad hemolítica, adherencia, invasividad y toxinas).
- ❖ Estandarizar técnica y condiciones de PFGE para cepas de *Enterobacter*.
- ❖ Obtener la matriz de distancias de los patrones de bandas de fragmentos restringidos y construir el dendrograma genotípico, para:
 - Identificar las cepas representativas de cada grupo obtenido del dendrograma, mediante la comparación con el sistema VITEK®.

5. HIPÓTESIS

Si existe clonalidad entre las cepas de *Enterobacter* aisladas del mango y de las muestras ambientales durante su proceso post-cosecha al tipificar mediante PFGE, será posible determinar cual(es) de las etapas del tratamiento postcosecha constituyen las posibles fuentes de contaminación del fruto y distinguir cuales son

posiblemente patógenas por agrupación e identificación de sus propiedades de virulencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Material biológico

Se trabajó con una colección de 34 cepas aisladas de muestras ambientales y de la superficie de mangos de variedad Ataulfo con madurez pre-climatérica (tenían madurez fisiológica, pero no tenían las características físicas aceptadas para su consumo) durante diferentes etapas de su proceso de post-cosecha (Tabla 6.1.1), provenientes de la empacadora NATURAMEX SRL de CV del municipio de Tepic, en el estado de Nayarit, México.

El muestreo se realizó en el 2003 y del proceso se aislaron 34 cepas del género *Enterobacter*, tanto de la superficie del mango como del agua. Posteriormente se identificaron por el sistema VITEK® y se mantuvieron a temperatura ambiente en medio Dorset.

Tabla 6.1.1 Colección de cepas de *Enterobacter* aisladas de la superficie de mango y de su proceso de post-cosecha de la planta empacadora NATURAMEX SRL de CV.

CLAVE	LUGAR DE AISLAMIENTO
1	Mango empacado
2	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
3	Mango en la zona de tolvas
4	Agua de pozo
5	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
6	Mango en la zona de tolvas
7	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
8	Mango en la zona de tolvas
9	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
10	Mango en la zona de tolvas
11	Mango en la zona de tolvas
12	Mango después de lavado
13	Mango en la zona de tolvas
14	Mango en la zona de tolvas
15	Mango empacado
16	Mango en la zona de tolvas
17	Mango en la zona de tolvas
18	Mango en recepción
19	Mango en la zona de tolvas
20	Mango en recepción
21	Agua de pozo
22	Mango en la zona de tolvas
23	Mango después de lavado
24	Mango empacado
25	Mango en la zona de tolvas
26	Mango en la zona de tolvas
27	Mango después de lavado
28	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
29	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
30	Mango empacado
31	Agua hidrogenfriado
32	Agua hidrogenfriado
33	Mango después del tx. hidrotérmico e hidrogenfriado.
34	Agua hidrogenfriado

6.2 Comprobación de la pureza de las cepas

Para la comprobación de la pureza de las cepas aisladas del muestreo en el 2003 de la superficie del mango y de las etapas del proceso de post-cosecha del fruto, las cuales se mantenían en Medio Dorset (ver Apéndice), se sembraron en Agar Sangre (ver Apéndice), luego en Agar Mac Conkey (ver Apéndice). Y por último en Agar TSA (ver Apéndice) y a partir de esta resiembra se realizó la tinción de Gram y la prueba oxidasa, con el fin de verificar su pureza.

6.2.1 Tinción de Gram

Debido a que la morfología en la tinción de Gram puede cambiar con el tiempo y medio de cultivo, entre otros aspectos, se cuidaron estos parámetros, siendo para todas las cepas el medio de resiembra TSA (ver Apéndice) y el tiempo de incubación de 18-24 horas a 37°C. La tinción de Gram para las Enterobacterias es negativa y se realizó de acuerdo con la técnica de Harrigan y McCance (1998).

6.2.2 Prueba de Oxidasa

En esta prueba se utiliza una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovacs); este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. El método utilizado fue el indirecto sobre papel, para el cual se coloca un trozo de papel filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri, se agregan de 2 a 3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel, se extiende con el asa de siembra una colonia aislada de Agar TSA (ver Apéndice), sobre el papel impregnado y si la reacción es positiva se produce el color lavanda en un tiempo de 5 a 10 segundos. (Mac Faddin, 1980). El control positivo fue una cepa de *P. aeruginosa* y el control negativo una cepa de *E. coli*. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en el sistema VITEK®.

6.2.3 Identificación fenotípica de *Enterobacter* sp.

Se realizó por medio del Sistema Automatizado Vitek® (BioMerieux-Industry,USA), para lo cual se preparó una suspensión de cada una de las cepas de *Enterobacter* en un tubo de ensayo estéril, conteniendo 1.8mL de solución salina al 0.45%. Se ajustó la suspensión al tubo número 1 del nefelómetro de McFarland (3×10^8 células /mL), que corresponde a la región azul. Se extrajo la tarjeta GNI-240 V1316 (Identificación para Gram negativo) de la bolsa individual y se marcó el número de cepa en el lugar indicado de la tarjeta. Se llenó la tarjeta en el módulo del soporte de llenado, se selló y se colocó en el módulo lector/incubador y se siguió el procedimiento indicado en el manual Vitek® hasta obtener el reporte generado por el equipo Vitek® (BioMerieux-Industry,USA).

6.3 Evaluación de los factores de virulencia

6.3.1 Resistencia a antibióticos mediante el sistema VITEK®

La resistencia a los siguientes antibióticos se determinó empleando el sistema automatizado Vitek® (BioMerieux-Industry,USA): amikacina, amoxicilina/ácido clavulónico, cefazolina, cefepime, ceftazidime, ceftriaxona, cefuroxime de sodio, cefuroxime-axetil, ciprofloxacina, gentamicina, meropenem, nitrofurantoina, norfloxacina, ofloxacina, piperacilina, ticarcilina /ácido clavulónico, trimetoprima/sulfametoxazol.

Partiendo de colonias aisladas de un cultivo bacteriano en Agar TSA (ver Apéndice) con tiempo de incubación de 18h se realizó una suspensión bacteriana para cada una de las cepas, en un tubo de ensayo estéril, conteniendo 1.8mL de solución salina al 0.45%. Se ajustó la suspensión al tubo número 1 del nefelómetro de McFarland (3×10^8 células /mL), que corresponde a la región azul y posteriormente diluyendo 50µL de esta suspensión en otro tubo con 1.8ml de solución salina al 0.45%. Se extrajo la tarjeta GNS-604 V4223 (Susceptibilidad para Gram negativo) de la bolsa individual y se marcó el número de cepa en el lugar indicado de la tarjeta. Se llenó la tarjeta en el módulo del soporte de llenado, se selló y se colocó en el módulo lector/incubador y se siguió el procedimiento indicado en el manual Vitek® hasta obtener el reporte generado por el equipo Vitek® (BioMerieux-Industry,USA).

Para comprobar la resistencia de la cepa a gentamicina, en Agar sangre con 300µg/mL de gentamicina se crecieron las cepas, si a las 24h no se presenta crecimiento, se reporta como sensible

6.3.2 Actividad hemolítica

En placas de Agar Sangre se evaluó la capacidad de las cepas para inducir la hemólisis. La aparición de un halo transparente alrededor de la colonia indica la actividad β-hemolítica. En la figura 6.3.2.1 se muestran los 3 tipos de actividad hemolítica, debido a la presencia de hemolisinas que lisan a los eritrocitos. La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa en las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina); la hemólisis beta se presenta

como un halo de hemólisis completamente claro alrededor de las colonias debido al rompimiento total o lisis absoluta de los eritrocitos y la hemólisis gama se refiere a la ausencia de hemólisis y se observan colonias blancas y sin ningún halo.



Figura 6.3.2.1 Actividad hemolítica. *S. aureus* con hemólisis tipo β , *S. pyogenes* variante de hemolisina-deficiente, siendo α -hemolítica y *S. epidermidis* no hemolítica (Murray, 1999).

6.3.3 Adherencia a células HEp-2

La capacidad de adherencia de las cepas se analizó de acuerdo al procedimiento descrito por Cravioto (1979). Se utilizó la línea celular Hep-2 (células faríngeo cancerígenas).

Se requirió de un frasco de 250mL para cultivo celular con 20mL de medio MEM (ver Apéndice) y una monocapa de células HEp-2 al 100% de confluencia.

Para la preparación de las lentes de vidrio se cortaron cubreobjetos en forma de círculo de 1.5cm de diámetro para cada cepa y para el control celular. Posteriormente se sumergieron con hipoclorito de sodio al 0.5% por 2h con agitación lenta y se lavaron 10 veces con agua miliQ, después se sumergieron en ácido clorhídrico al 0.5% por 2h con agitación lenta y se lavaron 10 veces con agua miliQ y por último se sumergieron en agua miliQ por 1 día. Se separaron cada una de las lentes en gasa, envolviéndose y colocándose dentro de una caja petri para esterilizarse en autoclave (121°C or 15min).

Por otro lado, se sembró cada cepa en placas de Agar TSA y se incubaron a 37°C por 24h. Después se tomó una asada de las placas de Agar TSA y se inoculó un tubo con 3 mL de Caldo Triptona al 1% con D-manosa al 1% y se incubaron los tubos a 37°C por 18h.

Para la placa de 24 pozos de propileno, se colocaron las lentes esterilizadas en cada pozo de la placa de propileno con la ayuda de una pinza flameada.

El día del ensayo de adherencia, se desechó el medio MEM del frasco con células HEp-2 al 100% de confluencia y se le adicionó 1mL de tripsina para enjuagarlo y al

instante se le retiró. Nuevamente se adicionó 1mL de tripsina al frasco y se le dejó aproximadamente 1min, observándose la suspensión turbia, a causa del desprendimiento de la monocapa. Después se adicionaron 29mL de medio MEM y se tomó 1mL para cada uno de los pozos de la placa. Cada que se llenaban 6 pozos, se repipeteaba la suspensión de células, con el fin de tenerla homogénea. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y de humedad 85% durante 24h para obtener la monocapa al 90-95% de confluencia.

En condiciones de esterilidad se desechó con pipeta Pasteur el mL de medio MEM de cada uno de los pozos de la placa y se lavaron las células de los pozos con 1mL de PBS 1x (ver Apéndice), resuspendiendo 3 veces y desechando, luego se adicionó nuevamente 1mL de PBS 1x. Por otro lado, se centrifugó por 15min a 25000rpm los tubos inoculados de Caldo Triptona al 1% con D-manosa al 1%, se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1mL de PBS 1x y se vortexearon los tubos para disolver el pellet. Luego, en un tubo eppendorf estéril de 1mL se adicionaron 850µl de MEM sin suero, sin antibiótico y únicamente bicarbonato de sodio y glutamina al 1% (ver Apéndice), 100 µl de D-Manosa al 10% y 50µl de la suspensión bacteriana resuspendida en PBS 1x.

Se retiró el PBS 1x de los pozos de la placa de propileno y se agregó 1mL de la suspensión bacteriana preparada con el medio MEM y se incubó a 37°C durante 3h en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Pasadas las 3h y sin condiciones de esterilidad, se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS estéril, con la finalidad de quitar las bacterias no adheridas a las células. Sucesivamente se realizó el fijado con metanol concentrado (500µl) dejando 1min, posteriormente se adicionó 1ml de colorante Giemsa dejando teñir 20min y por último se lavó 3 veces con 1ml agua desionizada para eliminar el exceso de colorante y con el cuarto lavado se mantuvo mientras se deshidratava a las células, tomando con pinzas cada lenteja y pasando 30seg por cada una de las siguientes soluciones: acetona, acetona 50%-xileno 50% y xilol 100%. Inmediatamente se puso una gota de de bálsamo de Canadá sobre un portaobjeto y encima de ella se colocó la lenteja con la monocapa celular hacia arriba. Se dejaron secar las preparaciones a temperatura ambiente por 24h y una vez secas, se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión 100x (Leika DMLS conectado a una

cámara Leika DC 300) y se capturaron en el programa QWin versión 1, editando en el mismo programa. El ensayo se realizó 2 a 3 veces en diferente tiempo, teniendo al final de 2 a 4 preparaciones por cada cepa.

6.3.4 Invasividad a células HEp-2

Para evaluar la capacidad invasiva de las cepas de *Enterobacter* se siguió el procedimiento descrito por Cravioto (1979). Se utilizó la línea celular HEp-2 (células faríngeo cancerígenas).

La forma de preparación de las lentejas vidrio fue la descrita anteriormente en el ensayo de adherencia. Para la obtención de la suspensión bacteriana y la preparación de la placa de 24 pozos de propileno. Se requirió una monocapa de células entre 90 y 95% de confluencia.

En condiciones de esterilidad se desechó con pipeta pasteur el mL de medio MEM con suero y antibiótico (ver Apéndice) de cada uno de los pozos de la placa de propileno. Se lavaron las células de los pozos con 1mL de PBS 1x, resuspendiendo 3 veces y desechando. Se adicionó 1ml de PBS 1x. Por otra parte, el cultivo bacteriano se centrifugó 15min a 25000rpm, se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1mL de PBS 1x y se vortexearon los tubos para disolver el pellet. En un tubo eppendorf estéril de 1mL, se adicionaron 950µl de MEM sin suero, sin antibiótico y únicamente bicarbonato de sodio y glutamina al 1% (ver Apéndice), y 50µl de la suspensión bacteriana resuspendida en PBS 1x. Inmediatamente se retiró el PBS 1x de los pozos de la placa de propileno y se agregó 1mL de la suspensión bacteriana anterior, incubando la placa por 3h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y con humedad de 85%. Pasando las 3h, se lavó la placa con PBS 1x estéril, se adicionó a cada pozo 1mL de medio MEM sin suero, con gentamicina y con lisozima (ver Apéndice) y se incubó por 3h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y de humedad 85%, lavando después con PBS 1x estéril 3 veces. Sucesivamente se realizó el fijado de las células con 500µL de metanol concentrado durante un minuto y posteriormente se adicionó 1mL de colorante Giemsa, tiñendo por 20min y por último se lavó 3 veces con 1mL agua desionizada para eliminar el exceso de colorante y con el cuarto lavado se mantuvieron mientras se deshidrataban las células, tomando con pinzas cada lenteja y pasándolas por 30s en cada una de las siguientes soluciones: acetona, acetona

50%-xileno 50% y xilol 100%. Inmediatamente se puso una gota de de bálsamo de Canadá sobre un portaobjeto y encima de ella se colocó la lenteja con la monocapa celular hacia arriba. Se dejaron secar las preparaciones a temperatura ambiente por 24h y una vez secas, se observaron en el microscopio de luz con el objetivo de inmersión 100x (Leika DMLS conectado a una cámara Leika DC 300) y se capturaron en el programa QWin versión 1, editando en el mismo programa. El ensayo se realizó 2 a 3 veces en diferente tiempo, teniendo al final de 2 a 4 preparaciones por cada cepa.

6.3.5 Actividad tóxica de sobrenadantes de las cepas de *Enterobacter* en células VERO.

Se utilizó la línea celular de VERO (células de riñón de mono verde) y placas de propileno de 96 pozos.

Para la preparación de la placa y del cultivo bacteriano se resuspendió la monocapa con 100% de confluencia de células VERO de un frasco de 250mL en 10mL de medio MEM con suero y con antibiótico (ver Apéndice) y enseguida se suspendieron 100µL de la suspensión de células en cada pozo; cada 6 pozos de la placa llenados, se repipeteaba la suspensión con el fin de homogenizar. La placa se incubó por 18h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y de humedad al 85%.

Por otro parte, se sembró cada cepa en tubos con 3ml de Caldo Luria y se incubaron a 37°C por 12h. Posteriormente se hizo una dilución 1:100 de la suspensión bacteriana: 300µl de cultivo en Caldo Luria y 2700µl de MEM sin suero y sin antibiótico (ver Apéndice) y se incubaron los tubos a 37°C por 3h. Pasado este tiempo, se centrifugó a 12500rpm por 15min, se filtró con jeringa de 3ml y portafiltro con membrana de 0.22 micras, conservando el sobrenadante en un tubo de 13 x 100 mm estéril.

Se lavó la placa de 96 pozos con PBS 1x (ver Apéndice) y se adicionaron 100µL del sobrenadante filtrado anteriormente y 100µL de MEM 2x sin suero y sin antibiótico (ver Apéndice). Se hicieron 2 diluciones doble seriadas (1:2,1:4 y 1:8) por cada cepa, quedando en cada pozo un volumen final de 200µL (100µL de sobrenadante filtrado y 100µL de MEM 2x sin suero y sin antibiótico). De manera que, se tuvieron 3 pozos por cada cepa. La placa de 96 pozos se incubó por 12h a 37°C en atmósfera

de CO₂ al 5% y de humedad al 85%. Pasado este tiempo, se lavó 3 veces con PBS 1x, se fijaron las células con metanol durante 5min, se tiñeron con colorante Giemsa por 20min y se lavaron por lo menos 4 veces con agua desionizada. Se dejó secar a temperatura ambiente durante un día y luego se observó al microscopio inverso con objetivo de 20x, fotografiando sobre el mismo.

