



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Evaluación de la propagación de *Salmonella*
Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada
en tomate cherry para la colonización del
tracto gastrointestinal y el desarrollo de la
infección sistémica en el modelo murino
(*Mus musculus* BALB/c)**

Tesis

para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Lilia Mercedes Mancilla Becerra

Jeannette Barba León

DIRECTOR

Zapopan, Jalisco

Noviembre de 2019



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Evaluación de la propagación de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en tomate cherry para la colonización del tracto gastrointestinal y el desarrollo de la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus* BALB/c)

Por

Lilia Mercedes Mancilla Becerra

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



Dra. Jeannette Barba León
Director de Tesis e integrante del jurado

17-Sep-2019
Fecha



Dr. César Pedroza Roldán
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

17/09/2019
Fecha



Dr. Mario Alberto Ruiz López
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

18/09/19
Fecha



Dr. Mario Alberto Flores Valdez
Sinodal e integrante del jurado

19/sep/2019
Fecha



Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
Sinodal e integrante del jurado

17/septiembre/2019
Fecha

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Caracterización Molecular de Patógenos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara bajo la dirección de la Dra. Jeannette Barba León y la asesoría del Dr. César Pedroza Roldán, Dr. Mario Alberto Ruiz López, Dr. Mario Alberto Flores Valdez y Dra. Carla V. Sánchez Hernández. Con el financiamiento del proyecto “Evaluación de la expresión de reguladores y determinantes de patogenicidad de *Salmonella enterica* internalizada en tomates (*Solanum lycopersicum*) higienizados con hipoclorito de sodio” fondo SEP-CONACyT, clave CB-2014-238806 y la beca 631103 para estudios de maestría a la M.V.Z. Lilia Mercedes Mancilla Becerra proporcionada por el CONACyT

A mi familia

"En la vida hay algo peor que el fracaso: el no haber intentado nada"

— Franklin D. Roosevelt

Agradecimientos

A Dios por haberme dado vida, salud y fortaleza. A mis padres, Lilia Leticia Becerra y Samuel Mancilla Ocampo, porque sin su sacrificio y esfuerzo, no estaría escribiendo estas líneas. A mi amiga incondicional y cómplice, mi hermana Lilia Guadalupe Mancilla Becerra, que siempre estuvo a mi lado brindándome su apoyo en todo momento.

A mi maestra, Silvia Ruvalcaba Barrera, que siempre creyó en mí y gracias a ella tuve la oportunidad de vivir esta grata experiencia de pertenecer a un posgrado. A mi novio Emmanuel Flores Quezada, que siempre estuvo apoyándome, sobre todo en los momentos más difíciles, por siempre estar ahí para mí, por siempre estar dispuesto a ayudarme sin saber qué le esperaba en el laboratorio. A mi roomie y compañero de maestría Israel Elizalde, que siempre tuvo disposición para explicarme lo que no entendía de estadística y de hacer más amenas las presentaciones de seminario junto con el siempre sonriente Uriel. A mis amigos de toda la vida, Edmundo, Orel, Lalo y Mimi, que nunca estuvieron ausentes durante este proyecto. A mi querido perro Snoopy, que siempre me recibió feliz sin importar la hora en la que llegara y permanecía en mis pies mientras escribía esta tesis.

A mi directora de tesis la Dra. Jeannette Barba León, por creer en mis capacidades y por confiarme este proyecto el cual no fue nada fácil, por estar siempre pendiente de mí y no solo en el ámbito académico, sino también en el personal. Al mis asesores el Dr. Cesar Pedrosa Rolan y al Dr. Mario Alberto Ruiz, que nunca me dejaron sola en mis exposiciones. Al Dr. Mario Alberto Flores por su gran ayuda al realizar la parte estadística del trabajo. A la Dra. Carla Vanessa Sánchez por enseñarme lo impresionante que son las plantas. A la Dra. Georgina Quiroz que me acompañó durante estos dos años como mi maestra de seminario.

A la Dra. Patricia Zarazúa por apoyarnos durante la maestría como excelente coordinadora y por supuesto a Juri Graciela Mercado García por hacer un excelente trabajo y siempre recibirme con una sonrisa. A mis chicos de servicio: Omar, Priscila, Cristina, Graciela y Jalit, que sin ellos este proyecto no se hubiera terminado en tiempo y forma.

Y, por último, pero no por ello menos importante, a mi Alma máter La Universidad de Guadalajara, que me ha dado las bases para seguir preparándome y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de manutención durante mis estudios de maestría.

Índice

Dedicatoria.....	1
Agradecimientos.....	2
Lista de figuras	6
Lista de cuadros	7
Abreviaturas.....	8
Resumen	9
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	12
Historia y clasificación de <i>Salmonella</i>	12
Características generales del género <i>Salmonella</i>	13
Factores de virulencia	14
Proceso de infección de <i>Salmonella</i> en el modelo murino	17
Fiebre entérica y Salmonelosis	18
Interacción de <i>Salmonella</i> con las plantas y el tomate	22
3. Planteamiento del problema y justificación	24
4. Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos	25
5. Hipótesis.....	26
6. Materiales y métodos.....	27
Cepas de trabajo.....	27
Características del tomate tipo cherry.....	27
Preparación del inóculo.....	28

Inoculación de los tomates cherry con <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo	28
Inoculación de los tomates cherry con <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo higienizados con hipoclorito de sodio	29
Recuperación de células internalizadas en los tomates cherry	29
Preparación del inóculo de <i>Salmonella</i> suspendida en Solución Salina Fisiológica al 0.85%	30
Condiciones y área de manejo para la inoculación del modelo murino	31
Inoculación de los ratones BALB/c con <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo suspendidas en SSF al 0.85%	32
Registro de signos clínicos.....	33
Extracción de órganos.....	33
Recuperación de células de <i>Salmonella</i> internalizadas en tracto gastrointestinal, bazo e hígado	34
Confirmación de las colonias viables cultivables recuperadas de los órganos	34
Imágenes	34
Análisis estadísticos	34
7. Resultados y discusión	35
Colonización de <i>Salmonella</i> Newport en el modelo murino (<i>Mus musculus</i> BALB/c).....	35
Colonización de <i>Salmonella</i> Saintpaul en el modelo murino (<i>Mus musculus</i> BALB/c).....	45
Colonización de <i>Salmonella</i> Montevideo en el modelo murino (<i>Mus musculus</i> BALB/c).....	49

Comparación de la infección de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo en ratones BALB/c	53
8. Conclusión y perspectivas	57
9. Literatura citada	58
10. Anexos	66
Anexo A. Medios para la preparación de Luria de Bertani (LB).....	67
Anexo B. Certificados de calidad y salud de ratones BALB/c	68
Anexo C. Diseño de jaulas	74
Anexo D. Formato de evaluación de signos clínicos	75
Anexo E. Carta de aprobación expedida por parte del Comité de Bioética para el desarrollo del protocolo de experimentación en animales. ..	76
Anexo F. Curso de capacitación de manejo y vías de administración en ratón	78
Anexo G. Procedimiento de la inoculación con sonda	79
Anexo H. Procedimiento de eutanasia en ratones	80
Anexo I. Preparación PBS	81

Lista de figuras

Figura 1. Factores de virulencia de <i>Salmonella enterica</i>	15
Figura 2. Propagación de <i>Salmonella</i> Typhimurium en el modelo murino	18
Figura 3. Mecanismo de transmisión de <i>Salmonella</i> no tifoidea	19
Figura 4. Diferencias de la cicatriz del pedúnculo.	28
Figura 5. Preparación del inóculo en Solución Salina Fisiológica al 0.85%	31
Figura 6. Mediana de UFC inoculadas a ratones vía oral con <i>Salmonella</i> Newport	36
Figura 7. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Newport t: 0h sin CI en tomate	39
Figura 8. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Newport en t: 3d sin CI en tomate	40
Figura 9. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Newport en SSF y recuperada del tomate	41
Figura 10. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Newport	43
Figura 11. Correlación de las UFC recuperadas en órganos con los signos clínicos	44
Figura 12. UFC inoculadas a ratones vía oral con <i>Salmonella</i> Saintpaul	46
Figura 13. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Saintpaul	48
Figura 14. UFC inoculadas a ratones vía oral con <i>Salmonella</i> Montevideo	50
Figura 15. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Montevideo ..	52
Figura 16. UFC de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo recuperadas de heces.....	54
Figura 17 UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i>	56