6.4 Tipificación de cepas de *Enterobacter* por PFGE (Protocolo de Pouch D. F. e Ito K. 2001)

Para la tipificación de las cepas de *Enterobacter* por la técnica molecular: PFGE o Electroforesis en Geles de Agarosa por Campos Pulsados. Se sembró a las cepas en Agar TSA (ver Apéndice) y se incubaron las placas por 18h a 37°C. Para la preparación del inóculo se seleccionaron de 3 a 5 colonias de un cultivo puro de cada cepa, se inocularon tubos con 5 mL de Caldo Soya Trypticase y se incubaron a 37°C a una agitación de 120 rpm durante toda la noche (12h), con el fin de obtener un cultivo joven de bacterias. Se estandarizó la concentración del inóculo de las cepas a 1×10^8 UFC, lo que corresponde a una D.O. entre 1.3 a 1.4 o el tubo número 5 de la escala de McFarland. Para la preparación de los bloques de agarosa de bajo punto de fusión y lisis celular, se transfirieron 150µL del cultivo bacteriano a un microtubo estéril de 1.5mL y se centrifugó a 12000rpm por 2 min, eliminando el sobrenadante. Posteriormente se lavó 3 veces el precipitado celular con 500µL de amortiguador PIV (ver Apéndice) y se centrifugó a 12000rpm por 2 min, eliminando en cada lavado el sobrenadante. Se verificó que el paquete celular fuera de aproximadamente de 2mm de diámetro y se adicionaron 150µL de amortiguador PIV y se agitó en vortex para disolver el pellet; se incubó a 50°C por 5min. Se prepararon 20 mL de agarosa de bajo punto de fusión (LMP-Promega) al 2% en amortiguador PIV, manteniendo el tubo eppendorf a 45°C en baño maría. Se agregaron 150µL de dicha agarosa al tubo y se mezcló tres veces con la micropipeta. Se tomaron 100µL y se depositaron en cada uno de moldes de bloques a preparar, haciendo duplicado por cada uno de los tubos. Se refrigeraron a 4 °C por 15 min, para así lograr la solidificación del bloque. Se removieron los bloques (el par o duplicado), colocándolos en un tubo con 1 mL de amortiguador de lisis (ver Apéndice) y se incubó durante 24h a 37°C a una agitación de 120 rpm. Para la

desproteización, se removió el amortiguador de lisis con una pipeta de plástico evitando de ésta manera dañar al bloque; se lavó con 1mL de amortiguador TE 1x (ver Apéndice) y se adicionó 1mL de amortiguador de desproteización o ESP (ver Apéndice), dejando incubar durante 24h a 37°C a una agitación de 120 rpm. Luego se retiró el amortiguador ESP y se lavaron los bloques con 1 mL de amortiguador TE 1x, manteniendo los bloques en dicho amortiguador por un tiempo de 30min a 37°C, la operación de lavado se repitió 4 veces o más según se requirió, ya que el bloque de agarosa debía observarse translúcido. Para la restricción enzimática se cortó a la mitad uno de los bloques y se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5mL. Para la reacción de restricción del ADN cromosomal de las cepas aisladas se utilizaron los reactivos en las concentraciones indicadas en la tabla 6.4.1

Tabla 6.4.1 Mezcla de reacción de restricción del ADN cromosomal

REACTIVOS	VOLUMEN
Agua desionizada estéril	175.5µl
Amortiguador Tango 10x	20µl
Enzima <i>Xba I</i> (10U/ µl)	2.5µl (30U)
Total	200µl

Los 200 µL de la solución de restricción enzimática con *XbaI*, cuyo sitio de corte es 5'...T/CTAGA...3', se agregaron al bloque de agarosa y se dejó incubar a 37°C durante 24h.

Una vez restringido el ADN se retiró la solución de restricción enzimática y se agregó 1mL de amortiguador TE 1x y se incubó el bloque de agarosa a temperatura ambiente por lo menos 2h y hasta el día del corrimiento electroforético, para lo cual se lavó la cámara de PFGE con agua desionizada estéril; se preparó el gel de agarosa grado PFGE al 1% con amortiguador TBE 0.5x (ver Apéndice), se agregaron 3.5 L del amortiguador TBE 0.5x a la cámara de PFGE y se encendió el modulo de enfriamiento con recirculación. Se cortó a la mitad el bloque, se cargó en gel de agarosa grado PFGE al 1% y se selló con agarosa de bajo punto de fusión; se cargó el marcador de peso molecular y se montó el gel en la cámara de PFGE iniciando el corrimiento a las siguientes condiciones:

Rango de pulsos 5s (inicial) y 50s (final), tiempo de corrida 20h, 200 volts(6V/cm), temperatura de 14°C, amortiguador TBE 0.5X, utilizando el equipo CHEF-DRII (Bio-

Rad). Para teñir el gel, se utilizó bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 30min, lavándose posteriormente 2 veces por 30min con 500mL de agua Milli Q (agua grado biología molecular). Las imágenes se digitalizaron con el equipo Fluor-S (FS Multimager, Bio-Rad, USA). Una vez que se obtuvieron todas las imágenes se procedió a obtener una matriz a partir de los patrones de bandeo y considerando la presencia/ausencia de todas y cada una de las bandas obtenidas de cada cepa. La matriz de bandas obtenida se utilizó en el programa computacional Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994) para elaborar el dendrograma genotípico de la colección de cepas de *Enterobacter* aisladas del mango y del agua en el proceso de post-cosecha de éste fruto. En el programa Treecon for Windows se seleccionó como modelo matemático el de Nei y Li (1979) para la distancia entre cepas, el método de UPMGA para el agrupamiento y un bootstrap de 1000.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Comprobación de la pureza de las cepas identificadas como Enterobacter

La morfología macroscópica presentada por las cepas en agar sangre y agar McConkey fue homogénea en las colonias de cada una de las cepas. Por otra parte la tinción de Gram mostró la pureza de las colonias en cada cepa. Las bacterias aisladas son pleomórficas, ya que pueden presentarse como bacilos cortos de punta redonda, uniéndose entre dos o más bacterias o presentándose solos; también hay cepas de bacilos cortos y delgados, solos o en cadenas. La siembra en agar McConkey además mostró que las cepas son fermentadoras de la lactosa. En la figura 6.1.1, se muestra la morfología macroscópica de las cepas en McConkey a las 24h de incubación a 37°C, observándose que todas tienen un borde entero y el 74% son de superficie convexa. Todas son fermentadoras de la lactosa, aunque a las 24 h el 62% tiene un color rosa intenso y homogéneo, en el 38% restante había una mezcla de colonias amarillas y rosas, siendo hasta las 48h cuando todas se tornaron completamente rosas. El tiempo que tardan las cepas en fermentar la lactosa depende de cada cepa indicando así que los microorganismos que la fermentaron a las 24 horas poseen 2 enzimas (α -galactósido permeada) y aquellas cepas que lo hicieron hasta las 48h fueron consideradas fermentadoras lentas de la lactosa y son deficientes en α -galactósido permeasa pero no de α -D-galactosidasa (Eisenstein y Zaleznik, 2000).

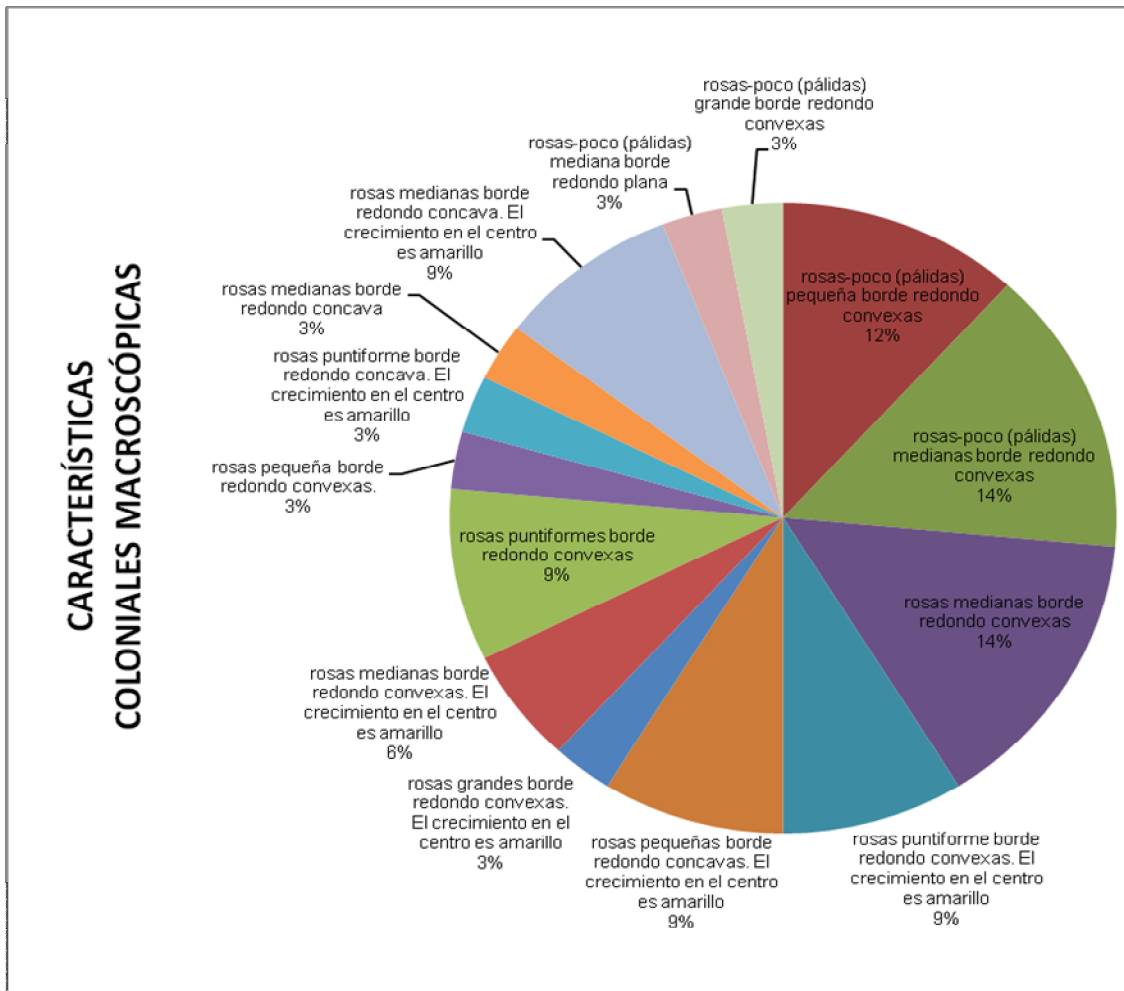


Figura 7.1.1 Características de las cepas puras de *Enterobacter* sp. aisladas de mango Ataulfo a las 24h de incubación en Agar MacConkey.

El 97% de las cepas se identificaron con más del 95% de similitud con respecto a los microorganismos de la base de datos del sistema automatizado VITEK® (BioMerieux-Industry,USA), siendo alta la probabilidad de ser la especie descrita por dicho método, sobre todo aquellas cepas que tuvieron un 99% de similitud, que fueron el 94% del total de las cepas en estudio. La cepa 34 tuvo un 70% de similitud respecto a los microorganismos de la base de datos del VITEK® (BioMerieux-Industry,USA), es decir, fue la única con menos del 95% de similitud. Es recomendable utilizar métodos genotípicos como fenotípicos para identificar microorganismos.

En todas las cepas coincidió el resultado de oxidasa negativa del Vitek, con la prueba del reactivo, lo cual es característico en todos los géneros de la familia Enterobacteriaceae, pues carecen de la citocromo c oxidasa.

En la tabla 7.1.1 se muestran los resultados obtenidos de la identificación con el sistema VITEK® (BioMerieux-Industry,USA).

Tabla 7.1.1 Identificación de cepas del género Enterobacter por medio del sistema VITEK®

CEPA	CLAVES VITEK	VITEK	CEPA	CLAVES VITEK	VITEK
1	150001	<i>E. cloacae</i>	18	150034	<i>E. cloacae</i>
2	150005	<i>E. cloacae</i>	19	1500351	<i>E. cloacae</i>
3	150007	<i>E. cloacae</i>	20	1500352	<i>E. cloacae</i>
4	1500121	<i>E. cloacae</i>	21	1500353	<i>E. cloacae</i>
5	1500122	<i>E. cloacae</i>	22	109311	<i>E. cloacae</i>
6	1500123	<i>E. cloacae</i>	23	109313	<i>E. cloacae</i>
7	150013	<i>E. cloacae</i>	24	109316	<i>E. cloacae</i>
8	1500191	<i>E. cloacae</i>	25	109319	<i>E. cloacae</i>
9	1500192	<i>E. cloacae</i>	26	109335	<i>E. cancerogenous</i>
10	1500193	<i>E. cloacae</i>	27	109336	<i>E. cloacae</i>
11	150020	<i>E. cloacae</i>	28	109342	<i>E. cloacae</i>
12	150021	<i>E. cloacae</i>	29	1093421	<i>E. cloacae</i>
13	150022	<i>E. cloacae</i>	30	109351	<i>E. cloacae</i>
14	150023	<i>E. cloacae</i>	31	109353	<i>E. cloacae</i>
15	150025	<i>E. cloacae</i>	32	109353	<i>E. cloacae</i>
16	150028	<i>E. cloacae</i>	33	109355	<i>E. cloacae</i>
17	150031	<i>E. hormachei</i>	34	1093631	<i>E. hormachei</i>

7.2 Evaluación de los factores de virulencia

7.2.1 Resistencia a antibióticos mediante el sistema VITEK®

Todas las cepas, a excepción de la 26, mostraron resistencia a alguno de los antibióticos probados en el VITEK®: amikacina, amoxicilina/ ácido clavulónico, cefazolina, cefepime, ceftazidime, ceftriaxona, cefuroxime, ciprofloxacina, gentamicina, meropenem, nitrofurantoina, norfloxacin, ofloxacin, piperacilina, tricarcilina/ácido clavulónico, trimetoprima/sulfametoxazol.

El 97% de las cepas presentó resistencia a por lo menos uno de los antibióticos presentes en la tarjeta GNS-604 V4223-VITEK®. El 88% del total de las cepas fue resistente a dos de los antibióticos: amoxicilina/ácido clavulónico y cefazolina, los cuales son de distinto grupo. El primero de ellos es una mezcla de un betalactámico y de un inhibidor de betalactamasas y el segundo es del grupo de las cefalosporinas. El 21% del total de las cepas fue resistente a cefuroxime de sodio que es del grupo

de las cefalosporinas y 32% a cefuroxime de axetil que también es una cefalosporina, y por último el 12% de las cepas fueron resistentes a nitrofurantoina, que es un antibiótico del grupo de los nitrofuranos. (Figura 7.2.1.1 y Figura 7.2.1.2). Los porcentajes anteriores indican el potencial de resistencia que muestran estas cepas a betalactámicos/inhibidor betalactamasas y a las cefalosporinas, lo cual sugiere el que estos fármacos no se usen en el caso de infección, sino más bien el uso de quinolonas (norfloxacina y ofloxacina) por ser sensibles todas estas cepas a los antibióticos de este grupo.

Es muy probable que la resistencia que presentan las cepas aisladas a los betalactámicos sea debida a la transferencia de genes de hongos de vida libre que forman parte de la microbiota natural del mango. Tal transferencia de información genética, dada ya sea, por cualquiera de los mecanismos que hasta hoy día se conocen (conjugación, transducción o transformación) ha permitido que las cepas en estudio sean resistentes a betalactámicos, posiblemente por la adquisición de un gen que sintetiza betalactamasas; u otra posible opción es que sea la síntesis de betalactamasas una característica propia de la cepa. Estas cepas sintetizan betalactamasas resistentes a inhibidores de las mismas como el ácido clavulánico, lo cual también las hace resistentes a betalactámicos y a cefalosporinas, evitando que estos antibióticos inhiban la síntesis de su pared celular.

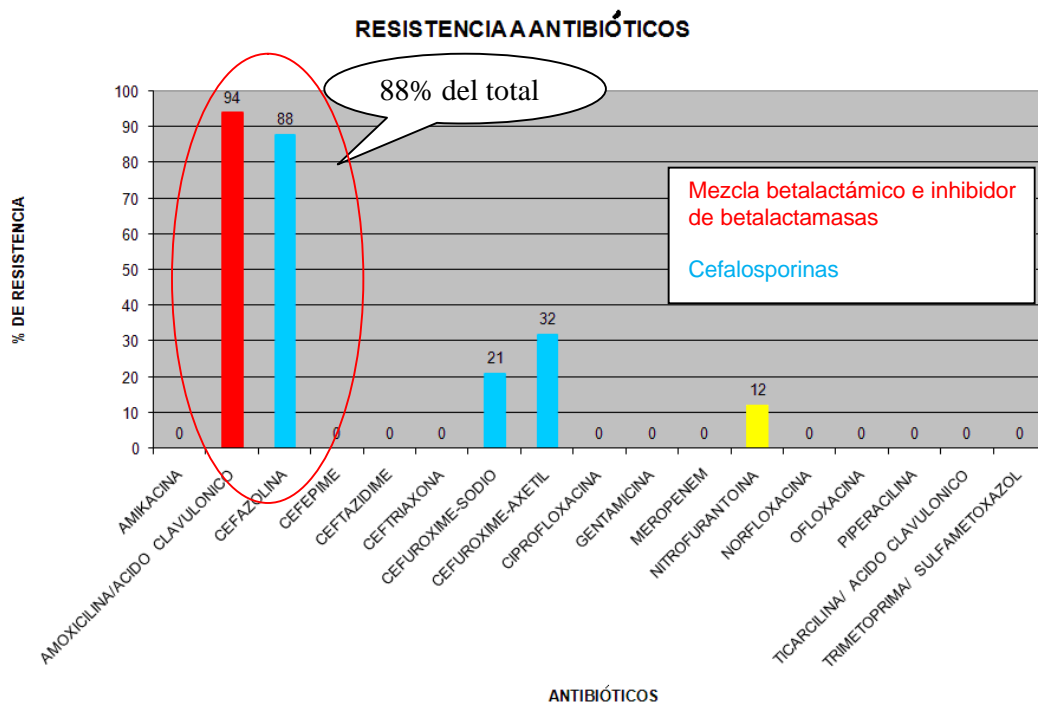


Figura 7.2.1.1 Resistencia a antibióticos determinada mediante el sistema VITEK®, tarjeta GNS-604 V4223. (BioMerieux-Industry,USA)

PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS



Figura 7.2.1.2 Porcentaje de resistencia a uno o más de los antibióticos determinado mediante el sistema VITEK®, tarjeta GNS-604 V4223. (BioMerieux-Industry,USA).

7.2.2 Actividad hemolítica

Al sembrar las cepas en Agar Sangre de carnero desfibrilada al 5%, todas presentaron un crecimiento verdoso y por debajo del crecimiento colonial. En el Agar Sangre se observó la destrucción parcial de los eritrocitos, identificándose todas las cepas como alfa hemolíticas.

7.2.3 Adherencia a células HEp-2

En *E. coli* se han descrito tres patrones de adherencia tanto *in vivo* como *in vitro*: adherencia difusa, la cual se caracteriza por estar las bacterias pegadas de manera desordenada sobre la superficie de las células; adherencia localizada se caracteriza por la formación de microcolonias en un polo de la membrana celular, y una tercera que es la adherencia agregativa en la cual las bacterias presentan un arreglo formando cadenas, de forma parecida a ladrillos apilados, tanto en la superficie de la preparación como en la membrana de la célula (Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, y B. Rowe. 1979). Para dichos patrones de adherencia se utilizaron como controles positivos de adherencia difusa, localizada y agregativa: 52MCI (091:H6), E2348/69 (0127:H6) y 042 (044:H18) de *E. coli*, respectivamente y como controles negativos se consideró la placa del ensayo de adherencia pero sin cepa. (Fig. 6.2.3.1). Se trabajó con la línea celular de HEp-2 (derivadas de carcinoma laríngeo humano).

Además en la figura 7.2.3.2 se muestra otro patrón de adherencia que se presentó en las cepas bajo estudio, y al que describimos como adherencia inespecífica, que se refiere a una adherencia al cristal de la preparación, posiblemente por interacciones hidrofóbicas con fuerzas de Van der Waals o por tener la capacidad de formar biopelículas.

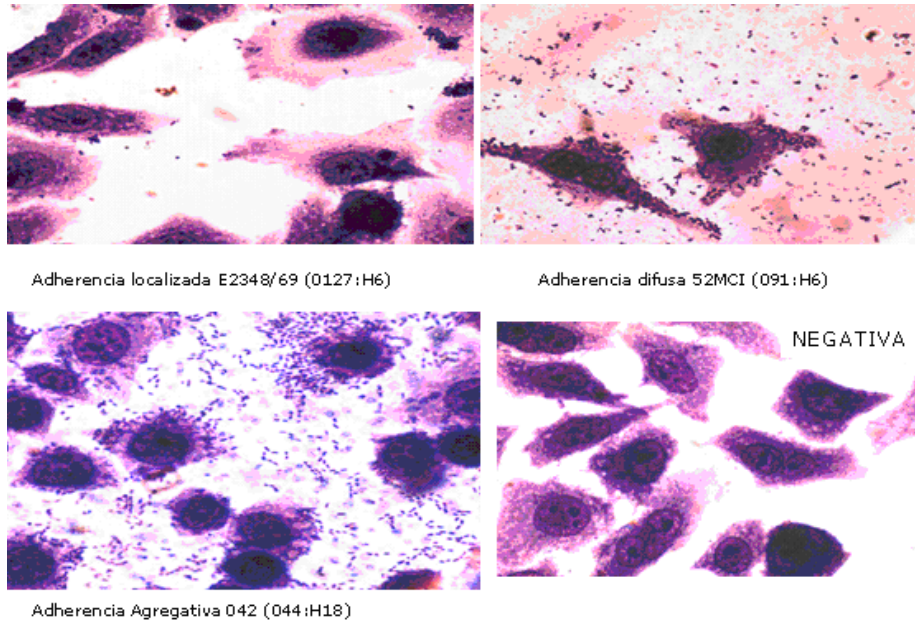


Figura 7.2.3.1 Cepas de E. coli usadas como controles positivos en el ensayo de adherencia. (Microscopía óptica en inmersión 100X).

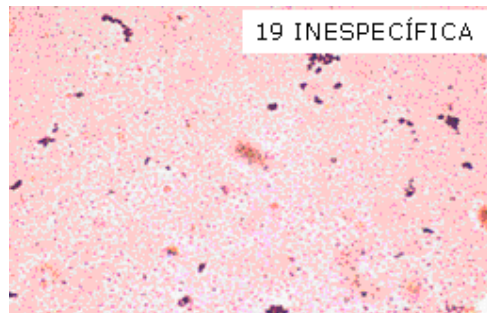


Figura 7.2.3.2 Patrón de adherencia presente en las cepas de Enterobacter aisladas del mango Ataulfo (Microscopía óptica en inmersión 100X).

En la tabla 7.2.3.1 se muestran los resultados de adherencia obtenidos para cada una de las cepas aisladas del mango Ataulfo y se observa que se presentan ocho tipos de patrones de adherencia, tres de los cuales son los descritos para E. coli y los otros cinco son la combinación de estos tres.

Tabla 7.2.3.1 Ensayo de adherencia en células HEp-2 de las cepas aisladas de mango Ataulfo

CLAVE	VITEK	ADHERENCIA	DESTRUCCIÓN CELULAR
1	E. cloacae	NEGATIVA	NO
2	E. cloacae	INESPECÍFICA	SI
3	E. cloacae	DIFUSA	SI
4	E. cloacae	AGREGATIVA	SI
5	E. cloacae	DIFUSA	NO
6	E. cloacae	DIFUSA	SI
7	E. cloacae	INESPECÍFICA	SI
8	E. cloacae	AGREGATIVA	NO
9	E. cloacae	NEGATIVA	NO
10	E. cloacae	AGREG-LOC-DIFUSA	SI
11	E. cloacae	DIFUSA-LOCALIZADA	SI
12	E. cloacae	AGREGATIVA	NO
13	E. cloacae	AGREGATIVA	SI
14	E. cloacae	DIFUSA	SI
15	E. cloacae	INESPECÍFICA	SI
16	E. cloacae	DIFUSA	SI
17	E. hormachei	AGREGATIVA	NO
18	E. cloacae	AGREGATIVA-DIFUSA	SI
19	E. cloacae	DIF-LOC	SI
20	E. cloacae	AGREGATIVA-DIF-LOCA	SI
21	E. cloacae	DIFUSA	SI
22	E. cloacae	AGRE-DIF-LOC	SI
23	E. cloacae	INESPECÍFICA	SI
24	E. cloacae	NEGATIVA	SI
25	E. cloacae	AGRE-LOC-DIF	SI
26	E. cancerogenous	AGREGATIVA-DIFUSA	SI
27	E. cloacae	LOC-AGREG	SI
28	E. cloacae	LOCALIZADA	SI
29	E. cloacae	NEGATIVA	NO
30	E. cloacae	NEGATIVA	NO
31	E. cloacae	NEGATIVA	NO
32	E. cloacae	NEGATIVA	NO
33	E. cloacae	DIFUSA	SI
34	E. cloacae	NEGATIVA	NO

El 76% de las cepas mostraron adherencia de algún tipo en las células HEp-2: el 21% de las cepas mostraron el patrón difuso, siendo además el patrón predominante y siguiéndole el agregativo con el 15% y posteriormente un patrón de combinación: localizada-agregativa-difusa (12%) y el patrón de adherencia inespecífica también con un 12%.

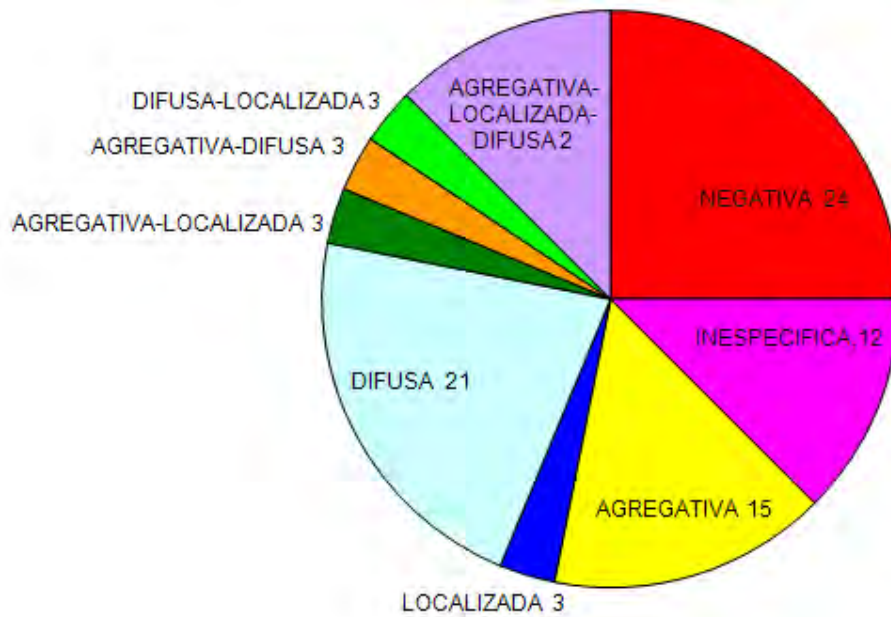


Figura 7.2.3.3 Porcentaje de cepas con adherencia a las células HEp-2.

Es importante hacer notar que cuando se presentó el patrón de adherencia: difusa, difusa-localizada y difusa-agregativa-localizada, siempre se detectó un daño a la célula, lo cual podría sugerir que el patrón difuso está vinculado con el daño celular. El 68% del total de las cepas dañaron a las células HEp-2 durante el ensayo de adherencia.

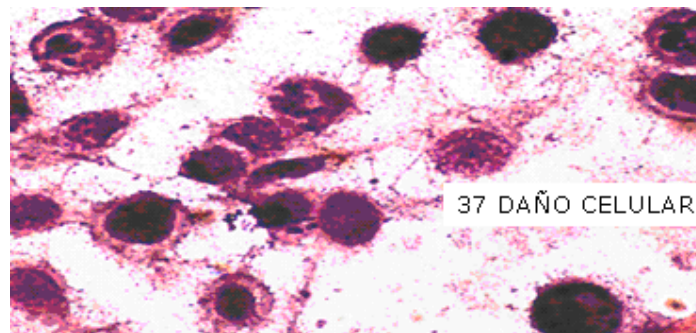


Figura 7.2.3.2 Daño celular presente en cepas de Enterobacter aisladas del mango Ataulfo y que presentaron adherencia difusa (Microscopía óptica en inmersión 100X).

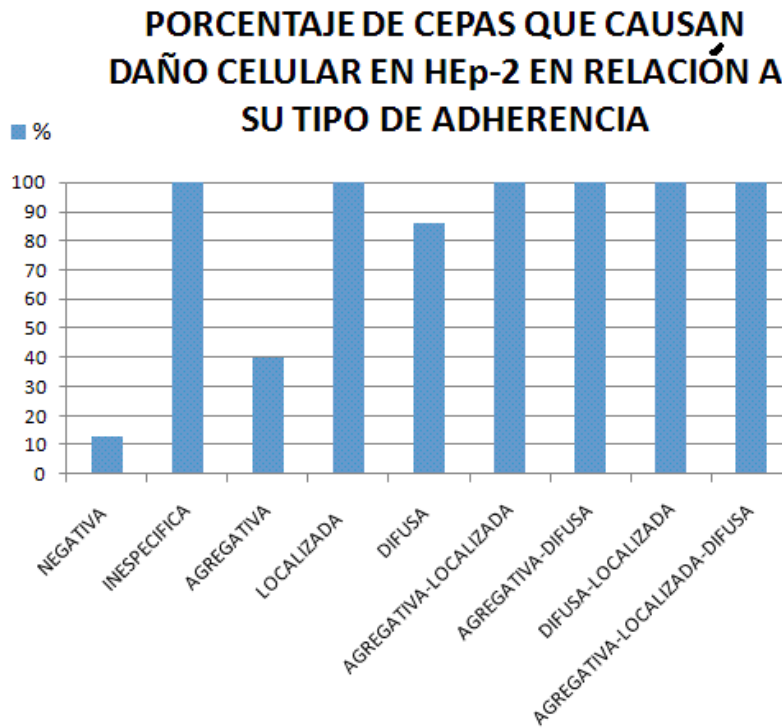


Figura 7.2.3.4 Porcentaje de cepas que causaron daño a las células HEp-2.

Las siguientes figuras corresponden a las cepas aisladas de la superficie del mango y de su proceso de post-cosecha; se muestran de la 1 a la 34 en orden de izquierda a derecha, de arriba abajo, señalando en cada figura, con una flecha, el punto en el que se observó la adherencia reportada, misma que se describe conforme al patrón(es) de adherencia al que se asemeja. Si el patrón de adherencia que presenta la cepa es una combinación de los de E. coli, en algunas figuras sólo se muestra 1 de los 2 ó 3 que presenta, es decir, la cepa 10 tiene adherencia agregativa, localizada y difusa, y en la figura sólo se señala la adherencia agregativa que es la observada en este campo del microscopio.

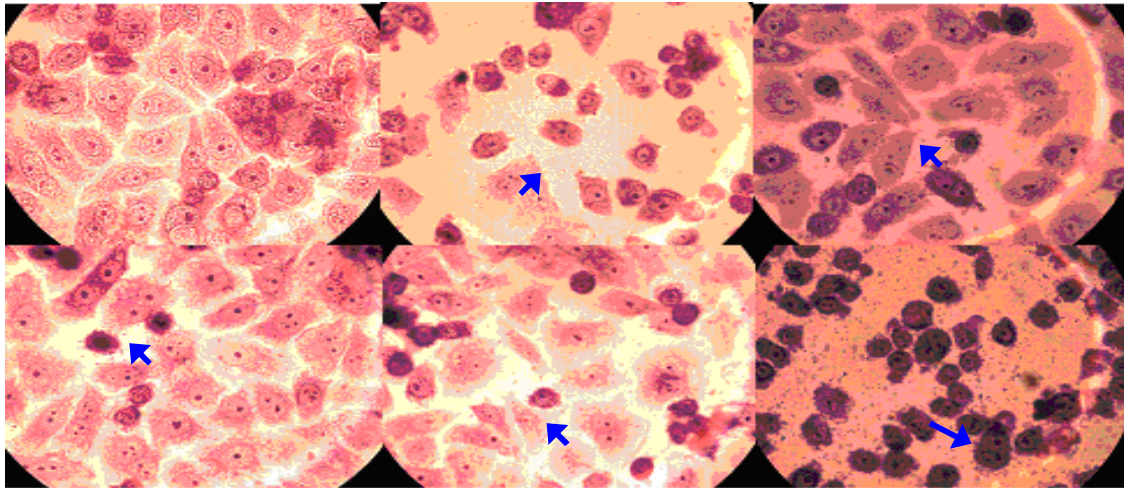


Figura 7.2.3.2 Resultados de adherencia de cepas 1 a 6 de *Enterobacter* aisladas del mango Ataulfo (Microscopía óptica en inmersión 100X).

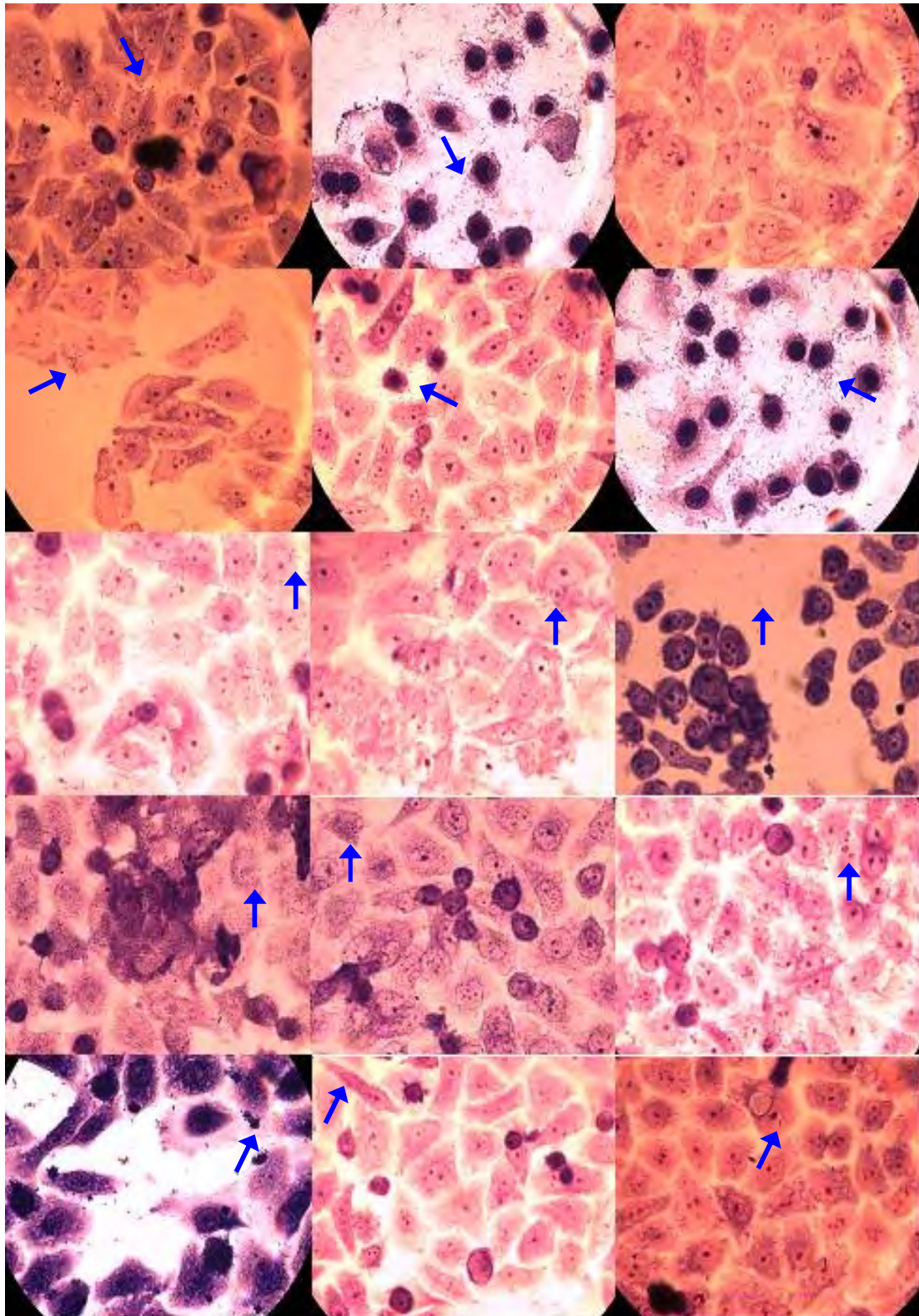


Figura 7.2.3.2 Resultados de adherencia de cepas 7 a 21 de *Enterobacter* aisladas del mango Ataulfo (Microscopía óptica en inmersión 100X).

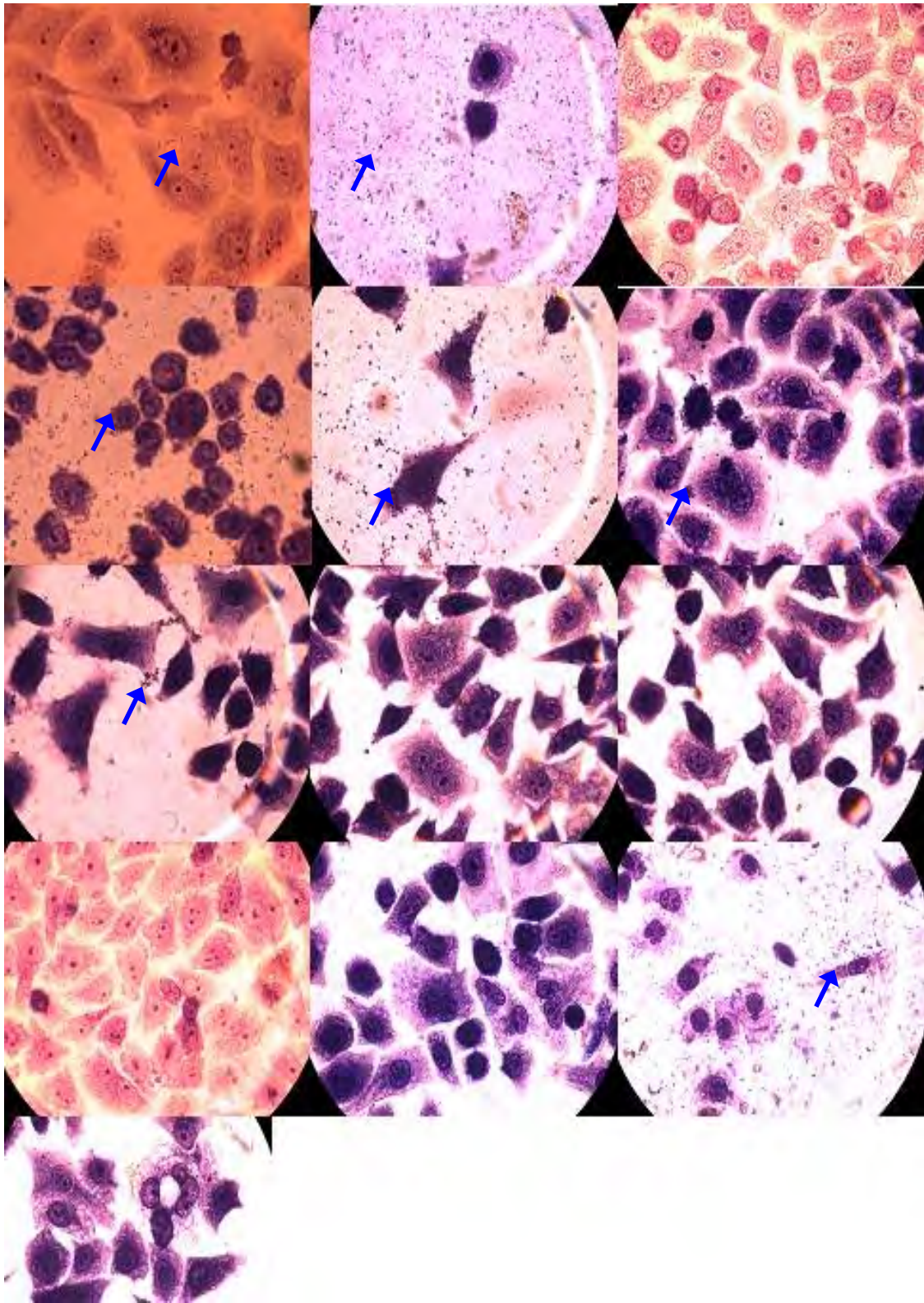


Figura 7.2.3.2 Resultados de adherencia de cepas 21 a 34 de *Enterobacter* aisladas del mango Ataulfo (Microscopía óptica en inmersión 100X).