Lista de cuadros

Cuadro1. Número de serovares en cada especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	13
Cuadro2. Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella</i>	14
Cuadro3. Diferencias entre <i>Salmonella</i> no tifoidea y los serovares tifoideos asociados con la enfermedad en humano	20
Cuadro 4. Brotes de <i>Salmonella</i> asociados al consumo de tomate crudo	21
Cuadro 5. Cepas utilizadas durante la investigación	27
Cuadro 6. Organización de grupos de experimentación	32
Cuadro 7. Recuperación de células de <i>Salmonella</i> Newport en órganos	38
Cuadro 8. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con <i>Salmonella</i> Newport en SSF y recuperada del tomate no higienizado con hipoclorito de sodio.....	41
Cuadro 9. Recuperación de células de <i>Salmonella</i> Saintpaul en órganos	47
Cuadro 10. Recuperación de células de <i>Salmonella</i> Montevideo en órganos	51
Cuadro 11. UFC de <i>Salmonella</i> Newport y Montevideo recuperadas en heces.....	55

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados Celsius
Cl	Cloro
Fe ²⁺	Hierro
g	Gramos
h	Horas
Kb	Kilobases
KHz	Kilohercio
Hz	Hercio
L	Litro
Mg ²⁺	Magnesio
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Mol
µm	Micrómetros
min	Minutos
Nº/n	Número
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>Spv</i>	(<i>Salmonella</i> plasmid virulence) Plásmido de virulencia de <i>Salmonella</i>
t	Tiempo
UFC	Unidades formadoras de colonia

Resumen

La salmonelosis es producida por *Salmonella enterica* y es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas en todo el mundo. Se ha demostrado que *Salmonella* puede internalizarse, moverse y permanecer en plantas y fruto de tomate, siendo los serovares de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo los aislados con más frecuencia en brotes ocasionados por el consumo de tomate en crudo. En este estudio se inocularon vía oral a 6 ratones BALB/c de 5 a 6 semanas de edad durante 6 días continuos, con *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo suspendidas en solución salina fisiológica al 0.85% o recuperadas del interior del tomate cherry con dos tiempos de incubación post-inoculación. Se determinaron cuentas viables del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de los animales infectados un día después del periodo de inoculación. Los resultados obtenidos sugieren que *Salmonella* Newport es la más eficiente de los tres serovares estudiados en la colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de ratones BALB/c, ya que se recuperó en el 83% y 100% de los individuos inoculados con *Salmonella* Newport internalizada en el tomate a las 0 horas y 3 días post-inoculación, respectivamente. En contraste, sólo 50% de los individuos inoculados con *Salmonella* Newport suspendida en SSF al 0.85% reportó colonias recuperadas. Para *Salmonella* Saintpaul solo se recuperaron UFC en el 50% de los individuos en el tracto gastrointestinal inoculados con esta cepa suspendida en SSF al 0.85% y con *Salmonella* Montevideo no se obtuvieron de UFC en órganos. Cabe destacar que el 74.46% de los órganos en donde se recuperaron UFC en las 3 cepas corresponde a grupos inoculados vía oral con *Salmonella* internalizada en el tomate y el 25.53% restante corresponde a grupos inoculados con *Salmonella* suspendida en SSF al 0.85%; un fenómeno similar se observa en las UFC recuperadas en las heces, donde hubo una mayor recuperación de cuentas viables en los grupos inoculados con *Salmonella* internalizada en el tomate, que con los grupos inoculados con *Salmonella* suspendida en SSF al 0.85%.

Abstract

Salmonellosis is produced by *Salmonella enterica* and is one of the four main causes of diarrheal diseases worldwide. It has been shown that *Salmonella* can be internalized, move and remain in plants and tomato fruit, being the serovars of *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo the most frequently isolated in outbreaks caused by the consumption of raw tomato. In this study, 6 BALB / c mice (5 to 6 weeks-old) were orally inoculated for 6 days in a row, with *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo suspended in 0.85% of physiological saline solution or recovered from inside of cherry after two post-inoculation incubation times. Gastrointestinal tract, spleen and liver viable *Salmonella* counts recovered from infected animals were determined one day after the inoculation period. The results obtained suggest that *Salmonella* Newport is more efficient in the colonization of the gastrointestinal tract, spleen and liver of BALB / c mice, since it was recovered in 83% and 100% of the individuals inoculated with *Salmonella* Newport internalized in tomato at 0 hours and 3 days post-inoculation, respectively. In contrast, only 50% of individuals inoculated with *Salmonella* Newport suspended in 0.85% SSF reported recovered colonies. *Salmonella* Saintpaul, reported CFU only in the 50% of the individuals in the gastrointestinal tract inoculated with this strain suspended in 0.85% SSF and *Salmonella* Montevideo did not report CFU in organs. It should be noted that 74.46% of the organs where CFU were recovered in the 3 strains correspond to groups inoculated orally with *Salmonella* internalized in the tomato and the remaining 25.53% corresponds to groups inoculated with *Salmonella* suspended in SSF at 0.85%. A similar phenomenon was observed in the CFUs recovered in the feces, where the groups inoculated with *Salmonella* internalized in the tomato reported a greater amount of recovered bacteria, compared to the observed with the groups inoculated with *Salmonella* suspended in 0.85% SSF.

1. Introducción

La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones. *Salmonella enterica* está presente en el tracto gastrointestinal de los humanos y los animales, tanto de granja como de aves silvestres, reptiles y ocasionalmente en insectos. La subespecie Entérica incluye numerosas cepas patógenas para el hombre y se estima que el 99% de los casos de salmonelosis, están causados por miembros de esta subespecie. Uno de los principales vehículos de la infección ocasionada por *Salmonella* puede ser a través del manejo de animales, contacto fecal-oral o a través de la contaminación de los alimentos. Por lo anterior, *Salmonella enterica* da origen frecuentemente a enfermedades conocidas como “intoxicaciones alimentarias” y se puede encontrar en una gran variedad de alimentos como carne de res, pollo, cerdo, huevos, mariscos, frutas, verduras e incluso alimentos procesados como mantequilla, tartas congeladas, nuggets de pollo, etc.

Actualmente las frutas y los vegetales son considerados como uno de los componentes principales para una dieta saludable, pero comer productos frescos crudos no está exento de riesgos. Múltiples reportes confirman que a partir de la década de los 70s aumentaron considerablemente los registros de brotes de enfermedades gastrointestinales asociados al consumo de productos frescos como sandía, tomate, lechuga, melón, col y jugo de frutas, donde la contaminación de los frutos y vegetales es superficial o internamente. La internalización es el proceso por la cual, agentes externos presentes de forma extracelular son engullidos por la membrana celular y son atraídos hacia la célula. En el caso de la internalización de *Salmonella* en vegetales, ésta puede estar presente en el medio ambiente y migrar al interior del apoplasto de la célula vegetal y así evitar ser eliminada mediante los tratamientos regulares de higienización, lo cual podría aumentar el riesgo de padecer salmonelosis al consumir, alimentos crudos.

2. Antecedentes

Historia y clasificación de *Salmonella*

En 1880 *Salmonella* fue observada por primera vez por Karl Joseph Eberth y fue nombrada como Eberthella typhosa (*Salmonella* Typhi), cuatro años después fue aislada por Georg Gaffky. Posteriormente, Theobald Smith, que trabajó junto con Daniel E. Salmon, aisló a *Salmonella* Choleraesuis y en 1888, Gairdner hizo lo mismo con el primer caso de salmonelosis humana confirmado por laboratorio y asociado al consumo de alimento. A inicios del siglo XX, Joseph Léon Marcel Lignieres propuso cambiar el nombre del género a *Salmonella* en honor a D. E. Salmon [1] y en 1934 se publicó la primera clasificación del género (esquema de Kauffmann-White) en donde se enumeraron 44 serovares o serotipos. En 1965, cuando F. Kauffmann se retiró, el esquema contenía 958 serovares, cifra que aumentó a 2,267 serovares 24 años después, cuando L. Le Minor finalizó su periodo en el Instituto Pasteur. Finalmente, con el retiro de M. Y. Popoff en el 2013, el registro ya contaba con 2,555 serovares [2] y continúa aumentando.

El sistema de clasificación actual (esquema de Kauffmann-White-Le Minor) se basa en los determinantes antigénicos de los serovares de *Salmonella* y se efectúa con base al antígeno somático (O) y flagelar (H). Cada bacteria tiene un patrón específico para los epítomos O y H, con base al cual se establece un esquema de tipificación. Algunos serovares sólo producen un único tipo de antígeno H y los bacilos tifoideos, adicionalmente, tienen un antígeno capsular asociado a la virulencia (Vi) [3].

El género *Salmonella* consiste en sólo dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* a su vez, se divide en seis subespecies: *Salmonella enterica* subsp. Entérica, *Salmonella enterica* subsp. Salamae, *Salmonella enterica* subsp. Arizonae, *Salmonella enterica* subsp. Diarizonae, *Salmonella enterica* subsp. Houtenae y *Salmonella enterica* subsp. Indica. Los serovares pertenecientes a *Salmonella enterica* subespecie Entérica son típicamente designados por el lugar geográfico donde fueron aislados por primera vez, escribiéndose el serovar con letras romanas sin cursivas y la primera letra en mayúsculas. La actualización del esquema de Kauffmann-White-Le Minor es

responsabilidad de la OMS con la colaboración del Instituto Pasteur en París, Francia. El número de serovares por especie y subespecie se muestran en la Cuadro 1 [4].

Cuadro 1. Número de serovares en cada especie y subespecie de *Salmonella*

Especie	Subespecies	Número de serovares
<i>Salmonella enterica</i>	Entérica	1,586
	Salamae	522
	Arizonae	102
	Diarizonae	338
	Houtenae	76
	Indica	13
<i>Salmonella bongori</i>		22
	Total	2,659

Modificada de Issenhuth-Jeanjean et al. (2014) [4]

Características generales

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se caracteriza por ser un Gram negativo y tener forma de bacilo [5]; son bacterias anaerobias facultativas y miden generalmente de 2 a 5 µm de largo por 0.7 a 1.5 µm de ancho, son móviles por medio de flagelos peritricos, con excepción de los serovares Gallinarum y Pullorum, que carecen de flagelos [6]. Los tamaños del genoma de *Salmonella* varían entre serovares con rangos de 4,460 a 4,857 Kb [7]. Estas bacterias no forman esporas y provocan la fermentación de muchos carbohidratos, con la formación de ácido y gas, pero no son capaces de fermentar lactosa y sacarosa, y rara vez producen indol [8]. *Salmonella* es una bacteria de crecimiento

rápido, tiene un rango de resistencia a temperaturas variables y puede vivir en un amplio rango de pH. En cambio, una disminución en el rango de actividad de agua (a_w) puede inhibir el crecimiento de esta bacteria (Cuadro 2) [3]. *Salmonella* tiene la capacidad de respuesta a la tolerancia ácida (por sus siglas en inglés ATR), la cual se caracteriza por poseer una respuesta adaptativa a pH moderadamente ácidos, para posteriormente adaptarse a condiciones de crecimiento en ácidos fuertes, tales como los que se encuentran en el estómago [9].

Cuadro 2. Condiciones de crecimiento de *Salmonella*

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	5,2	35-43	46,2
pH	3,8	7-7,5	9,5
Actividad del Agua	0,93	0,99	>0,99

Modificada de Elika (2019) [10]

Factores de virulencia

Para poder superar los mecanismos de defensa del huésped, *Salmonella* Typhimurium posee estrategias de virulencia que se encuentran en su membrana, tales como los lipopolisacáridos (LPS), las adhesinas, los flagelos y las proteínas relacionadas con la formación de biopelículas. La mayoría de los genes que codifican los factores de virulencia se encuentran en islas de patogenicidad de *Salmonella* (por sus siglas en inglés SPI) y otros componentes de virulencia como el operón *spv* transportado por plásmido pSLT [11] (Fig. 1).

Dado que la supervivencia de un microorganismo a un nicho depende de su habilidad para adherirse, las adhesinas tales como los LPS, las fimbrias y los flagelos de *Salmonella* son estructuras que le permiten reconocer moléculas presentes en las células del huésped [12]. La estructura central de los LPS es el lípido A, y se conserva en gran parte de los serovares de *Salmonella*; en contraste las cadenas laterales de polisacáridos (O), las cuales son sintetizadas por genes ubicados en el locus *rfb* del cromosoma, son altamente polimórficas

[13]. Con respecto a las fimbrias, la secuenciación del genoma de *Salmonella* Typhimurium reveló la existencia de 13 loci fimbriales [11]. Este serovar expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión [12], entre ellas las fimbrias polares largas (por sus siglas en inglés Lpf), intervienen en la unión de *Salmonella* a las placas de Peyer en el ratón [13] mientras que para la persistencia intestinal en el modelo murino requiere de la expresión de los operones fimbriales; *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std* y *sth* [14].

Los flagelos son apéndices superficiales de *Salmonella* que cumplen con la función de motilidad, quimiotaxis y patogénesis, los cuales se componen de subunidades de una proteína denominada flagelina. La síntesis y función del sistema flagelar y de quimiotaxis requiere de la expresión de más de 50 genes que se dividen en al menos 17 operones, cuyo ensamblaje y función ocurre en respuesta a la presencia de agentes atrayentes o repelentes en el medio ambiente [15].

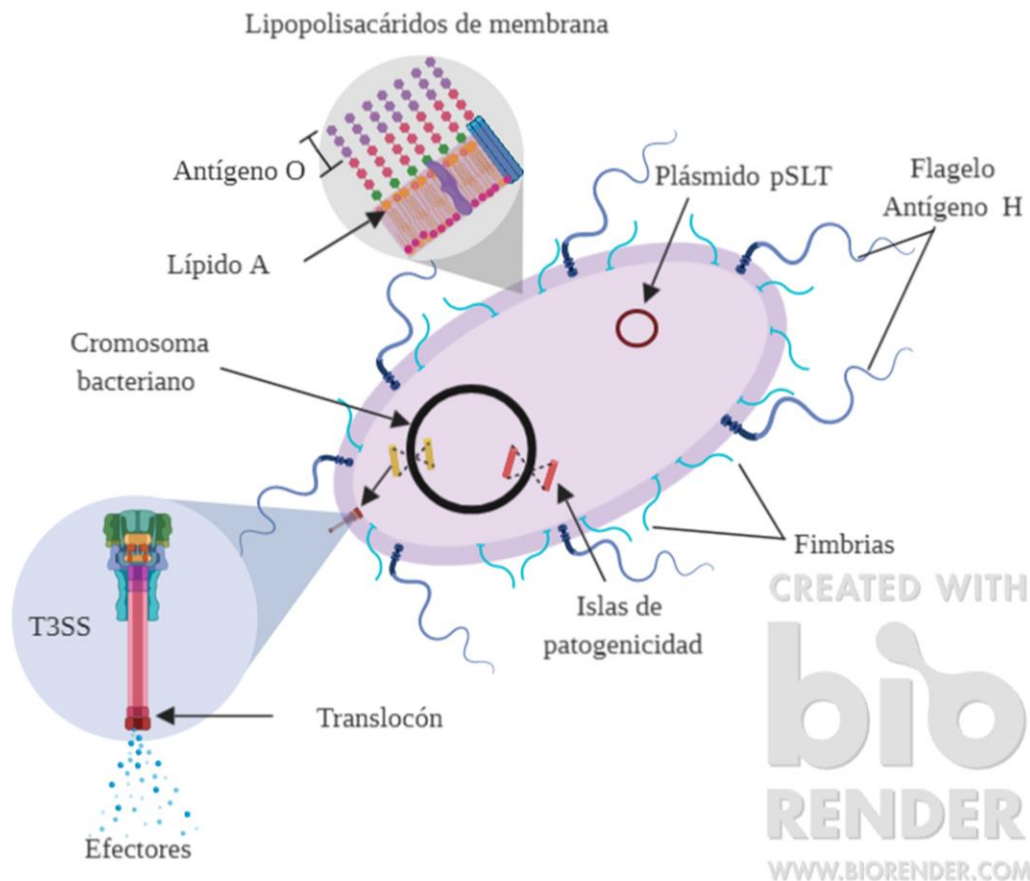


Figura 1. Factores de virulencia de *Salmonella enterica*. La figura muestra los factores más importantes para la virulencia y la patogénesis.