La característica de adherencia in vivo se interpretaría como que estas cepas después de pasar viables por el estómago pueden adherirse a la mucosa intestinal debido a que poseen alguna de las siguientes características: producción de fimbrias, de proteínas de membrana externa, de adhesinas no fimbriales (Gutierrez, M. et.al., 2003), entre otras. Debido a que la adherencia es una característica ligando-receptor e irreversible, el movimiento peristáltico es incapaz de desprender a las bacterias de la célula intestinal.

El ensayo de adherencia da una idea de que algunas cepas podrían producir alguna exotoxina con efecto citotóxico, por el tipo de daño celular observado en las células HEp-2 en esta prueba. Es decir, en caso de que fueran citotóxicas, las células se dañarían (rompiéndose su pared celular) y arrojando al medio intercelular componentes del citoplasma, tal situación sería observable en el ensayo de adherencia, mostrando a las células HEp-2 dañadas o a las bacterias sobre el portaobjetos y/o grandes huecos en la monocapa (Figura 7.2.3.2), a causa de la desintegración y muerte de las células por la bacteria. El 66% de las cepas presentaron este fenómeno.

7.2.4 Invasividad a células HEp-2.

Se utilizó como control positivo de invasividad la cepa de E. coli EIEC-5273/0 028ACCNM y para el control negativo la cepa de E. coli (OR:H11) K12 (Figuras 7.2.4.1 y 7.2.4.2).

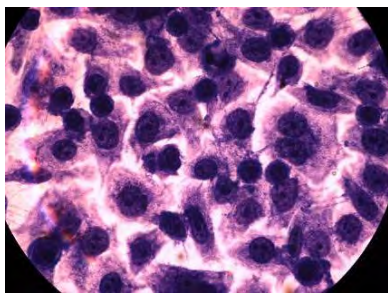


Figura 7.2.4.1 Control negativo: (OR:H11) K12

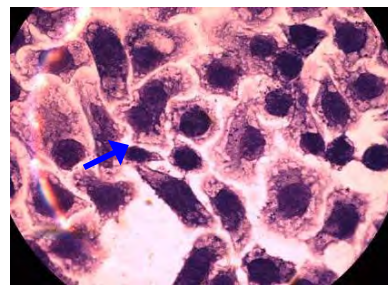


Figura 7.2.4.2 Control positivo: EIEC-5273/0 028ACCNM

De las 34 cepas aisladas sólo una mostró ser invasiva, la cepa 23, misma que también presenta adherencia inespecífica a células HEp-2. Por otro lado, en el mismo ensayo, la cepa 23 mostró conservar la monocapa celular en un 80% y a pesar de que la cepa es sensible a gentamicina utilizando el método VITEK® y

creciendo en Agar sangre con 300•g/mL de gentamicina hubo bacterias adheridas a la superficie inerte (adherencia inespecífica). Considerando como primer punto que esta cepa es adherente inespecífica y la adherencia inespecífica se relaciona con biopelículas, y como segundo punto que la formación de biopelículas se lleva a cabo cuando el microorganismo se presenta ante situaciones adversas y/o aquellas que afectan su viabilidad, tal y como es la presencia de un antibiótico al que sean sensibles; es probable esta cepa sea formadora de biopelículas y por tal razón se haya protegido de la acción del antibiótico al que fue expuesta durante el ensayo de invasividad, continuando viable e invasiva. Observando en la preparación bacterias dentro de la célula en el citoplasma, en la membrana, algunas otras bacterias se observan entrando y saliendo a través de vacuolas, así como también algunas células lisadas por la invasión (Figura 7.2.4.3).

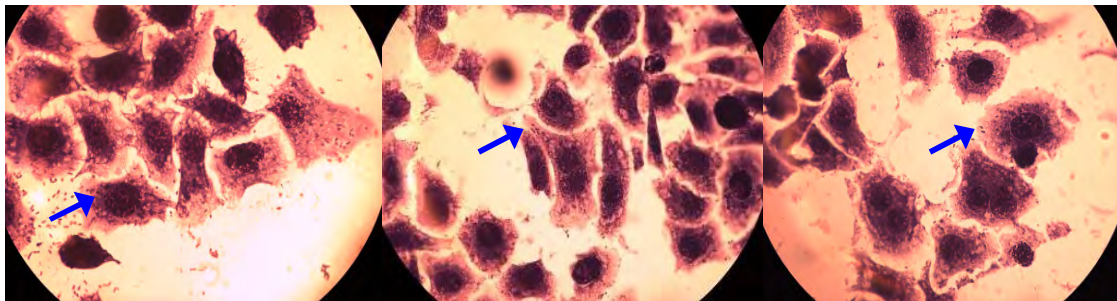


Figura 7.2.4.3 a la figura 6.2.4.5 Cepa 23. Invasiva

7.2.5 Actividad tóxica de sobrenadantes de las cepas de *Enterobacter* en células VERO.

Se utilizaron células VERO, debido a que es la línea celular que se usa comúnmente para estudiar la producción de exotoxinas por *E. coli* (Johnson R.P., et.al.1996). Como control negativo se utilizó *E. coli* (OR:H11) K12, porque no se adhiere, no es invasiva, simplemente no es citopatógena; como controles positivos de enterotóxicas se utilizaron *E. coli* E9034/A como termolábil, como termoestable *E. coli* 109C2, como termoestable y termolábil se utilizó H10407/ETA/IT/STT/LTT , y para el control positivo de citotóxicas se utilizó 087657-933J.

En los pocillos que contenían el sobrenadante de la cepa utilizada como control positivo de enterotóxicas se observó que cerca de 80 % de las células de la monocapa, originalmente con morfología alargada, se tornaron redondeadas, estrelladas o demasiado alargadas, tipo filamento; los pocillos que contenían el

sobrenadante del control positivo de la cepa citotóxica sufrieron destrucción celular en mas del 90% de la monocapa.

Las figuras 7.2.5.4 y 7.2.5.5 corresponden a células VERO inoculadas con sobrenadante de *E.coli* , como control positivo de toxina termolábil y en ellas se observó redondeamiento, alargamiento tipo filamento y estrellamiento de las células, en algunos casos también puede presentarse triangulación de las células, además en estas células hubo granulación, pérdida de citoplasma, sincitios (grupos de células fusionadas apreciables como una masa celular multinucleada), vacuolas, exnucleación. Las figuras 7.2.5.6 y 7.2.5.7 corresponden a células VERO inoculadas con sobrenadante de *E.coli* 109C2/ST, como control positivo de toxina termoestable, y en ellas se observó granulación, pérdida de citoplasma, destrucción de membrana nuclear, redondeamiento y sincitios. La figura 7.2.5.8 que corresponde a células VERO inoculadas con sobrenadante de *E.coli* H10407/ETA/IT/STT/LTT, como control positivo de toxina termolábil y termoestable, se observaron sincitios, redondeamiento y alargamiento tipo filamento, así como vacuolas. En la figura 7.2.5.12 se observan células VERO inoculadas con el control positivo de la cepa citotóxica, *E. coli* 087657-933J, y se tuvo un 70% de la monocapa celular, debido a la destrucción celular y por lo tanto la ausencia de células, también se presentó sincitios, granulación, debido al cambio de morfología (formas irregulares y alargamiento tipo filamento), y a la pérdida de membrana celular, citoplasma y membrana nuclear.

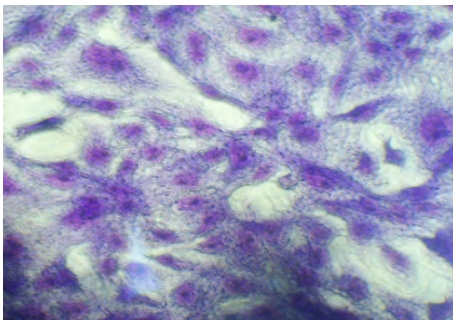


Figura 7.2.5.3 Células VERO inoculadas con sobrenadante de *E.coli* (OR:H11) K12, como control negativo. Dilución doble seriada 1-2

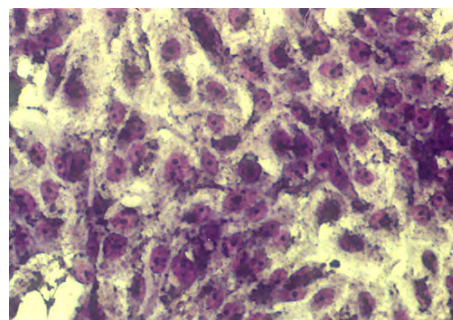


Figura 7.2.5.4 Células VERO inoculadas con sobrenadante de *E.coli* E9034/A , como control positivo de LT. Dilución doble seriada 1-2

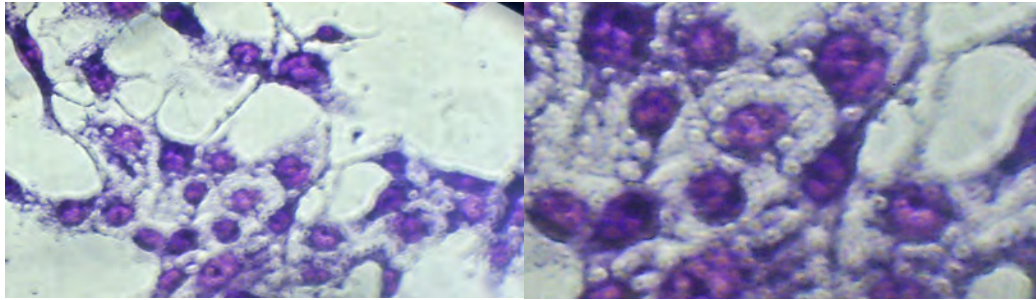


Figura 7.2.5.5 Control positivo de *E. coli* LT E9034/A. Dilución doble seriada 1-8

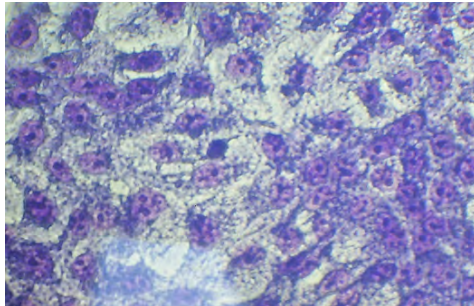


Figura 7.2.5.6 Control positivo de 109C2/ST. Dilución doble seriada 1-2

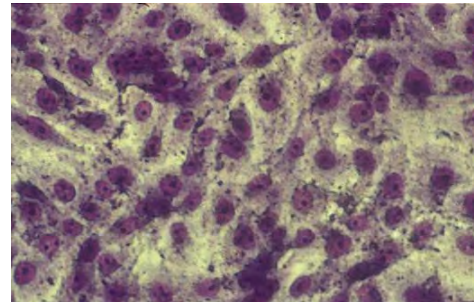


Figura 7.2.5.7 Control positivo de 109C2/ST. Dilución doble seriada 1-4

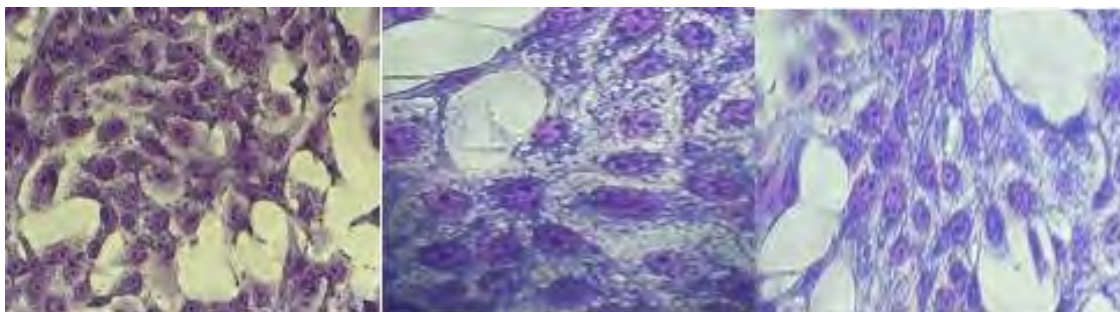


Figura 7.2.5.8 Control positivo de H10407/ETA/IT/STT/LTT. Dilución doble seriada 1-8

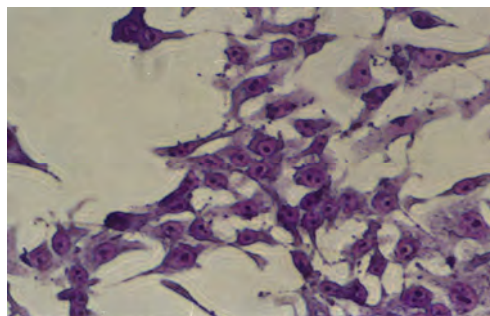


Figura 7.2.5.12 Control positivo de 087657-933J. Dilución doble seriada 1-2. CITOTÓXICA

Las siguientes figuras corresponden a las cepas que provocaron daño celular a las células VERO, ya sea, debido a la producción de enterotoxinas o citotoxinas, presentando las características observadas a la de los patrones correspondientes. Las cepas 2, 4, 8, 12 y 18 aparte de las características observadas en el control positivo, hubo la presencia de vacuolas y exnucleación.