La mayoría de los genes que conducen la virulencia de esta bacteria y que permiten la invasión de las células epiteliales se encuentran agrupados en 6 SPI [13]. La SPI-1 codifica varias proteínas que permiten el ensamblado de una estructura conocida como sistema de secreción tipo III (por sus siglas en inglés T3SS) y la translocación de proteínas llamadas efectores a la célula huésped, como; SopE, SopE2, SopB, SipA y SipC, las cuales inducen reordenamientos de la actina del citoesqueleto y promueven la internalización de las bacterias [16, 17].

La SPI-2 se encuentra involucrada en la virulencia y supervivencia intracelular de *Salmonella*, modifica las funciones de la célula huésped, el tráfico endosomal y la destrucción oxidativa de bacterias fagocitadas. Esta isla codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-2) que secreta efectores importantes en la fase en la cual la bacteria reside dentro de un fagosoma, ubicado en el citoplasma de la célula huésped. Los efectores translocados por el T3SS-2 inhiben la maduración del fagosoma en que se encuentra la bacteria, promoviendo la biogénesis de la vacuola que contiene a *Salmonella* (por sus siglas en inglés SCV).

La SCV permite a *Salmonella Typhimurium* sobrevivir, replicarse e infectar al macrófago para alcanzar los nódulos linfáticos [18]. Otra isla de patogenicidad relacionada con el crecimiento en macrófagos y la virulencia sistémica en el modelo murino es la SPI-3. El gen *mgtC* codificado en esta isla, es requerido para la adaptación y el crecimiento de la bacteria en condiciones de bajo Mg^{2+} y pH ácido, condiciones que se encuentran en el entorno intracelular vacuolar [19].

Por su parte la SPI-4 es complementaria de la SPI-1 en los procesos de adherencia y respuesta inflamatoria. Se ha reportado que los procesos de esta isla son determinantes de la especificidad del huésped [20]. En cuanto a las islas SPI-5 y SPI-6 se ha reportado que codifican proteínas relacionadas con la mediación de la inflamación y secreción de fluidos en la mucosa del intestino [21], y para la supervivencia de los macrófagos y la invasión celular del bazo y el hígado del modelo murino, respectivamente [22].

El plásmido pSLT codifica a genes tales como *spvB*, el cual promueve la proliferación de *Salmonella* causando la despolimerización local o global de la actina, evento que afecta el tráfico vesicular o la fisiología celular, o ambos [23]. En el modelo murino, los genes *spv* no

afectan la colonización intestinal o la invasión, ya que no desarrollan enteritis en respuesta a la infección por *Salmonella*. Tampoco afecta la cantidad de bacterias recuperadas de la pared intestinal o el tejido de las placas de Peyer [13].

Proceso de infección causado por *Salmonella* en el modelo murino

Después de que *Salmonella* Typhimurium es ingerida, ésta alcanza la luz intestinal e induce su inflamación, obteniendo ventaja sobre el crecimiento de la microbiota [24]. La principal vía de invasión de *Salmonella* Typhimurium en el modelo murino es a través de las células M ubicadas en las placas de Peyer [24]; las rutas alternativas son a través de la captación de los enterocitos, las células dendríticas (DC) o leucocitos polimorfonucleares (por sus siglas en inglés PMN) los cuales pueden moverse del lumen hacia la lámina intestinal y viceversa [25] (Figura 2). La bacteria se adhiere a la superficie apical de las células por medio de las fimbrias, pili (Fim, Pef, Lpf) y fimbrias curli (Agf/Csg) [26]; en esta interacción *Salmonella* puede invadir de dos maneras, una de ellas es por el mecanismo de cremallera conocido como *Zipper*, mediado por la proteína de membrana externa Rck, la cual promueve la activación de las proteínas RhoGTPasas y la polimerización de actina, produciendo reordenamientos débiles de membrana en el sitio de entrada. El otro mecanismo, conocido como de disparo o *Trigger* [27], es mediado por los genes que se encuentran en SPI-1 que codifican el T3SS-1, por el cual *Salmonella* inyecta moléculas efectoras directamente al citoplasma de la célula huésped [25] ocasionando reordenamientos intensos de la membrana (ruffling) [27]. Las proteínas translocadas (Sop) manipulan la actina del citoesqueleto de la célula huésped y promueven la internalización bacteriana en células epiteliales por medio de endocitosis y la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera [28]. Poco después de la internalización de *Salmonella* en el enterocito, macrófago o DC, la bacteria se encierra en un fagosoma espacioso formado por volantes de membrana. Más tarde, el fagosoma se acidifica y se adhiere alrededor de la bacteria para formar la SCV [28].

El endosoma de replicación de *Salmonella* se caracteriza por tener concentraciones limitadas de Mg^{2+} , Fe^{2+} y un pH ácido [12]. Dentro de esta vacuola los genes que se encuentran en la SPI-2 codifican T3SS-2, el cual transloca proteínas efectoras a través de la membrana de la vacuola, estos efectores (Sif – Pip) contribuyen a la formación de filamentos a lo largo de los

microtúbulos para aumentar el tamaño del SCV y así adaptarse a la replicación bacteriana [17].

Las bacterias libres en el ambiente intracelular se diseminan y llegan a la sangre por vía mesentérica, entrando directamente al torrente sanguíneo o a través de los vasos linfáticos. En la sangre, *Salmonella* es captada por los fagocitos residentes del bazo y el hígado, los cuales permiten el transporte de la bacteria a dichos órganos. Al llegar al bazo y el hígado, una sola bacteria de *Salmonella* puede infectar los esplenocitos y los hepatocitos ocasionando la infección sistémica [29] (Fig. 2).

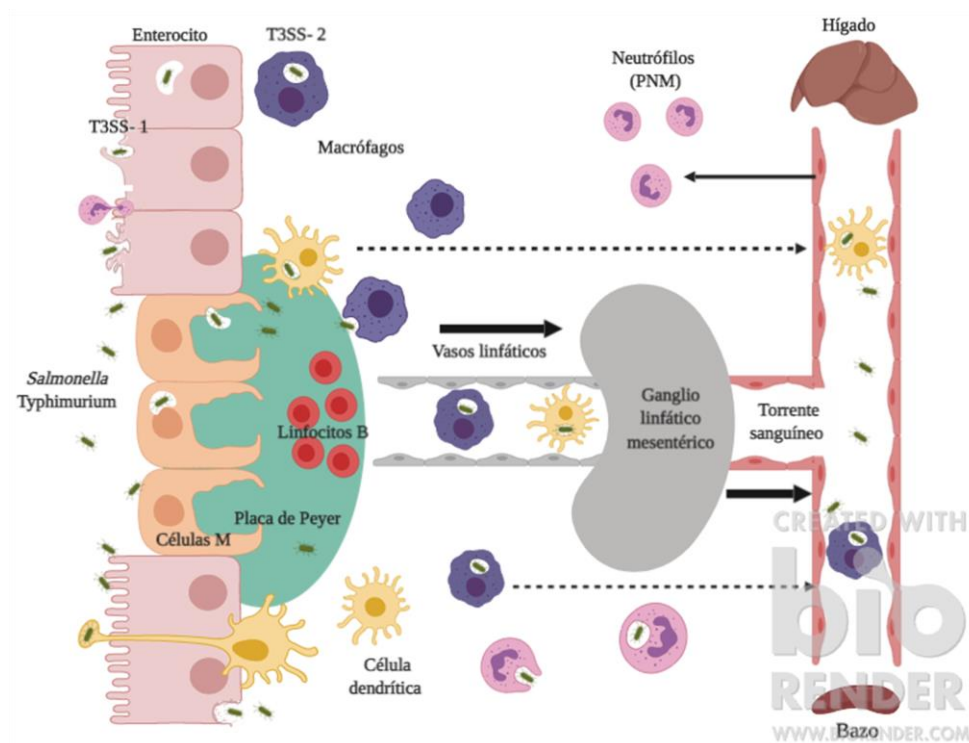


Figura 2. Propagación de *Salmonella Typhimurium* en el modelo murino. *Salmonella* invade las células epiteliales M y es engullida por macrófagos o células dendríticas. Las bacterias alcanzan los ganglios linfáticos mesentéricos y la sangre antes de ser capturados por los fagocitos e invaden el bazo y el hígado.