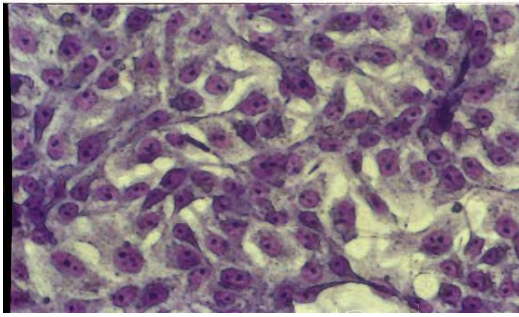


Figura 7.2.5.14 Ceba 2. Dilución doble seriada, 1-2
CITOTÓXICA

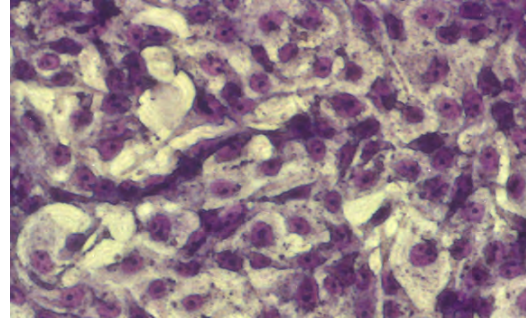


Figura 7.2.5.13 Ceba 3. Dilución doble seriada, 1-4.
ENTEROTÓXICA

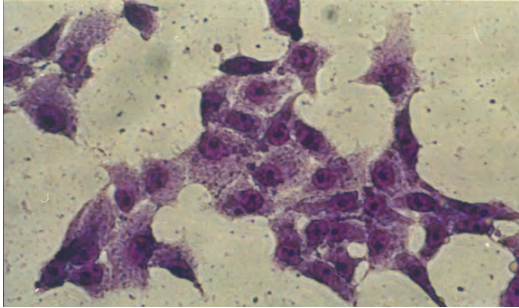


Figura 7.2.5.14 Ceba 4. Dilución doble seriada, 1-2
CITOTÓXICA

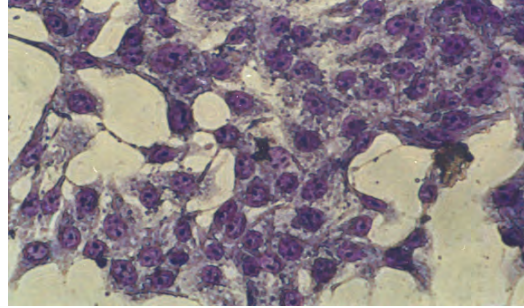


Figura 7.2.5.17 Ceba 4. Dilución doble seriada, 1-8.
CITOTÓXICA

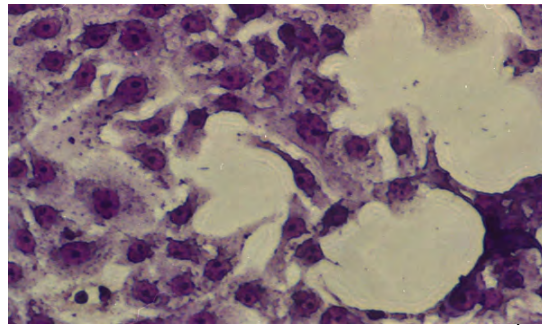


Figura 7.2.5.15 Ceba 6. Dilución doble seriada, 1-4. CITOTÓXICA

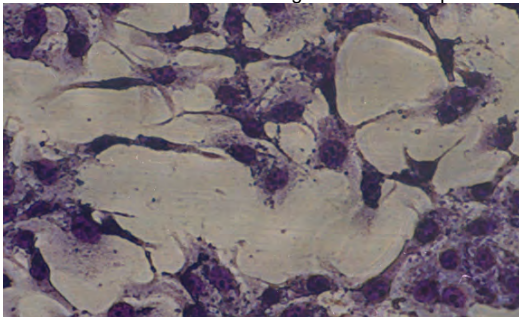


Figura 7.2.5.43 Ceba 7. Dilución doble seriada, 1-2.
ENTEROTÓXICA

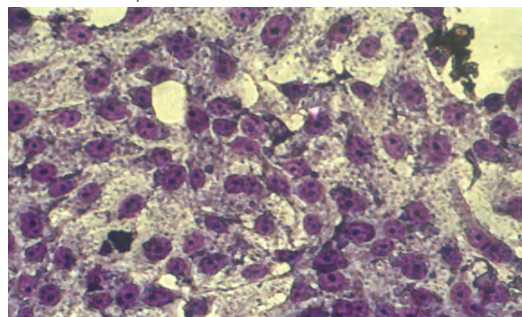


Figura 7.2.5.23 Ceba 8. Dilución doble seriada, 1-4.
CITOTÓXICA

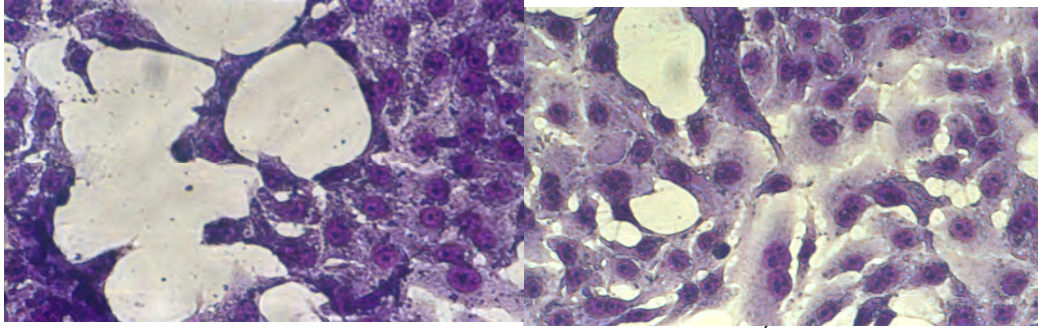


Figura 7.2.5.21 Ceba 8. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

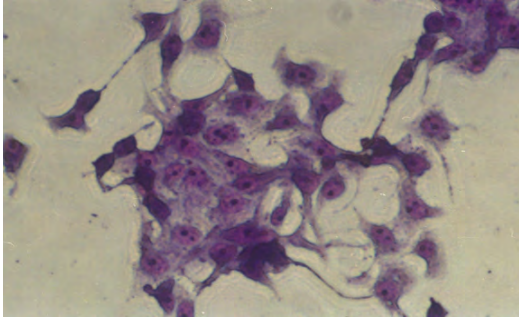


Figura 7.2.5.48 Ceba 9. Dilución doble seriada 1-2. ENTEROTÓXICA

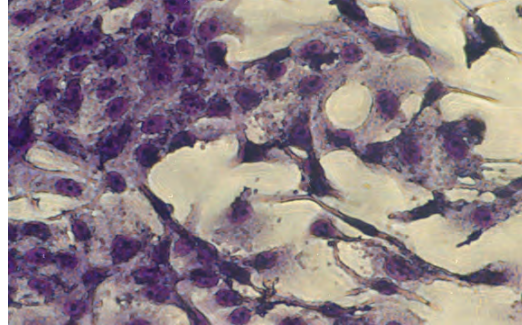


Figura 7.2.5.25 Ceba 10. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

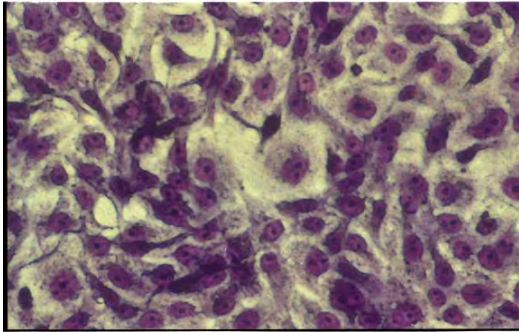


Figura 7.2.5.25 Ceba 11 Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

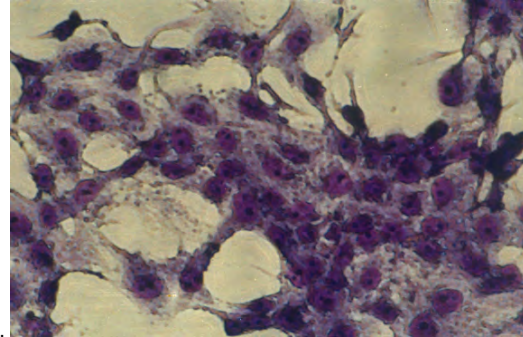


Figura 7.2.5.29 Ceba 12. Dilución doble seriada, 1-8. CITOTÓXICA

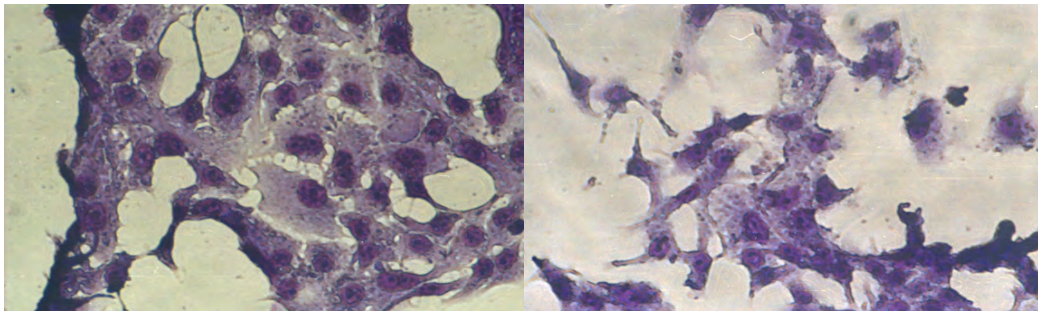


Figura 7.2.5.27 Ceba 12. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

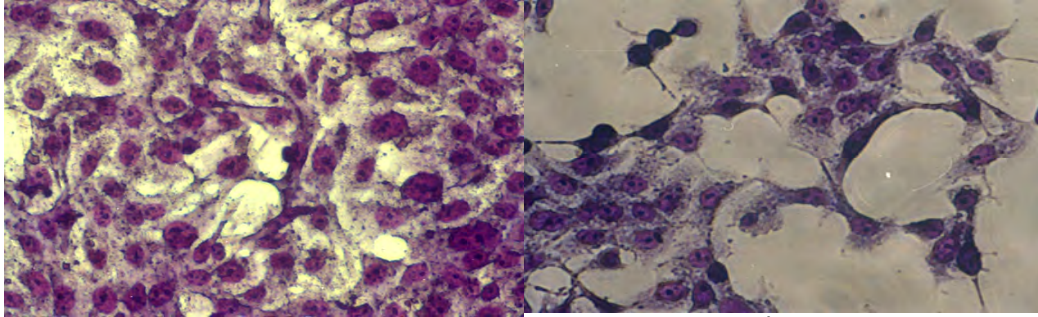


Figura 7.2.5.31 Cepa 13. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

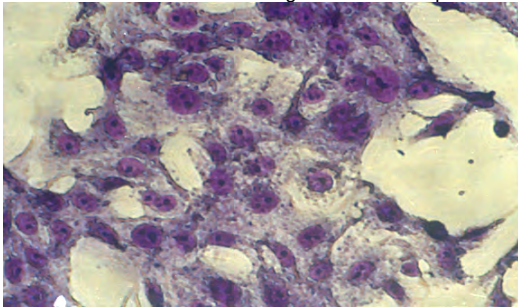


Figura 7.2.5.35 Cepa 13. Dilución doble seriada, 1-4. CITOTÓXICA

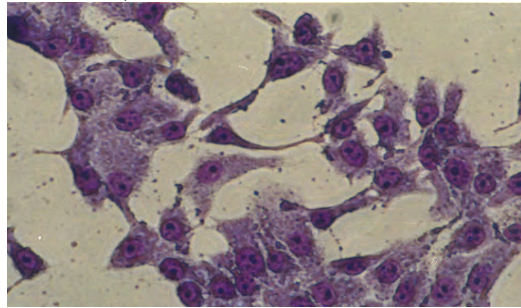


Figura 7.2.5.35 Cepa 14. Dilución doble seriada, 1-4. ENTEROTÓXICA

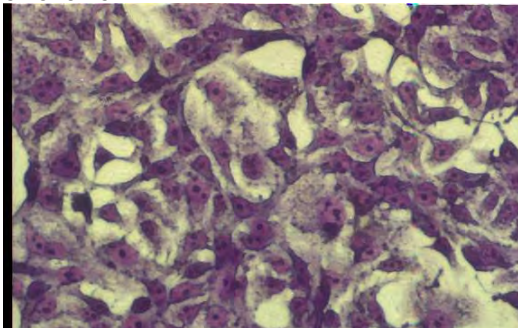


Figura 7.2.5.35 Cepa 15. Dilución doble seriada, 1-8. CITOTÓXICA

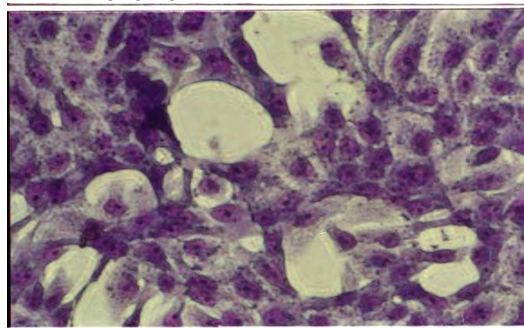


Figura 7.2.5.35 Cepa 16. Dilución doble seriada, 1-8. CITOTÓXICA

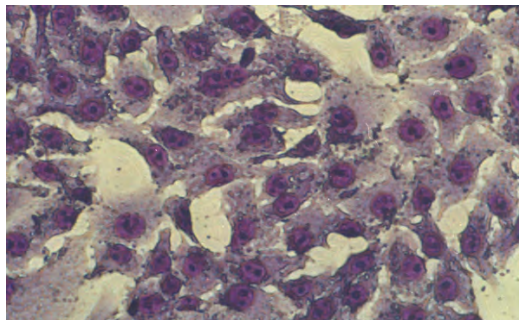


Figura 7.2.5.35 Cepa 17. Dilución doble seriada, 1-8. CITOTÓXICA

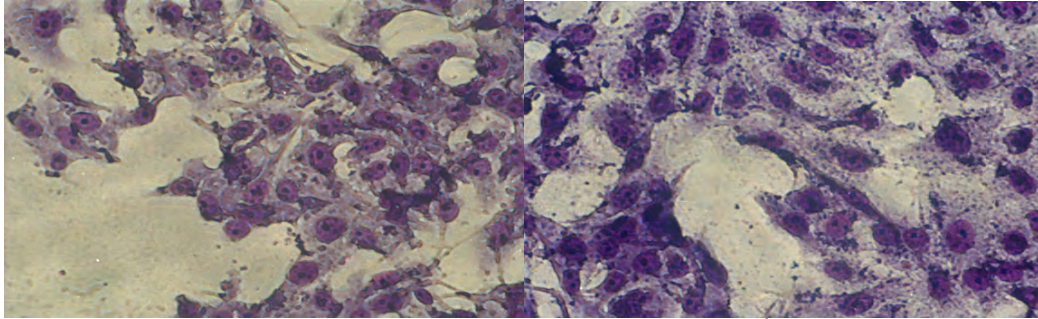


Figura 7.2.5.38 Ceba 18. Dilución doble seriada, 1-8 CITOTÓXICA

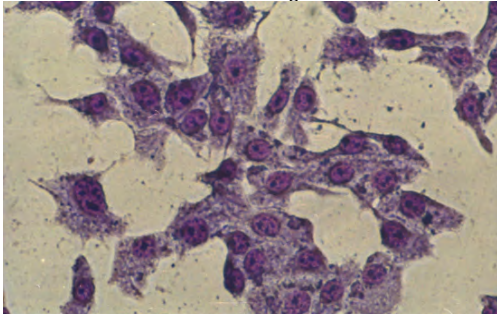


Figura 7.2.5.35 Ceba 14. Dilución doble seriada, 1-4. ENTEROTÓXICA

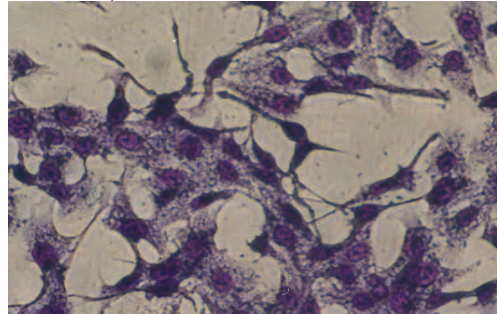


Figura 7.2.5.35 Ceba 14. Dilución doble seriada, 1-4. ENTEROTÓXICA

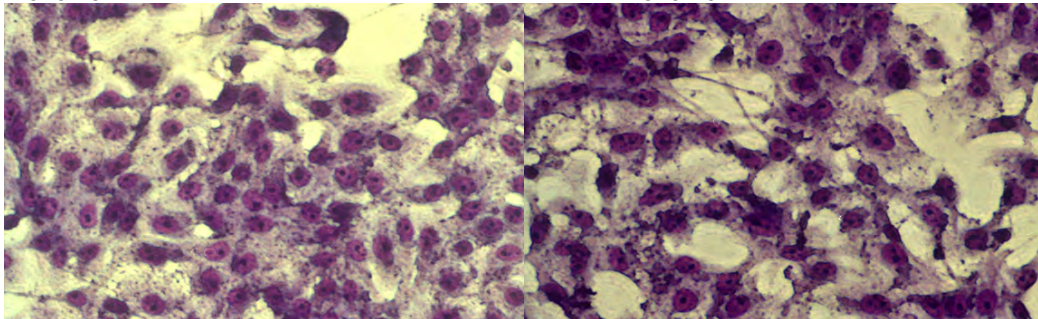


Figura 7.2.5.41 Ceba 21. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

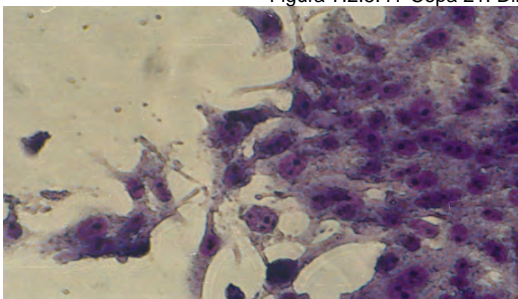


Figura 7.2.5.41 Ceba 22. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

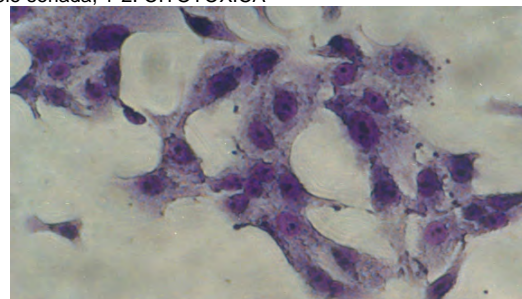


Figura 7.2.5.41 Ceba 21. Dilución doble seriada, 1-2. ENTEROTÓXICA

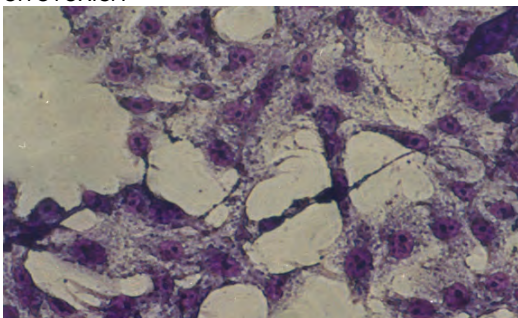


Figura 7.2.5.43 Ceba 24. Dilución doble seriada, 1-2. ENTEROTÓXICA

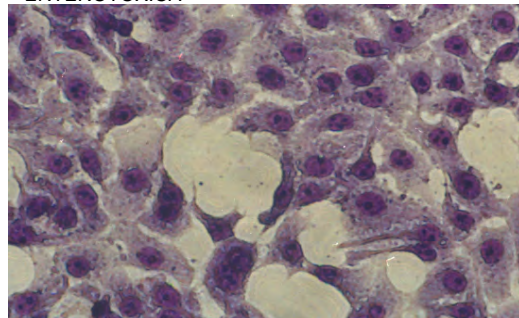


Figura 7.2.5.43 Ceba 25. Dilución doble seriada, 1-4. ENTEROTÓXICA

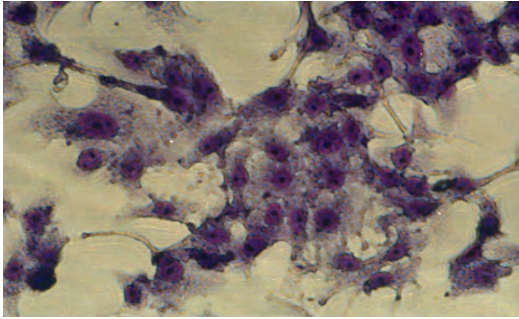


Figura 7.2.5.41 Cepa 26. Dilución doble seriada, 1-2. CITOTÓXICA

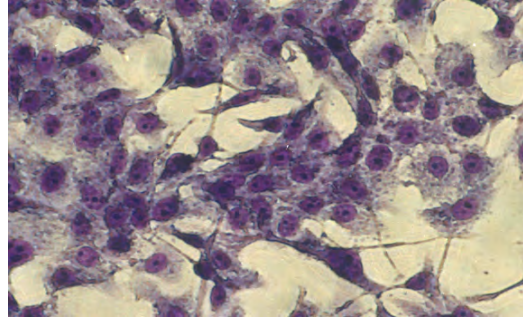


Figura 7.2.5.43 Cepa 25. Dilución doble seriada, 1-4 ENTEROTÓXICA

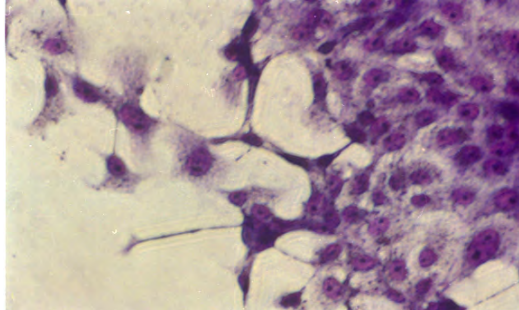


Figura 7.2.5.45 Cepa 31. Dilución doble seriada, 1-4. ENTEROTÓXICA

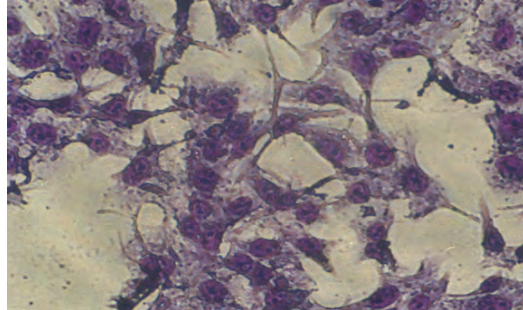


Figura 7.2.5.45 Cepa 32. Dilución doble seriada, 1-4 ENTEROTÓXICA

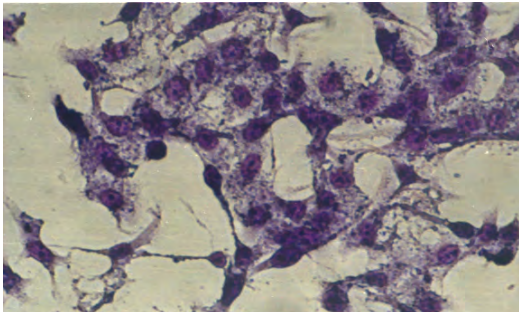


Figura 7.2.5.45 Cepa 33. Dilución doble seriada, 1-2. ENTEROTÓXICA

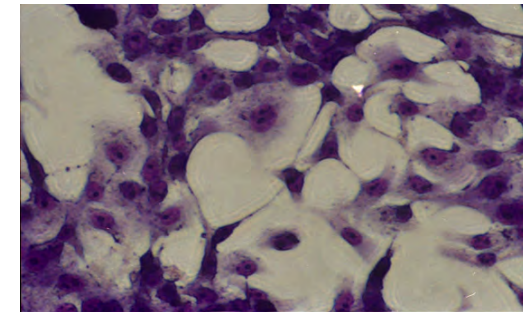


Figura 7.2.5.47 Cepa 34. Dilución doble seriada, 1-2 ENTEROTÓXICA

Las cepas 1, 5, 29 y 30 no provocaron ningún daño en las células HEp-2 ni en las células VERO, al realizar el ensayo de adherencia y el ensayo de efecto citotóxico o enterotóxico. Esto haría suponer que al realizar el ensayo de daño celular sobre HEp-2 la situación seguiría siendo la misma y podríamos considerarlas como no productoras de exotoxinas.

El 85% de las cepas produjeron una exotoxina que daña o modifica la morfología de las células VERO: 44% son citotóxicas y el 41% producen enterotoxinas. El 15% del total de las cepas no produjeron ningún daño o cambio morfológico a las VERO.

En la figura 6.3.6 se muestran los resultados del ensayo de citotoxicidad sobre células VERO. Además, en dicha tabla también se observa que 3 cepas (1, 29 y 30)

presentaron únicamente 2 factores de virulencia: resistencia a antibióticos betalactámicos y hemólisis tipo alfa; que la cepa 23 presentó los 5 factores de virulencia: hemólisis tipo alfa, resistencia a antibióticos betalactámicos (posiblemente modificando la proteína de unión a penicilinas o produciendo enzimas que destruyen betalactámicos (Guitierrez, M., 2003)), adherencia inespecífica a células HEp-2, invasividad a células HEp-2 y producción de enterotoxinas.

7.3 Tipificación de cepas de Enterobacter por PFGE

Las siguientes figuras muestran los geles obtenidos tras las corridas de PFGE realizadas para la colección de cepas.

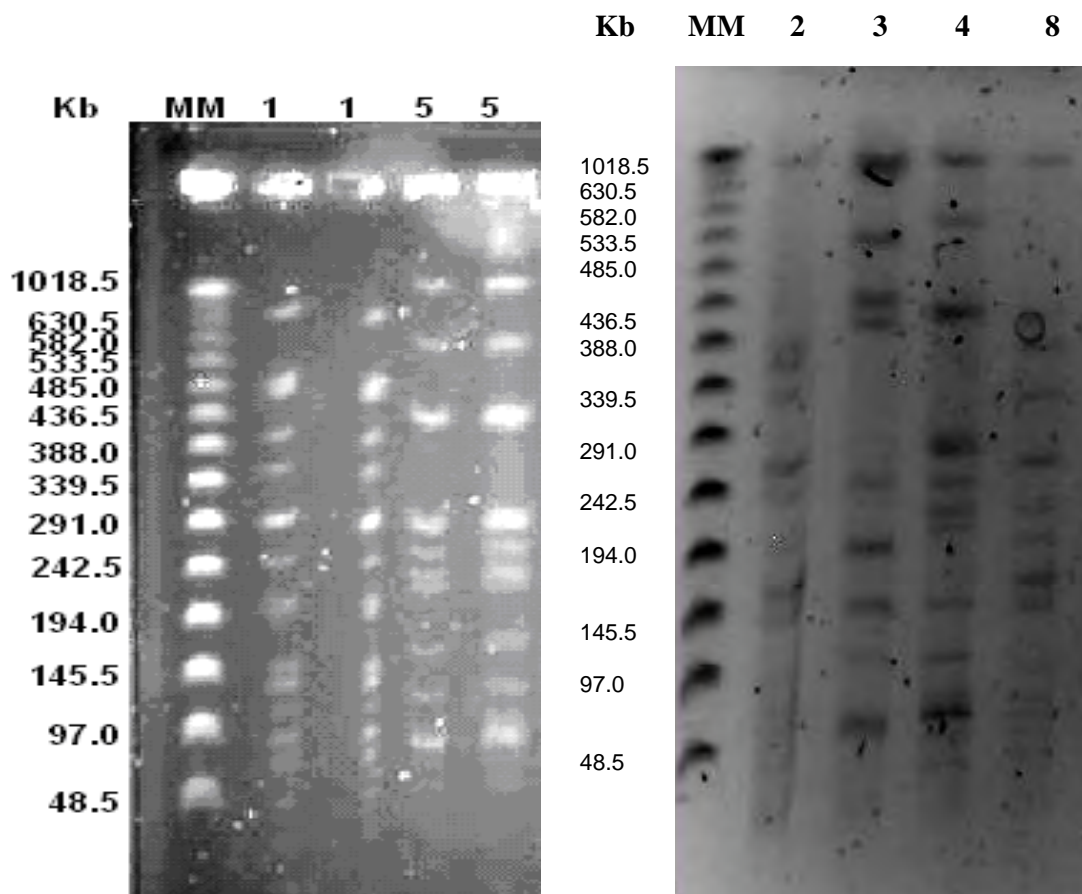


Figura 7.3.1 Geles de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

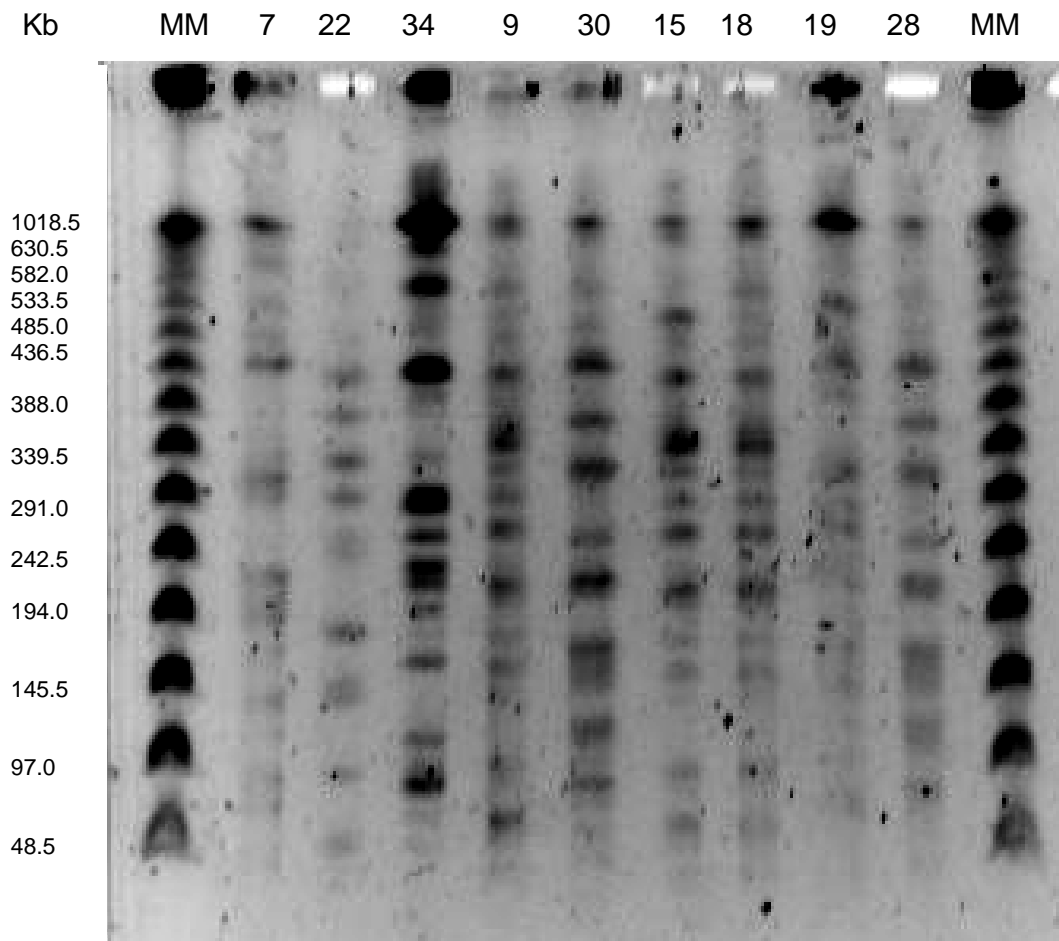


Figura 7.3.2 Gel de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

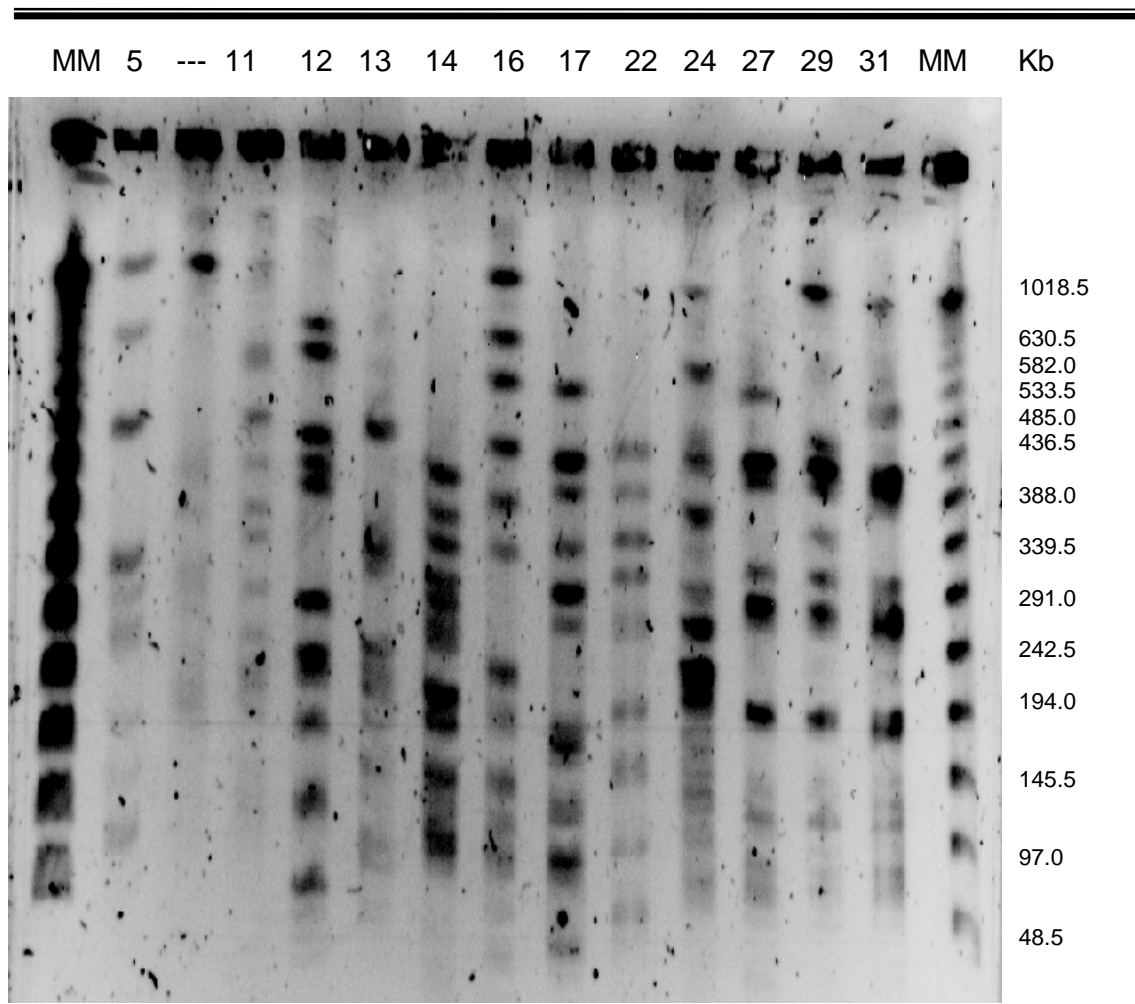


Figura 7.3.3 Gel de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

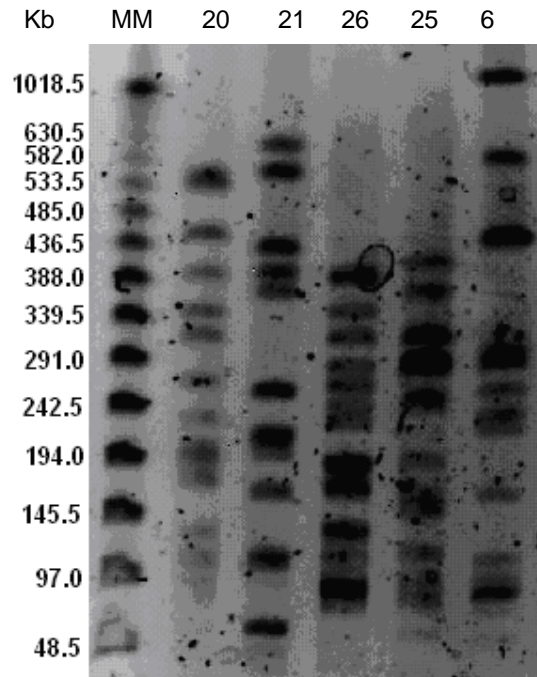


Figura 7.3.4 Gel de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

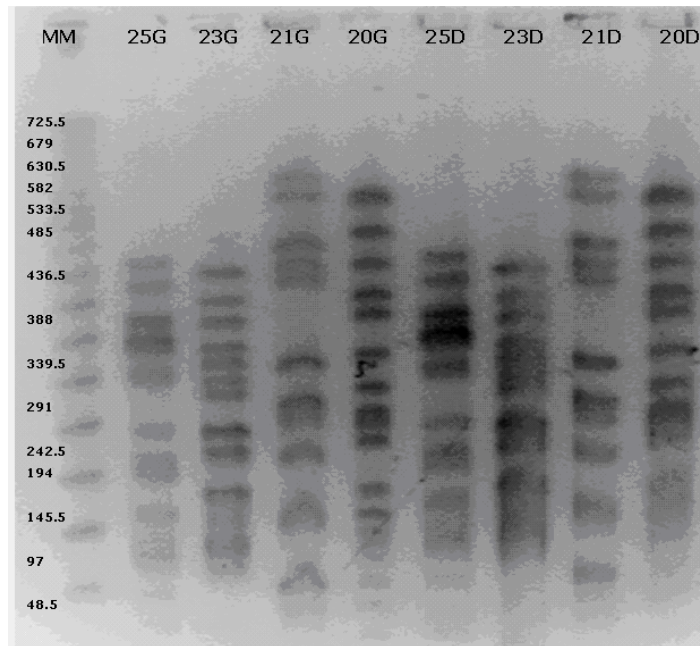


Figura 7.3.5 Gel de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

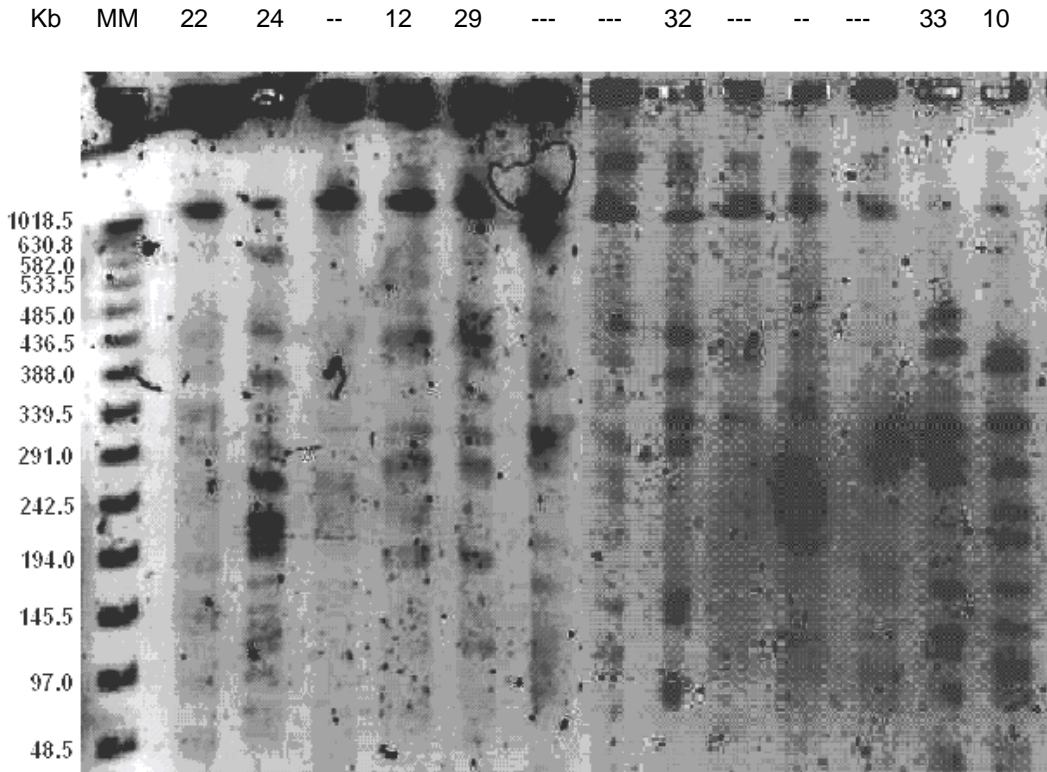


Figura 7.3.6 Gel de PFGE. Condiciones de corrida: Rango de pulsos 5s y 50s, tiempo de corrida 20h, 200V, 14°C, amortiguador TBE 0.5X, 1% de agarosa. Enzima de restricción Xba I (Fermentas) 30U. MM: Marcador PFG Lambda Ladder, New England BioLabs, unidades en kb.

En los gels obtenidos se observó una separación de los fragmentos del ADN, siendo clara la diferenciación entre dichos fragmentos y entre los patrones de bandeo de cada cepa.