Fiebre entérica y Salmonelosis

Salmonella ocasiona dos enfermedades importantes para el ser humano: la fiebre entérica o fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea, padecimientos causados por *Salmonella Typhi* o *Salmonella Paratyphi* A, B y C, respectivamente. La diferencia entre ambas enfermedades son los síntomas clínicos y la tasa de mortalidad observada, la cual es menor en la fiebre

paratifoidea. Las características que comparten estos serovares es su exclusividad a los seres humanos. El 10% de los pacientes infectados con estos serovares pueden tener complicaciones como encefalopatía, hemorragia y perforación intestinal, lo cual puede producir su muerte. En cambio, la gastroenteritis o salmonelosis es causada por al menos 1500 serovares de *Salmonella enterica* subespecie Entérica, entre ellas *Salmonella* Typhimurium [30]. La salmonelosis es una enterocolitis autolimitada, cuyos síntomas son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, sobre todo niños pequeños y en ancianos, puede ser grave y ocasionar la muerte [31] (Cuadro 3).

Muchos serovares de *Salmonella* no tifoidea (NTS) son patógenos oportunistas con una amplia variedad de huéspedes. La forma de transmisión puede producirse por contacto personal o por contacto con mascotas como gatos, perros, roedores, reptiles o anfibios, y por el consumo de productos alimenticios derivados de animales contaminados, tales como las aves de corral, los huevos y los productos lácteos. Otra fuente de infección es el consumo de productos de origen vegetal en crudo, contaminados principalmente con heces, como los germinados, frutos, cacahuets y espinacas, por mencionar algunos [32] (Fig. 3).

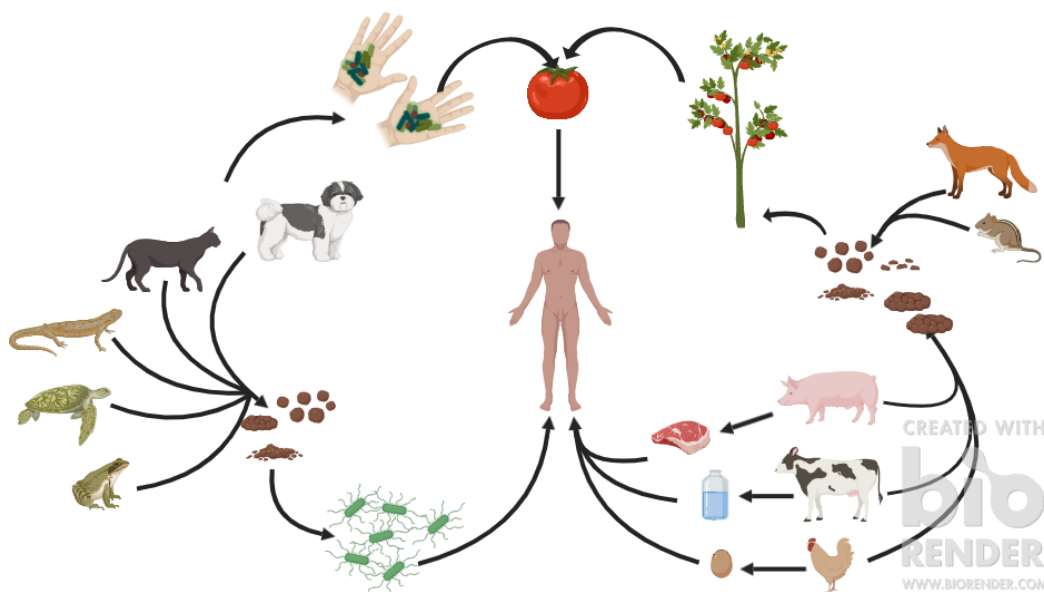


Figura 3. Mecanismo de transmisión de *Salmonella* no tifoidea. Las heces de los animales pueden contaminar el agua de riego y la tierra de los cultivos, los subproductos de animales de granja se pueden contaminar con *Salmonella* y ser consumidos por humanos, las mascotas pueden tener *Salmonella* y excretarla en heces.

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los de primer mundo. En México, el número de casos anuales de salmonelosis es alto comparado con el número de aislamientos reportados, debido a que el diagnóstico sólo es sintomático y no se realiza el aislamiento correspondiente por medio de laboratorio. Lo anterior impide conocer los serovares y las fuentes involucradas en los brotes [33]. Hasta la semana 23 (2 al 8 de junio) del 2019, se han registrado 12,491 casos relacionados con Fiebre Tifoidea, 3,984 casos de Fiebre Paratifoidea y 32,659 casos catalogados como otras salmonelosis en donde no se reportan los serovares o las fuentes que ocasionaron la enfermedad [34].

Cuadro 3. Diferencias entre *Salmonella* no tifoidea y los serovares tifoideos asociados con la enfermedad en humano

	Salmonelosis	Fiebre entérica
Huésped natural	Alimentos, animales, reptiles e insectos.	Humanos
Serovares involucrados	Typhimurium y 1500 serovares más	Typhi y Paratyphi
Epidemiología	Mundial	Endémica en países en desarrollo especialmente; Sudeste de Asia, África y América del Sur
Periodo de incubación	6–24 horas	7-21 días
Duración de los síntomas	Menos de 10 días	Hasta 3 semanas
Síntomas comunes	Náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, dolor abdominal y mialgia.	Fiebre, lengua saburral, bradicardia, manchas de rosa en el pecho y mialgia
Tratamiento	Tratamiento antibiótico no recomendado. En casos de enfermedad sistémica, se recomienda fluoroquinolonas	Fluoroquinolona (5-7 días), cloranfenicol y amoxicilina

Tomada y modificada de Gal-Mor et al. (2014) [32] y Andino et al. (2015) [7]

En los Estados Unidos, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés CDC) registró los primeros casos de enfermedades asociadas al consumo de alimentos a partir de 1973; los alimentos implicados con mayor frecuencia incluyeron ensaladas, lechugas, jugos y melones. Los primeros brotes de enfermedad confirmados por el laboratorio y relacionados con el consumo de tomate crudo se informaron por primera vez en la década de 1990 [35] y a partir de entonces se han reportado múltiples brotes de enfermedad asociados al consumo de tomate (Cuadro 4).

Cuadro 4. Brotes de *Salmonella* asociados al consumo de tomate crudo

Año	Serovar	Personas infectadas	Variedad de tomate	País	Fuente
1993	Montevideo	194	Rojo redondo	EE. UU.	[35]
1993	Montevideo	100	Rojo redondo	EE. UU.	[36]
1993	Montevideo	84	Tomate	EE. UU.	[37]
2002	Newport	10	Uva	EE. UU.	[35]
2002	Newport	376	Rojo redondo	EE. UU.	[35]
2002	Newport	512	Rojo redondo	EE. UU.	[36]
2002	Newport	12	Uva	EE. UU.	[36]
2002	Newport	510	Tomate	EE. UU.	[37]
2004	Newport	22	Tomate	Irlanda del Norte	[38]
2005	Newport	80	Rojo redondo	EE. UU.	[35]
2005	Newport	71	Rojo redondo	EE. UU.	[36]
2005	Newport	72	Tomate	EE. UU.	[37]
2006	Newport	152	Rojo redondo	EE. UU.	[35]
2006	Newport	115	Rojo redondo	EE. UU.	[36]
2007	Newport	76	Rojo redondo	EE. UU.	[35]
2009	Saintpaul	21	Tomate	EE. UU.	[39]
2010	Newport	55	Rojo redondo	EE. UU.	[35]

Interacción de *Salmonella* con las plantas y el tomate

Las enterobacterias pueden colonizar diversos entornos y adoptar estilos de vida diferentes en función de ellos. Las interacciones de estas bacterias con los hospederos pueden ser benignas, mutualistas o patogénicas. *Salmonella* no sólo contamina la superficie de las plantas, sino también interactúan activamente con ellas y puede colonizarlas como hospedadores alternativos [40], adhiriéndose a sus superficies, colonizándolas e infectándolas activamente y en algunos casos suprimiendo sus mecanismos de defensa [41]. Los sitios de entrada a las plantas pueden ser diversos y para *Salmonella* Typhimurium se ha observado que éstos pueden ser los tricomas, los estomas o las aberturas naturales en la superficie de la hoja [41]. También, en el suelo inoculado, *Salmonella* es capaz de internalizarse en las plantas y vainas frescas o secas de cacahuete [42].

Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* demuestran que *Salmonella* Typhimurium puede infectar varios tejidos y proliferar en compartimentos intracelulares a través de los brotes intactos o de los tejidos de la raíz, lo que provoca el marchitamiento, la clorosis y, eventualmente, la muerte de los órganos infectados [43]. También se ha demostrado que esta planta reconoce la flagelina de *Salmonella* y genera la respuesta de defensa correspondiente [44]. En cambio, en *Nicotiana tabacum*, *Salmonella* Typhimurium no promovió los síntomas de la enfermedad de la planta estudiada y tampoco desencadenó la respuesta de defensa. Los autores señalan que las observaciones realizadas son indicativas de que *Salmonella* Typhimurium utiliza estrategias de adaptación para alterar los sistemas de percepción innata de las plantas, suprimiendo activamente algunas de las vías de defensa por un mecanismo que depende del T3SS [45].

Respecto a las plantas de tomate se ha observado que *Salmonella* Typhimurium entra por los estomas y se mueve a través de los pecíolos y tallos hasta contaminar los frutos de forma interna, posiblemente moviéndose por el floema [46]. También se ha demostrado que puede colonizar los tricomas, el pedicelo y el cáliz de tomates maduros y sobrevivir en la flor [47] alcanzando el tejido interno en las primeras etapas del desarrollo del fruto [48]. En un estudio realizado con cinco serovares de *Salmonella* en planta y fruto, se concluyó que *Salmonella* Newport es el serovar que se acondiciona mejor a la supervivencia en los cultivos de suelo, agua superficial y fruto. La adaptación para la supervivencia en flores fue preferente para

Salmonella Montevideo seguido de los serovares Newport y Javiana. Por su parte, Saintpaul fue el serovar más prevalente en la superficie del fruto y Montevideo se encuentra con mayor frecuencia dentro de los frutos. En contraste *Salmonella* Typhimurium fue el serovar con menor adaptación en la planta y en el fruto [49].

El tomate, contiene una mezcla de minerales, vitamina C y E, carotenos y flavonoides [50]. Es uno de los frutos más importantes en el mundo [51] y debido a la calidad del tomate cultivado en México, en 2017 fue el principal proveedor a nivel mundial, cubriendo el 90.67% y el 65.31% de las exportaciones a Estados Unidos y Canadá, respectivamente. La popularidad de este producto es importante para la industria agraria ya que sus frutos, además de consumirse en fresco, se procesan para obtener una gran cantidad de subderivados [52].

Este fruto no está exento de la contaminación por *Salmonella* puesto que se ha reportado que ésta coloniza los tejidos y tiene la capacidad de sobrevivir en su interior. *Salmonella*, además de internalizarse en el fruto por los estomas y raíces, también lo hace a través de los sitios de daño biológico o físico del fruto, por donde las bacterias se pueden infiltrarse junto con el agua. La infiltración de agua ocurre cuando hay una diferencia entre la temperatura del fruto y el líquido más frío, provocando la contracción de los gases en los espacios internos, lo que resulta en un vacío parcial que atrae parte del fluido a través de los poros de la superficie de la fruta [53]. Los mecanismos que permiten la supervivencia de *Salmonella* dentro del tomate aún son inciertos; sin embargo, se ha observado que poblaciones microbianas recuperadas de tomates contaminados con *Salmonella* Typhimurium tienen la capacidad de utilizar el alcohol de azúcar [54], los azúcares simples, los ácidos orgánicos, los ácidos grasos y los aminoácidos. Las cantidades de estos metabolitos difieren entre los cultivares y también dependen de la etapa de madurez del fruto, observándose en frutos maduros un mayor contenido de glucosa y menor de sacarosa, lo cual también influye la expresión génica de la bacteria. *Salmonella* coloniza los tejidos de los tomates de manera diferente a los patógenos de las plantas y la implicación de los genes de virulencia importantes en la infección de células animales parecen no ser determinantes para su persistencia dentro del fruto [55].

3. Planteamiento del problema y justificación

El tomate es el segundo vegetal más popular en todo el mundo después de la papa, México se encuentra en el noveno lugar de los primeros diez países productores y es el primer lugar en exportación a nivel mundial. Algunos de los usos del fruto son en ensaladas, salsas y jugos frescos, lo cual ha provocado que en los últimos años se hayan producido brotes de enfermedad asociados al consumo de tomates en crudo, originados por serovares diferentes a *Salmonella* Typhimurium. Los serovares que se han aislado frecuentemente en brotes de salmonelosis asociados al consumo de tomate fresco son *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo.

Existe evidencia que muestra que *Salmonella* ingresa al interior del tomate a través de las aberturas naturales del fruto tales como la cicatriz del pedúnculo o los sitios de daño biológico o físico, los cuales pueden ser imperceptibles al ojo humano. La relevancia de la internalización de *Salmonella enterica* en frutos de consumo en crudo, como el tomate cherry, es que este fenómeno evita la eliminación de la bacteria con los tratamientos regulares de higienización. Además, las bacterias dentro del fruto podrían expresar factores de virulencia importantes para la infección en humanos y el alimento puede servirles de protección hacia las condiciones ácidas del estómago, cuando los alimentos contaminados son consumidos, lo cual podría aumentar el riesgo de padecer salmonelosis con una ingesta menor del microorganismo.

Durante años se ha estudiado la infección producida por *Salmonella* Typhimurium en el modelo murino, debido a que produce una infección similar a la fiebre tifoidea ocasionada por *Salmonella* Typhi en los humanos. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento se desconoce si otros serovares tales como *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo son patógenas para el modelo murino y si éstas pueden ocasionar una infección sistémica. Asimismo, se desconoce si estos serovares internalizados en el alimento y el tiempo que permanecen dentro de éste influye en la virulencia del patógeno para ocasionar la enfermedad en dicho modelo. Por lo anterior, los resultados de este estudio establecen las bases para el estudio de la contaminación de los alimentos por serovares de *Salmonella*, diferentes a Typhimurium en un modelo animal, con la intención de diseñar estrategias de higienización que impidan la internalización de *Salmonella* en frutas y además evaluar su eficacia en el modelo animal.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en el tomate cherry para inducir la colonización del tracto gastrointestinal y el desarrollo de la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c.

Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado del modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c con *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en tomate cherry.
- Evaluar la capacidad de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en tomate, para inducir la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c.
- Comparar la capacidad de colonización y la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c por *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en el tomate cherry, con las mismas cepas inoculadas en SSF al 0.85%.
- Determinar si la higienización de los tomates con hipoclorito de sodio en el momento de la inoculación de los tomates con *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo, evitan la colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado del modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c.

5. Hipótesis

Los serotipos de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizados en tomate cherry serán aptos para colonizar el tracto gastrointestinal y el desarrollar la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c.

6. Materiales y métodos

Cepas de trabajo

Los serovares de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio fueron aislados de diferentes fuentes (Cuadro 5) y se indujo la generación de una resistencia espontánea a rifampicina (0.1g/L) de acuerdo con el procedimiento descrito por Kaspar & Tamplin (1993) [56].

Cuadro 5. Cepas utilizadas durante la investigación

Cepa	N° de identificación	Fuente de aislamiento	Procedencia
<i>Salmonella</i> Newport	45 RF	Epicarpio de aguacate	°LMIA
<i>Salmonella</i> Saintpaul	188	Carne de bovino	[57]
<i>Salmonella</i> Montevideo	17	Carne de bovino	[57]
<i>Salmonella</i> Saintpaul	188 RF	Carne de bovino	[58]
<i>Salmonella</i> Montevideo	17 RF	Carne de bovino	[58]
<i>Salmonella</i> Typhimurium	14028		Donado por la Dra. Yadira Lugo *CIATEJ
<i>Salmonella</i> Typhimurium	14028 RF		En este estudio

RF: Resistente a Rifampicina

°: Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos de la Universidad de Guadalajara

* Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

Características del tomate tipo cherry

Se seleccionaron tomates tipo cherry firmes [59], libres de daños físicos, de color rojo, con la cicatriz del pedúnculo [60] de 3 mm medidos con un vernier (STEREN HER-411) (Fig.