A partir del perfil de bandeo (figura 7.3.8), el cual indica la presencia o ausencia de bandas se calculó la matriz de distancia entre las cepas y con ella se construyó el dendrograma (figura 7.3.7), agrupando así la colección de cepas de *Enterobacter* genotípicamente. Se logró determinar que no hay clonalidad entre estas cepas, aisladas dentro de un tiempo y espacio definidos (Ver 6.1 Material Biológico), independientemente de que hayan provenido de un mismo lugar o pertenezcan a la misma especie microbiológica o taxón. El dendrograma genotípico (figura 7.3.7) muestra que el porcentaje más cercano de similitud genética se encuentra únicamente entre 2 cepas y es de un 57% (cepa 27 y 12).

Por otra parte en el dendrograma genotípico las cepas se agruparon de acuerdo a su lugar de origen y de igual forma en cuanto a sus factores de virulencia, debido a que las cepas relacionadas entre sí considerando sus factores de virulencia estudiados,

coinciden con su lugar de aislamiento. Independientemente de que entre las cepas no exista clonalidad y sean genotípicamente distintas, la razón o razones por las que las cepas se hayan agrupado de acuerdo a estos factores, es porque una de las desventajas de la técnica de PFGE es que no se aíslan elementos móviles, como lo son los plásmidos bacterianos o virus, lo cual no evita que al hacer la extracción de ADN se extraiga también el ADN proveniente de éstos. Es así que la similitud genética entre estos aislados que va de un 1-57%, se debe a secuencias genéticas específicas e inamovibles, que definen y distinguen al género *Enterobacter* y a la especie *E. cloacae*, así como también se debe a sus factores de virulencia, los cuales frecuentemente son parte del ADN extracromosomal bacteriano (elemento transferible) y se relacionan y expresan en las cepas de acuerdo al microambiente del que se aislaron.

A pesar de que las cepas no son clonas estadísticamente, no se puede pasar por alto que el dendrograma muestra agrupaciones que permiten completar el objetivo de este proyecto (fuente(s) de contaminación), de cierta forma. Ya que, dicho dendrograma genotípico (figura 7.3.7) muestra 3 agrupaciones principales; en la "1" se agrupa el 75% de las cepas aisladas de los mangos que pasaron por las tolvas, al igual que el 100% de las cepas aisladas de los mangos empacados; en la "2" se agrupa el 100% de las cepas aisladas del agua de pozo y de las aisladas de mangos empacados; en la "3" se agrupa el 71% de las cepas aisladas de los mangos que recibieron el tratamiento hidrotérmico y el hidrogenfriado y el 66% de las cepas aisladas de mangos lavados; por último un 33% de las cepas aisladas del agua de hidrogenfriado se presenta en cada una de las agrupaciones.

Las 2 cepas que pertenecen a una especie distinta a *E. cloacae* tuvieron una línea única en el dendrograma: *E. hormachei* (17) tiene un 23% de similitud genética con 3 cepas *E. cloacae* (22, 24 y 6) y se encuentra en la agrupación "1"; *E. cancerogenus* (26) tiene un 30% de similitud con 2 cepas *E. cloacae* (9 y 16) y se encuentra en la agrupación "3"; sin embargo, entre *E. hormachei* y *E. cancerogenus* hay un 15% de similitud, es decir hay mayor similitud genética de estas cepas respecto a las aisladas de *E. cloacae*, que entre ellas.

Por otro lado una de las cepas aisladas del agua de hidrogenfriado (31) tiene un 47% de similitud con una cepa aislada del mango lavado (23-invasiva), probablemente

porque el agua utilizada tanto para el lavado como para el hidrogenfriado tengan en común la cisterna de almacenamiento. Otra cepa, la 32, que también proviene del agua de hidrogenfriado tiene un 35% de similitud con respecto a 28 que proviene del mango ya tratado, es decir del mango que ha pasado por el agua del tratamiento hidrotérmico y del agua de hidrogenfriado. La 34-agua hidrogenfriado tiene un 47% de similitud con respecto a la 33-mango tratado. La 27 y la 12 provienen de mangos lavados y tienen el mayor porcentaje de similitud del dendrograma (57%), y conforman junto con el 71% de las cepas provenientes del mango tratado la agrupación "1", lo que nos hace suponer que la probable coincidencia entre ellas sea el agua y debido a ésta comparten un 20% de similitud y están en la misma agrupación. Por último y considerando el lugar de aislamiento y la agrupación en el dendrograma, las 2 cepas aisladas del agua de pozo se agruparon con un 30% de similitud, al igual que las 2 únicas cepas aisladas de mango en recepción y las 4 con un 27% de similitud se relacionan, lo que se puede suponer en este caso, es similar a lo sucedido entre las cepas de la tolva respecto a las cepas del mango empacado: un elemento transferible (27% o menos del ADN) proveniente de las cepas en el agua de pozo continúa en el mango de recepción.

Considerando sus factores de virulencia, también hubo una interesante agrupación, debido esencialmente a que existe una relación entre los factores de virulencia y el lugar de aislamiento. Las cepas provenientes del agua de pozo (4 y 21) son adherentes a células HEp-2, resistentes a betalactámicos, hemolíticas y citotóxicas en células VERO. Las cepas provenientes de la recepción (18 y 20) son adherentes con más de un tipo de adherencia a células HEp-2, resistentes a betalactámicos, hemolíticas y causan daño a células VERO. De las cepas aisladas del mango una vez que pasó por las tolvas (3,6,8,10,11,13,14,16,17,19,22,25 y 26) se encontró 3 especies de Enterobacter: *E. cloacae*, *E. hormachei* y *E. cancerogenus*, siendo todas ellas adherentes a células HEp-2 de forma agregativa, difusa o la combinación de estas dos y de la forma localizada; resistentes a betalactámicos, en este caso, excepto la 26; hemolíticas y causando daño a células VERO (citotóxicas y enterotóxicas). Las cepas aisladas del mango lavado (12, 23,27) son adherentes de forma agregativa, inespecífica y localizada-agregativa a células HEp-2, respectivamente; resistentes a betalactámicos, hemolíticas y su sobrenadante causó

daño a células VERO. En el caso de las cepas aisladas del agua de hidrogenado no son adherentes, son resistentes a betalactámicos, hemolíticas y enterotóxicas en células VERO. Las cepas aisladas de mangos tratados hidrotérmicamente e hidrogenados (2, 5, 7, 9, 28, 29,33) tienen la variante de ser o no ser adherentes a células HEp-2, y en caso de serlo no hay combinación de formas de adherencia; son resistentes a betalactámicos, hemolíticas y el 43% no causa daño a células VERO. Y por último, de las cepas aisladas en los mangos empacados el 75% no son adherentes a células HEp-2 y el otro 25% muestra una adherencia inespecífica, son resistentes a betalactámicos, hemolíticas y el 50% no causa daño a células VERO.

Con lo anterior, es prudente decir que el tratamiento hidrotérmico beneficia al consumidor de mango y es eficiente, ya que cumple con su propósito, pues sin éste, probablemente las cepas de *E. cloacae* en el mango y que forman parte de su microbiota, continuarían siendo potencialmente patógenas hasta su empaque, no siendo así, tras el tratamiento que recibió dicho fruto, disminuyendo la patogenicidad de las cepas aisladas. En caso de que el agua de pozo o la tolva le hubieran proveído al fruto una carga microbiana de *Enterobacter* potencialmente patógena, el tratamiento hidrotérmico disminuyó la patogenicidad en cuanto a adherencia y daño a células VERO.

Y la cadena de control microbiológico no se perdió, no en cuanto a patogenicidad se refiere, ya que la mano humana al empacar el fruto no contribuyó a contaminarlo, pues *E. cloacae* aislada del mango empacado continuó con la misma o menor patogenicidad de cuando se muestreó el mango tratado hidrotérmicamente e hidrogenado.

PFGE mostró tener un alto poder discriminativo para diferenciar de manera excelente las clonas de la colección de cepas aisladas de la superficie del mango y de sus diferentes etapas en el proceso de post-cosecha, debido a su alta sensibilidad a la microvariación entre cepas, es así que esta técnica genética permitió determinar que no hay clonalidad entre esta colección de cepas de *Enterobacter*.

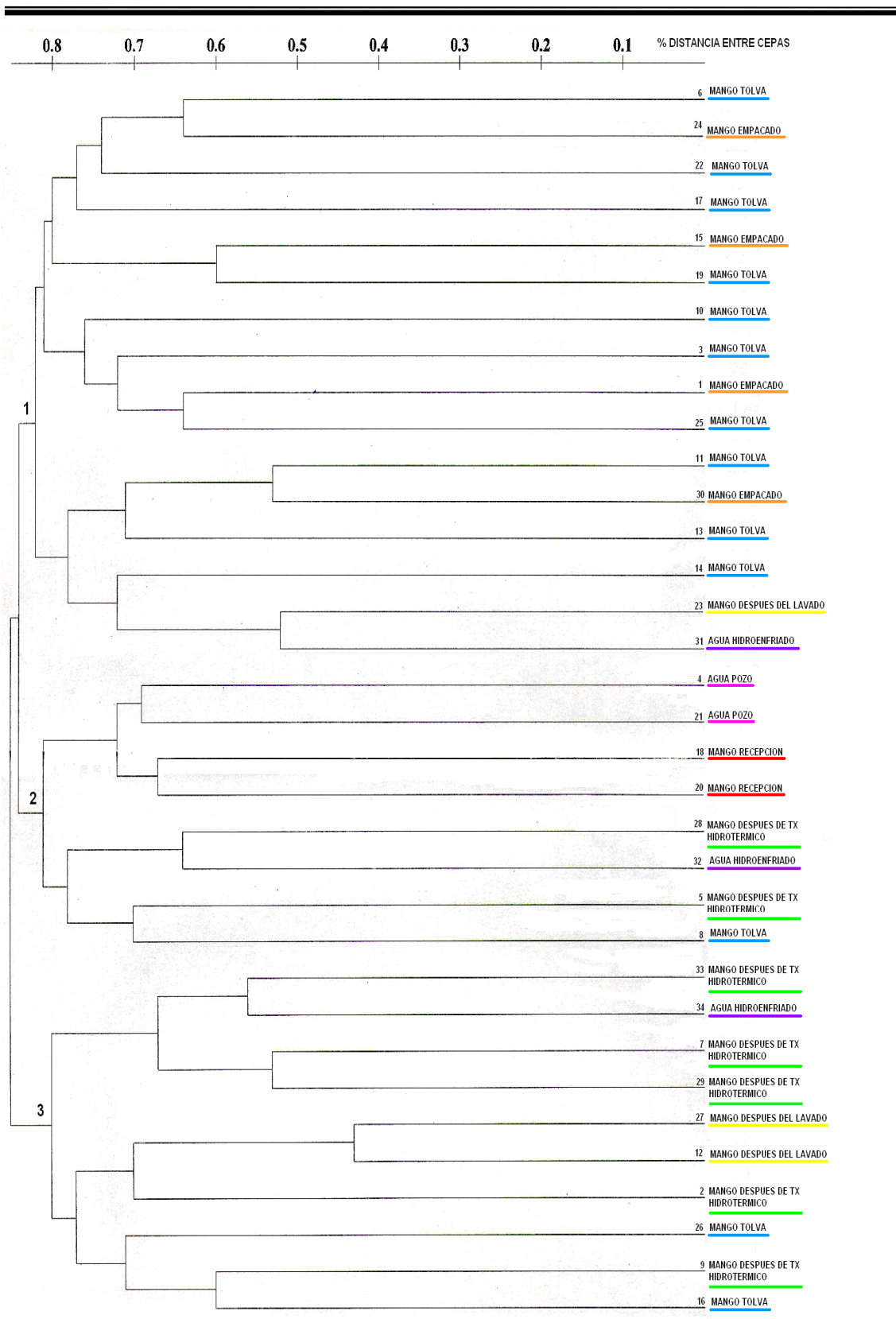
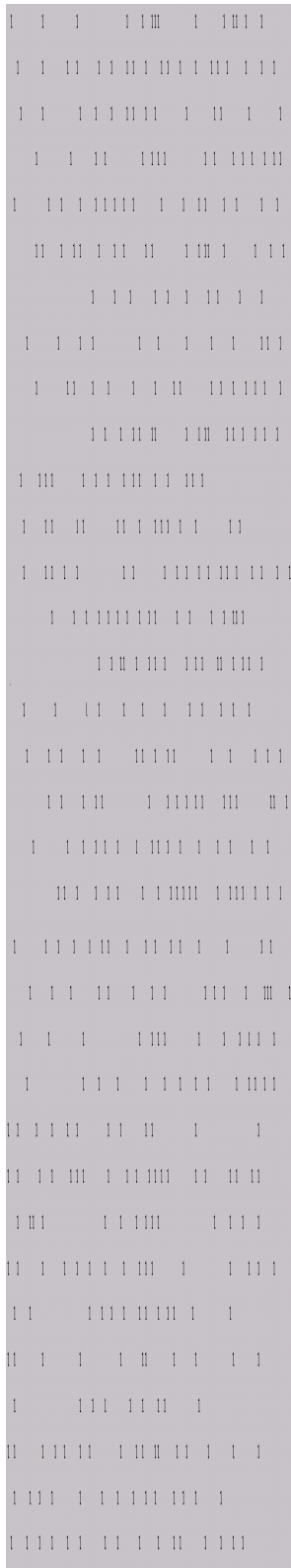


Figura 7.3.7 Dendrograma genotípico de la colección de cepas de *Enterobacter* aisladas del mango y del agua en el proceso de post-cosecha de éste fruto. DNA cromosomal digerido con XbaI. Programa Treecon for Windows (Van de Peer y Wachter, 1994); la distancia se estimó empleando el modelo matemático de Nei Y Li (1979). Se utilizó UPMGA para el agrupamiento.

PERFIL DE BANDEO



CEPA	VITEK®	ORIGEN	HEMÓLISIS	RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS	ADHERENCIA	INVASIVIDAD	DAÑO A CÉLULAS VERO
6	<i>E. cloacae</i>	T	SI	CZ/FD	D	NO	C
24	<i>E. cloacae</i>	E	SI	FD	N	NO	E
22	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	ALD	NO	C
17	<i>E. hormachei</i>	T	SI	AMC/CZ	A	NO	C
15	<i>E. cloacae</i>	E	SI	AMC/CZ	I	NO	C
19	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	DL	NO	E
10	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	ALD	NO	C
3	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS	D	NO	E
1	<i>E. cloacae</i>	E	SI	AMC/ROXA/FD	N	NO	N
25	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	ALD	NO	E
11	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	DL	NO	C
30	<i>E. cloacae</i>	E	SI	AMC/CZ	N	NO	N
13	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS/FD/OFX	A	NO	C
14	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS	D	NO	E
23	<i>E. cloacae</i>	L	SI	AMC/CZ	I	SI	E
31	<i>E. cloacae</i>	HE	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS	N	NO	E
4	<i>E. cloacae</i>	P	SI	AMC/CZ	A	NO	C
21	<i>E. cloacae</i>	P	SI	AMC/CZ	D	NO	C
18	<i>E. cloacae</i>	R	SI	AMC/CZ	AD	NO	C
20	<i>E. cloacae</i>	R	SI	AMC/CZ	ALD	NO	E
28	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ	L	NO	N
32	<i>E. cloacae</i>	HE	SI	AMC/CZ/ROXA	N	NO	E
5	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/ROXA	D	NO	N
8	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC	A	NO	C
33	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS	D	NO	E
34	<i>E. cloacae</i>	HE	SI	AMC/CZ/ROXA	N	NO	E
7	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS	I	NO	E
29	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ	N	NO	N
27	<i>E. cloacae</i>	L	SI	AMC/CZ	AL	NO	E
12	<i>E. cloacae</i>	L	SI	AMC/CZ/ROXA/ROXS/FD/OFX	A	NO	C
2	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ	I	NO	C
26	<i>E. cancerogenus</i>	T	SI	NO	AD	NO	C
9	<i>E. cloacae</i>	HT	SI	AMC/CZ	N	NO	E
16	<i>E. cloacae</i>	T	SI	AMC/CZ	D	NO	C

Figura 7.3.8 Perfil de Bando de la colección de cepas de *Enterobacter* aisladas del mango y del agua en el proceso de post-cosecha de este fruto. DNA cromosomal digerido con XbaI.

El significado de las claves de la figura 6.3.6 se indica en la tabla 7.3.2:

Tabla 7.3.1 Claves de las abreviaturas de la Figura 7.3.6

Antibióticos AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulónico ROXA: Cefuroxime Axetil ROXS: Cefuroxime de sodio FD: Nitrofurantoina CZ: Cefazolina OFX: Ofloxacina
Adherencia N: Negativa I: Inespecífica D: Difusa A: Agregativa L: Localizada ALD: Agregativa, Localizada y Difusa DL: Difusa y Localizada AD: Agregativa y Difusa AL: Agregativa y Localizada
Daño a células VERO C: Citotóxica E: Enterotóxica N: Negativo

8. CONCLUSIONES

-Se identificaron mediante el sistema VITEK® con más de un 99% de similitud, tres especies del género *Enterobacter*: *E. cloacae*, *E. hormachei* y *E. cancerogenus* en la colección de cepas aisladas del mango Ataulfo y de su proceso post-cosecha, proveniente de un muestreo en el año 2003, en la empacadora NATURAMEX SRL de CV del municipio de Tepic, en el estado de Nayarit, México.

-Las cepas son pleomórficas, es decir se presentan como cocobacilos y bacilos delgados.

-Todas las cepas son alfa hemolíticas, provocando sus hemolisinas un daño parcial a los eritrocitos.

-Se identificaron cinco patrones de resistencia a antibióticos siendo el predominante el de resistencia a amoxicilina/ácido clavulónico y cefazolina (betalactámicos). Con un 88% de presencia.

-El 76% de las cepas son adherentes. Se observan ocho tipos distintos de formas de adherencia: 1 sobre el cristal y 6 sobre las células HEp-2.

-El 85% de las cepas producen algún tipo de exotoxina: 44% producen citotoxinas y el 41% producen enterotoxinas.

-Sólo la cepa 23 que corresponde al 3% del total, es invasiva.

-La cepa 23 es la única que tiene los 5 tipos de factores de virulencia estudiados: hemólisis tipo alfa, resistencia a betalactámicos (modificando la proteína de unión a penicilinas o produciendo enzimas que destruyan a los betalactámicos), adherencia inespecífica a células HEp-2, invasivas a células HEp-2 y producción de enterotoxinas afectando la morfología de células VERO.

-Las cepas 1, 29 y 30 presentan únicamente 2 factores de virulencia de los buscados: resistencia a betalactámicos (modificando la proteína de unión a penicilinas o produciendo enzimas que destruyan a los betalactámicos) y hemólisis tipo alfa.