4), un peso aproximado a 7 g y un pH interno de 4. Previo a los experimentos de inoculación, los tomates se acondicionaron a 25 °C/ 24 h en una incubadora (FELISA FE-132).

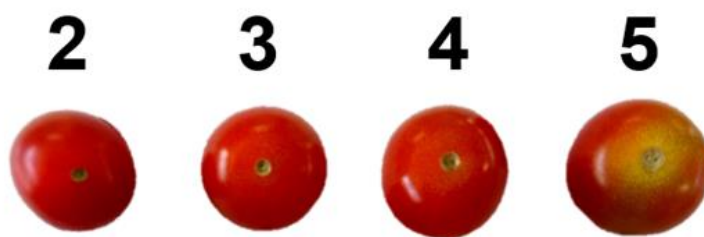


Figura 4. Diferencias de la cicatriz del pedúnculo. Los números indican la medida en mm de la cicatriz del pedúnculo.

Preparación del inóculo

Para obtener una concentración de 1×10^8 UFC/mL, se reactivaron de manera individual las cepas resistentes a rifampicina de *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo en medio Luria Bertani (LB) (Anexo A) y se incubaron a 37 °C/24 h en una incubadora (memmert 854 Schwabach). Posteriormente se tomaron 670 µL del cultivo previo y se inocularon en tubos de 10 mL de LB para incubar nuevamente a 37 °C/4 h. Después de 4 h de cultivo, 670 µL se transfirieron a tubos estériles con 35 mL de LB para incubarse nuevamente a 37 °C/24 h. Las células bacterianas del último inóculo se recuperaron por centrifugación a 6,000 rpm/10 min/12 °C (Hermle Z 323 K) y se lavaron dos veces con solución salina fisiológica (SSF) al 0.85% a 6,000 rpm/10 min/12 °C. Se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona al 0.1% para llevar a cabo los recuentos de cada suspensión bacteriana en placas de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST-Rf) [58].

Inoculación de los tomates cherry con *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo

Previo a los experimentos de inoculación, cuatro tomates por experimento se acondicionaron a 25 °C para posteriormente inocularse por inmersión con cada una de las cepas estudiadas. En cada experimento los tomates son sumergidos en una bolsa estéril (Whirl-Pak) con 50 mL de cada suspensión bacteriana (Newport, Saintpaul o Montevideo) y se incubaron durante 30 min/12 °C en una cámara climática (MMM Group Climacell) para promover la

internalización de las células en el fruto [61]. Los tomates se dejaron secar por una hora a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad; dos de los cuatro tomates fueron transferidos a una incubadora (FELISA FE-132) ajustada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para realizar la toma de muestra al tercer día (t: 3 días).

Inoculación de los tomates cherry con *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo higienizados con hipoclorito de sodio

La preparación del inoculo es similar a los procedimientos antes mencionados, modificando el lavado de las bacterias. La modificación consiste en utilizar agua destilada estéril en lugar de SSF al 0.85%. El hipoclorito de sodio se adicionó a la suspensión bacteriana utilizada para inocular los tomates, antes de agregar el hipoclorito de sodio se mide el pH con tiras reactivas (MColorpHast™) y si es necesario se ajusta el pH a 6 con la adición de 10 μL de Hidróxido de sodio (1 Normal). Posteriormente se adiciona hipoclorito de sodio comercial (7 g de hipoclorito de sodio por cada litro, aproximadamente 340 μL) hasta obtener una concentración cuantificada con tiras reactivas Quantab ® de 288 ppm de cloro total, de acuerdo a la recomendación del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) [62]. Una vez obtenida la concentración deseada se inocularon los tomates por medio de inmersión, para después promover la internalización de *Salmonella* durante 30 min/12 °C.

Recuperación de células internalizadas en los tomates cherry

Para determinar cuentas viables de *Salmonella* internalizadas en el fruto se toman los tomates de tiempo cero horas (t: 0 h) o de tiempo tercer día (t: 3 días) y se desinfectaron de manera externa por inmersión en 250 mL de etanol al 96 % por 2 min. Se dejan secar 30 min, posteriormente se enjuagan con 50 mL de SSF al 0.85% y se sometieron a un baño ultrasónico (Fisher Scientific FS20) durante 1 min a 42 KHz para remover células fuertemente adheridas en la superficie del fruto. Una vez desinfectados los tomates se transfirieron a una bolsa estéril (Whirl-Pak) con 50 mL de SSF al 0.85% para después colocarse en un agitador peristáltico (BagMixer® 400) durante 1 min a 50/60 Hz, con el fin de romper el fruto y liberar el contenido interno de manera homogénea [58]. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 6,000 rpm/10 min a 12 °C (Hermle Z 323 K); se decantó el sobrenadante

exceptuando los últimos 5 mL, en donde se resuspendieron las células recuperadas para realizar el recuento de las UFC del patógeno recuperado de la parte interna del fruto en placas con agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST–Rf) y para preparar el inóculo administrado al modelo murino .

Preparación del inóculo de *Salmonella* suspendida en Solución Salina Fisiológica al 0.85%

El inóculo se preparó de la misma manera que el usado para la internalización de los tomates descrito anteriormente, con algunas especificidades para cada serovar.

Preparación del inóculo de Salmonella Newport y Montevideo suspendida en Solución Salina Fisiológica al 0.85%

De la suspensión anterior de 50 mL con una concentración de 10^8 UFC/mL se tomaron 10 μ L y se hizo una dilución 1:1,000 con SSF al 0.85% para obtener una concentración de 10^5 UFC/mL. Lo obtenido fue homogenizado y se realizaron dos diluciones decimales consecutivas en SSF: de la dilución con la concentración de 10^3 se tomó 1 mL y se pasó a un tubo cónico (Falcon) estéril con 49 mL de SSF para obtener una suspensión bacteriana de aproximadamente 2 Log_{10} UFC/mL. De la suspensión anterior (Figura 5) se tomaron 4 alícuotas de 1 mL y fueron depositadas en microtubos de 1.5 mL (Axygen) de los cuales, uno se utilizó para realizar recuentos de UFC/mL en placas de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST–Rf); las placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C. Las 3 alícuotas restantes se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min (Eppendorf 5415 C), para concentrar todas las células bacterianas, posteriormente se extrajeron 375 μ L del sobrenadante, los 625 μ L restantes se homogenizaron y se utilizaron para inocular 500 μ L de inóculo preparado por sonda esofágica (22G X 1) al modelo murino.

Preparación del inóculo de Salmonella Saintpaul y Typhimurium suspendida en Solución Salina Fisiológica al 0.85%

Se realizó el mismo procedimiento explicado en el punto anterior, hasta obtener 50 mL de una suspensión bacteriana de aproximadamente 2 Log_{10} UFC/mL, esta suspensión bacteriana a diferencia de la anterior se separaron en 2 tubos cónicos (Falcon) estériles con 25 mL de la

suspensión para hacer un concentrado por centrifugación a 6,000 rpm/10 min/12 °C (Hermle Z 323 K), se decantó el sobrenadante exceptuando los últimos 3 mL, se unieron ambas suspensiones bacterianas para tener un total de 6 mL aproximadamente (Fig. 5) de donde se tomaron 4 alícuotas de 1 mL y fueron depositadas en microtubos de 1.5 mL (Axygen) de las cuales, una se utilizó para realizar recuentos de UFC/mL en placas de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST–Rf); las placas fueron incubadas durante 24 h a 37°C. Las 3 alícuotas restantes se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 min, para concentrar todas las células bacterianas, posteriormente se extrajeron 375 µL del sobrenadante, los 625 µL restantes se homogenizaron y se utilizaron para la inocular 500 µL del inóculo preparado por sonda esofágica (22G X 1) al modelo murino.