-Las condiciones de corrida de PFGE estandarizadas para la colección de cepas de *Enterobacter* aisladas del mango y de su proceso de post-cosecha, son: Rango de pulsos 5s (inicial) y 50s (final), tiempo de corrida 20h, 6V, 14°C, amortiguador TBE

0.5X, 1% de agarosa. Para la digestión del ADN se usa *XbaI*: 30U en un volumen final de 200µl.

- PFGE permitió determinar que no hay clonalidad entre esta colección de cepas de *Enterobacter* aisladas dentro de un tiempo y espacio definidos, independientemente de que hayan provenido de un mismo lugar o pertenezcan a la misma especie. No son ecotipos.

- El porcentaje más cercano de similitud genética entre alguna de las cepas es del 57%, lo cual es insuficiente e insignificativo estadísticamente para considerarse como probablemente similares

-La mínima similitud genética existente entre estos aislados (1-57%), se debe a: secuencias genéticas específicas e inamovibles que definen y distinguen al género *Enterobacter* y a la especie *E. cloacae* y a sus factores de virulencia.

-El tratamiento hidrotérmico beneficia al consumidor de mango y es eficiente: disminuyó la patogenicidad de las cepas aisladas.

-La cadena de control microbiológico, en cuanto a patogenicidad se refiere, no se perdió: *E. cloacae* aislada del mango empacado continuó con la misma o menor patogenicidad de cuando se muestreó el mango tratado hidrotérmicamente e hidrogenfriado.

9. APÉNDICE

ABREVIACIONES

MEM Medio Mínimo Esencial de Eagle

PBS Amortiguador de Fosfatos

SFB Suero Fetal de Bovino

UFC Unidades Formadoras de Colonias

9.1 Medios, soluciones y lavado de material

Agar Sangre al 5%

Diluir 40g de base Agar sangre en 1L de agua destilada

Calentar y dejar hervir por un minuto

Esterilizar a 121°C durante 15min

Colocar en baño maría a 45°C

Agregar en condiciones de esterilidad 50ml de sangre de carnero desfibrinada

Vaciar aproximadamente 20ml en cajas petri en condiciones de esterilidad

Esperar a que gelifiquen

Se deja a prueba de esterilidad durante 24h a 37°C y se guarda a 4°C.

Agar MacConkey

Disolver 40g de base Agar en 1L de agua destilada

Calentar y dejar hervir por un minuto

Esterilizar a 121°C durante 15min

Vaciar aproximadamente 20ml en cajas petri en condiciones de esterilidad

Esperar a que solidifique

Se deja a prueba de esterilidad durante 24h a 37°C y se guarda a 4°C.

Medio Dorset

Mezclar solución solina fisiologica con huevos enteros de gallina en proporción 1:3.

Coagular a 80°C por 60min

Distribuir en tubos de rosca con tapa e incubar toda la noche para control de esterilidad y se guarda a 4°C.

Agar de Soya Trypticaseina (TSA)

Disolver 17g de digerido pancreático de tripsina, 3g de digerido enzimático de soya, 2.5g de dextrosa, 5g de Cloruro de Sodio y 2.5g de Fosfato Dipotásico en 1L de agua destilada

Calentar y dejar hervir por 1min

Esterilizar a 121°C por 15min

Vaciar aproximadamente 20ml en cajas petri en condiciones de esterilidad

Esperar a que solidifique

Se deja a prueba de esterilidad durante 24h a 37°C y se guarda a 4°C.

Caldo Luria

Disolver 10g de NaCl, 5g de Extracto de Levadura y 10g de Bacto Tristona en 1L de agua destilada y llevar a un pH de 7.

Esterilizar a 121°C por 15min

Reactivo de oxidasa

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina 0.1 g

Agua para llevar a 1000 cm³

Este reactivo no es estable y por consiguiente debe prepararse para utilizarlo en pequeñas cantidades cada vez que se necesite.

Solución D-Manosa al 10%

Diluir 10g de D-Manosa en 100ml de agua destilada

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 y se guarda a 4°C.

Triptona al 1%

Diluir 1g de Tristona en 100ml de agua destilada

Distribuir 3ml en tubos de 13 x 100 con rosca

Tapar los tubos y esterilizar a 121°C durante 15min

Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C y se guarda a 4°C.

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM)

Agregar 100ml de MEM 10x a 900ml de agua desionizada estéril (ó agregar el contenido sólido de un frasco de MEM) en condiciones de esterilidad.

Agregar 10ml de L-glutamina

Agregar 10ml de una mezcla de antibióticos (Penicilina-Streptomicina)

Agregar 10ml de Bicarbonato de sodio pH 7.4-7.6 al 80%

Agregar 10ml de HEPES

Agregar 50ml de SFB inactivado.

Se filtra toda la mezcla con una membrana de 0.22m ayudado por una jeringa de 60ml

Se recibe el filtrado en frascos previamente tratados y esterilizados

Se tapan se etiquetan

Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C y se guarda a 4°C.

MEM sin suero y sin antibiótico

Para 250ml, se adicionan 225ml de H₂O esteril desionizada, 2.3475g de MEM, 2.5ml de glutamina 1%, 2.5ml de bicarbonato 7.5%, 2.5ml de HEPES.

Se filtra toda la mezcla con una membrana de 0.22m ayudado por una jeringa de 60ml

Se recibe el filtrado en frascos previamente tratados y esterilizados

Se tapan se etiquetan

Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C y se guarda a 4°C.

MEM para ensayo de invasividad

Se utilizan 24.58ml de MEM sin suero y sin antibiótico estéril y se adicionan 45µl de gentamicina 50mg/ml (para una concentración final de 90µg/ml) y 375µl de lisozima 200mg/ml (para una concentración final de 30µg/ml).

MEM 2x sin suero y sin antibiótico para ensayo de citotoxicidad

Para preparar 50ml, se requieren: 0.93g de MEM disueltos en 46ml de agua estéril y desionizada, adicionar posteriormente 1ml de glutamina 1%, 2ml de bicarbonato al 7.5% y 1ml de HEPES.

Se filtra toda la mezcla con una membrana de 0.22m ayudado por una jeringa de 60ml

Se recibe el filtrado en un frasco previamente tratado y estéril

Se tapa y etiqueta

Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37°C y se guarda a 4°C.

Colorante Giemsa

Se pesa 1g de colorante Giemsa

Se agrega a 54ml de Glicerol en agitación

Se agregan 84ml de Metanol

Se filtra y se envasa en un frasco ámbar

PBS

Se agregan 8g de NaCl a 800ml de agua destilada en agitación

Se agregan 0.2g de KCl

Se agrega 1.15g de fosfato de sodio dibásico

Se agregan 0.2g de fosfato de potasio monobásico

Se ajusta a pH de 7.2

Se afora a 1000ml

Se pone en frascos y se esteriliza

Solución salina a 0.45%

Se diluyen 4.5g de NaCl en 1L de agua destilada

Se pone en tubos cónicos de 100ml

Se esteriliza a 121°C durante 15min y se guarda a 4°C.

Lavado de material de vidrio para cultivo celular (nuevo)

Se enjuaga de 3-5 veces el material con agua desionizada

Se seca a 120°C durante 1h

Se esteriliza a 120°C en calor húmedo por 30min

Lavado de material de vidrio para cultivo celular (usado)

Se enjuaga con agua corriente el material sucio

Se enjuaga de 3-5 veces el material con agua desionizada

Se sumerge en hipoclorito de sodio al 10% por 24h

Se enjuaga con agua corriente el material sucio y se pasa a una solución de ácido clorhídrico al 2% por 24h

Se enjuaga 10 veces con agua desionizada

Se seca a 100°C durante 1h

Se envuelve y se esteriliza a 120°C en calor húmedo por 30min

9.2 Soluciones para PFGE

Se considera preparar soluciones stock a concentraciones determinadas y preparar las soluciones de trabajo en el momento de ser utilizadas con agua estéril grado biología molecular y se almacenan a temperatura ambiente y así pueden permanecer en buen estado hasta por 1 año.

Las soluciones stock deberán ser esterilizadas por autoclave y los detergentes (brij58, desoxicolato y sarcosil) mediante filtración.

Las enzimas se preparan en agua estéril grado biología molecular en concentración stock y se almacenan a -20°C.

SOLUCIÓN PIV

Solución stock	C. inicial	C. final	100 ml sol.
Tris-HCl	2M (pH 7.6)	10mM	0.5ml
NaCl	5M	1M	20ml
			H2O 79.5ml

SOLUCIÓN LISIS

Solución stock	C. inicial	C. final	100 ml sol.
Tris-HCl	2M (pH 7.6)	6mM	0.3ml
NaCl	5M	1M	20ml
EDTA	0.5M (pH 9-9.5)	100mM	20ml
Brij58	10%	0.5%	5ml
Desoxicolato	10%	0.2%	2ml
Sarcosil	20%	0.5%	2.5ml
Lisozima	10mg/ml	100µg/ml	1ml
Rnasa	10mg/ml	20µg/ml	0.2ml
			H2O 49ml

SOLUCIÓN ESP

Solución stock	C. inicial	C. final	100 ml sol.
EDTA	0.5M (pH 9-9.5)	0.5M	93ml
Sarcosil	20%	1%	5ml
Proteinasa K	10mg/ml	200µg/ml	2ml

AMORTIGUADOR TE

10 mM Tris-HCl (pH= 8), 1mM EDTA (pH= 8)

Para 1 L mezclar: 10 ml Tris 1M pH= 7,5; 2 ml EDTA 0,5M pH= 8; 988 ml agua bidestilada. Hacer alícuotas de 500 ml ó 1 L

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya M.R. y Shan R.K. (1999). Some microbiological and chemical attributes of mango pulp samples. *Journal of Food Science and Technology India*, 56:4, 339-341.
- Ackerman J (2002). Food: How safe? How altered? *National Geographic*, Mayo.20-21.
- Arbeit, R.D. (1995). Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190–208. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Atlas R.M. y Bartha R. (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 3a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, pp. 563.
- Aruscavage D., Lee K., Miller S. y Lejeune J.T. (2006). Interactions Affecting the Proliferation and Control of Human Pathogens on Edible Plants. *Journal of Food Science*. Vol. 71. No. 8.
- BioMerieux – Manual de entrenamiento del sistema de identificación microbiana Vitek. Marcy – I’Etoile France.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A. & Bernárdez M.I. (2001) Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. Capítulo 21. *Manual de Microbiología Veterinaria*, S. Vadillo, S. Píriz & E. Mateos. Editorial McGRAW-HILL INTERAMERICANA, Madrid, España, pp.301-325.
- Burchard KW, Barroll DT, Reed M, Stotman GJ. Enterobacter bacteremia in surgical patients. *Surgery* 1986;100: 857-61.
- Busse, H., Denner, E.B.M., Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47, 3-38.
- Castro-Rosas, J., Cerna, J., Reyes, E., Santos, E., Zúñiga, A., Gómez, C. y Estrada, T. (2005-A). Frecuencia y concentración de coliformes

termotolerantes, *Escherichia coli* y grupos patógenos de *E. coli* en ensalada de verduras crudas listas para su consumo obtenidas de restaurantes. Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

- Castro-Rosas, J., Ramírez, L., Santos, E., Zúñiga, A. y Gómez, C. (2005-B). 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.
- Chow JW, Fine MJ, Schlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. Enterobacter bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* 1991; 115:585-90.
- Chu G., Vollrath D. y Davis R.W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 234: 1582-1585.
- Comisión Nacional de Fruticultura. (1974). El mango en México. Serie de Investigaciones fisiológicas No. 3 SAG/México.
- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, y B. Rowe. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95-99.
- Cruz, A. (2004). Determinación de patógenos entéricos en germinados de alfalfa. Tesis de maestría IPN, México.
- Díaz, G. y Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*. 45:1-2, pp. 30-40.
- Eisenstein, B. I. (1989). New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.* 161:595-602.
- Eisenstein BI, Zaleznik DF.(2000). Enterobacteriaceae. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone; p. 2294-310.
- Erkan M., Wang C.Y. y Krizek D.T. (2001) UV-C irradiation reduces microbial populations and deterioration in *Cucurbita pepo* fruit tissue. *Environmental and Experimental Botany*, 45:1-9.

- Farmer JJ III. (1999). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editores. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology; p. 442-57.
- Finney, M. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis,. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), Current protocols in molecular biology, Current Protocols, Greene-Wiley, New York. Vol. 1. p. 2.5.9–2.5.17.
- Food and Agricultural Organization, FAO. (2003). Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Mango. Disponible en: <http://www.apps.fao.org/faostat>.
- Gautom RK. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol; 35:2977-2980.
- Gurtler J.B., Kornacki J.L. y Beuchat L. (2004). *Enterobacter sakazakii*: una preocupación creciente para la salud infantil, International Journal of Food Microbiology. Lancet, 363:25-26.
- Gordillo, M. E., K. V. Singh, C. J. Baker, and B. E. Murray. (1993). Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 31:1430–1434.
- Gouby a., Neuwirth C., Bourg G., Bouziges N,. Carles-Nurit M., Dexpaux E. y Ramuz M. (1994). Epidemiological study by pulsed-field electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -Lactamase-producing Klebsella pneumoniae in a Geriatric Hospital. J. Clin. Microbiol., 32, 301.
- Gutiérrez, M., Molina, J.,Lopez, R. y Manjarrez, M.E. (2003). Microbiología y Parasitología Médica. 3a edición, Méndez Editores. México, D.F., Capítulos 5,6,8
- Hames, W.P. y Vogel,R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. En: The genera of lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria. Wood, B.J.B. y Holzapfel. Vol.2. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland, pp 19-54.

- Harrigan W.F. y Mccance M. (1998). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academy Press, Londres, pp. 312-316.
- Hartstein,A.I.,P. Chetchotisakd,C.L. Phelps y A. I. Hartstein. (1995). Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Diag. Microbiol.Infect. Dis.* 22:309-314.
- Hoffmann, Harald and Andreas Roggenkamp. (2003). "Population genetics of the nomenclature *Enterobacter cloacae*." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 9. American Society for Microbiology. (5306-5318).
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2009). Consulta de bases de datos de cultivos perennes - superficie plantada - en desarrollo y producción - 2007 – nacional. Disponible en: www.inegi.org.mx
- Jones, N., Ougham, H. y Thomas H. (1997). Markers and mapping: we are all genetics now. *New Phytol*, 137, 165-177.
- John JR Jr, Sharbough RJ, Bannister ER. (1982). *Enterobacter cloacae* bacteremia: epidemiology and antibiotic resistance. *Rev Infect Dis.*; 4:13-28.
- Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition. (2009). GAP's. University of Maryland. Disponible en: www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS_espanol/espanol.pdf
- León, F.M. (1982). Industrialización de variedades de Mango Kent y Keitt. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., pp.15.
- Lipuma, J. J. (1998). Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:667-675.
- Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., Read S.C., Rahn K., Renwick S.A., Sandhu K.A., Alves D., Karmali M.A., Lior H., Mcewen S.A., Spika J.S y Gyles C.L. (1996). Growing Concerns and Recent Outbreaks Involving Non-O157:H7 Serotypes of Verotoxigenic *Escherichia Coli*. *J. Food Protect.* 59, 1112–1122.
- Mac Faddin, J.F., (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 45-190.
- Maslow J. N., Slutsky A.M., y Arbeit R.D. (1993). Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-572. En Persing D.H., Smith

T.H., Tenover F.C. y White T.J. (ed.), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Maule C. J. 2001 Pulsed-field Gel Electrophoresis. Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature publishing Group, pp 1-7.

- McCartney, A.L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. British Journal of Nutrition, 88 (Suppl. 1) 529-537.
- Mukherjee S.K. (1997). History, origin and botany. Chapter 1. En: The mango handbook. Indian Council of Agriculture Research. New Delhi.
- Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. & Tenover F.C. & Tenover R.H. (Eds.) (1999). Manual of clinical microbiology (7^a Ed.). Capítulos dedicados a las enterobacterias: 27 a 30. ASM Press, Washington, USA, pp. 442-496.
- O'Connor – Shaw R.E., Guthrie J.A., Dunlop K.J. y Roberts R. (1995) Coliforms in processed mango: Significance and control. International Journal of Food Microbiology, 25:51-61.
- Penteado A.L., Eblen B.S. y Millar A.J. (2004). Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect desinfection procedures. Journal of Food Protection, 67: 181-184.
- Pérez, J.A. (2007). Determinación de la fuente de contaminación con enterobacterias en el tratamiento post-cosecha del mango. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 2-3.
- Pouch D.F. e Ito K. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. 4^{ta} edición. 2001, pp 154-156.
- Riley, L. (2004). Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices. Edit. Asm. Press, Washington D.C., pp. 30-83.
- Rivera, F., Leyva-López, N., y Méndez, J. (2005). Detección molecular de las bacterias de *Salmonella* y *Shigella* por PCR en frutas y hortalizas de consumo en fresco. Inocuidad Alimentaria. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México.

- Romero, G., Bonilla, N., Cabrera, C. y Silva, G. (2003). Bacteriological contamination of water and lettuce in Puebla (Mexico). Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.
- Rollan M., Mónaco C., Lampugnani C. y Arteta N. (1998). Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiotum* en el suelo por la aplicación de agroquímicos, p.27. En: Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina.
- Rozenberg-Arska M, Visser MR. (1999). Enterobacteriaceae. En: Armstrong D, Cohen J, editores. Infectious Diseases. London: Harcourt Publishers; Sección 8:17.1-17.12.
- SAGARPA (2009). Avance de siembras y cosechas perennes. Disponibles en: http://reportes.siap.gob.mx/Agricola_siap
- Sassi A. (2003). Diversidad microbiana presente en mango (*Mnagifera indica L.*). Tesis de Maestría. Universidad Federal de Santa Maria, Santa Maria, Santa Maria.
- Schneegurt, M. A., Kulpa Jr. Y Charles F. (1998). The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. Biotechnol. Appl. Biochem., 27, 73-79.
- Slutsker L, Ries AA, Maloney K, Wells JG, Greene KD, Griffin PM. (1998). A nationwide case-control study of Escherichia coli O157:H7 infection in the United States. J Infect Dis.; 177: 962-6.
- Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. (2003). Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ED). Manual of Clinical Microbiology. 8ª Edición. American Society for Microbiology. Washington DC.; pp 139-161.
- Soriano, J.M., Rico, H., Moltó, J.C. y Mañes, J. (2001). Incident of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potatoe omelette from restaurants. Food Microbiology. 18(2):159-163.

- Swaminathan B. y G. M. Matar. (1993). Molecular typing methods: definition, applications, and advantages, p. 26–50. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Temmerman, R., Huys, G. y Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15,348-359.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RB, Mickelsen BA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produce by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
- 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 Alimentos, en el caso de Frutas y Vegetales*.
- Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. y Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. Vol. 60, pág. 407.
- Van de Peer, Y. y De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.
- Watanabe, K., Abe, K. y Sato, M. (2000). Biological control of an insect pest by gut-colonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene *Journal of Applied Microbiology* 88: (1); 90.