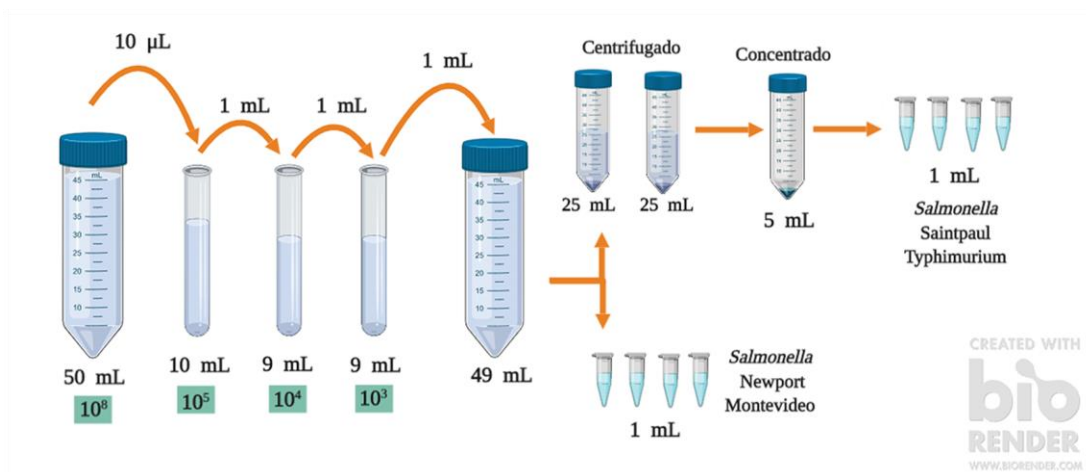


Figura 5. Preparación del inóculo en Solución Salina Fisiológica al 0.85%. Se muestra cómo se realizaron los inóculos de *Salmonella* Newport, Saintpaul, Montevideo y Typhimurium suspendida en SSF al 0.85%.

Condiciones y área de manejo para la inoculación del modelo murino.

El alojamiento de los animales de experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de conducta animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de conformidad con el Comité de Bioética del Centro Universitario (Anexo E). Todos los procedimientos fueron conducidos con trato humanitario y ético, siguiendo los lineamientos descritos en la norma oficial mexicana NOM-062- ZOO-1999 para el uso y manejo de animales de experimentación [63].

Para este trabajo se solicitaron 120 ratones hembra BALB/cAnNHsd de 4 a 5 semanas de edad (Envigo RMS, SA de CV. - México y Tetrarium SA de CV - Monterrey), libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos (Anexo B), los cuales se mantuvieron en un ambiente controlado a una temperatura promedio de 25 °C, humedad 60%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, agua y alimento seco a libre disponibilidad [64] y estéril. Se llevó a cabo la adquisición de 20 especímenes por experimento y después de 1 semana en cuarentena, se formaron 7 grupos de forma aleatoria con 2 y 3 individuos respectivamente (Cuadro 6), los cuales se colocaron en jaulas estériles de acero inoxidable (Anexo C).

Cuadro 6. Organización de grupos de experimentación.

Grupo	Nombre	Inóculo	N° de individuos
A	Grupo control positivo	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2
B	Grupo control negativo	Solución Salina Fisiológica al 0.85%	2
C	Grupo con <i>Salmonella</i> en SSF al 0.85%	<i>Salmonella</i> (Newport, Saintpaul o Montevideo)	3
D	Grupo t: 0 h sin Cl	<i>Salmonella</i> (Newport, Saintpaul o Montevideo)	3
E	Grupo t: 0 h con Cl	<i>Salmonella</i> (Newport, Saintpaul o Montevideo)	3
F	Grupo t: 3 día sin Cl	<i>Salmonella</i> (Newport, Saintpaul o Montevideo)	3
G	Grupo t: 3 día con Cl	<i>Salmonella</i> (Newport, Saintpaul o Montevideo)	3
Total, de individuos por repetición			19

* Se realizaron dos repeticiones por serovar de las cepas de *Salmonella* a estudiar.

Inoculación de los ratones Balb/c con *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo

Pasando la semana de cuarentena antes de realizar la inoculación, se retiró el alimento y el agua durante 4 horas. Posteriormente se procedió a la inoculación por vía oral con una sonda esofágica (Anexo F y G), usando una concentración bacteriana inherente a cada serotipo estudiado (figuras 6, 13 y 15) proveniente de tomates sin un proceso de higienización o higienizados con hipoclorito de sodio a las cero horas y tres días, *Salmonella* Typhimurium suspendida en SSF al 0.85% y *Salmonella* (Newport, Saintpaul o Montevideo), suspendida en SSF al 0.85% cada 24 horas por 6 días continuos.

Registro de signos clínicos

El estado clínico de los ratones se evaluó diariamente previo a la inoculación mediante examen visual de la actividad, el pelaje, la posición, la alimentación, la ataxia y el temblor, adicionadas a la medición del peso y la temperatura (HER-427). La evaluación clínica se llevó a cabo de acuerdo al sistema de puntuación descrito por Özkaya et al. (2012) [65] (Anexo D). Los puntos utilizados para evaluar el estado clínico fueron: 0 (presencia notable de alteraciones), 1 (alteraciones parcialmente visibles) y 2 (ausencia de alteraciones).

Extracción de órganos

Un día posterior a la última inoculación, todos los ratones fueron anestesiados con Isoflurano (SOFLORAN®VET) y sacrificados mediante dislocación cervical, como se encuentra descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [63]. El procedimiento de sacrificio se explica detalladamente en el Anexo H.

Posterior al sacrificio, todos los ratones fueron refrigerados a 7 °C hasta la disección de su grupo. En condiciones asépticas, se realizó la disección como lo menciona de Aluja & Casas (2002) [66] de manera breve, se colocó el animal decúbito dorsal, realizando una inserción por la línea media desde la sínfisis mandibular hasta la sínfisis púbica. Para la remoción de los órganos siguiendo este orden: bazo, tracto gastrointestinal e hígado, cada órgano fue pesado y lavado con SSF 0.09% estéril, los órganos restantes fueron procesados siguiendo los lineamientos descritos en la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo [67].

Recuperación de células de *Salmonella* internalizadas en tracto gastrointestinal bazo e hígado

Después de la remoción de los órganos, cada uno fue colocado en tubos cónicos (Falcon) de 15 ó 50 mL de capacidad con 5 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 (Anexo H) para lisar las células y liberar a *Salmonella* de los órganos [68], cada órgano fue homogeneizado con un procesador de tejidos (Tissue Master TM125-115). Después se tomaron dos alícuotas de 1.5 mL de cada órgano y se dejaron en reposo por 15 minutos, para posteriormente centrifugarse (Eppendorf 5415 C) a 6,000 rpm por 5 min, se tomó 1 mL del sobrenadante el cual se inoculó en placas de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST-Rf) para determinar cuentas viables (UFC). Con la segunda alícuota se realizaron dos diluciones decimales con PBS, las cuales fueron inoculadas en placas de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina (AST-Rf) para determinar cuentas viables (UFC) y reportarse como UFC/órgano mL.

Confirmación de las colonias viables cultivables recuperadas de los órganos

Las UFC de *Salmonella* recuperadas de los órganos fueron verificadas por las pruebas bioquímicas, agar triple azúcar hierro (TSI) y el agar Lisina hierro (LIA) [69]. La interpretación de los resultados se realizó como lo describe la NOM-210-SSA1-2014 Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos [70].

Imágenes

Todas las imágenes presentadas en este trabajo fueron realizadas con el programa en línea BioRender.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las UFC de los inóculos y los órganos se analizaron estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism 5.0, mediante el empleo de pruebas no paramétricas como: las pruebas Kruskal-Wallis, Dunn y correlación de Spearman.

7. Resultados y discusión

Como se mencionó previamente la salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, ocasionada principalmente por las serovariedades de *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis o *Salmonella* no tifoideas (NTS) [31]. En los últimos años se han reportado brotes asociados al consumo de vegetales originados por otras serovariedades diferentes de *Salmonella* Typhimurium [71], donde los serovares de *Salmonella* Montevideo, Saintpaul y Newport fueron asociados a brotes de salmonelosis por el consumo de tomate fresco [35] [7]. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en el tomate cherry para inducir la colonización del tracto gastrointestinal y el desarrollo de la infección sistémica en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c.

Colonización de *Salmonella* Newport en el modelo murino (*Mus musculus* BALB/c)

Salmonella Newport es uno de los serovares que se encuentra estrechamente relacionado con brotes transmitidos por alimentos [7] y se ha aislado en una amplia gama de éstos [71], como sandía, melón, alfalfa, tomates, mangos y lechugas, por mencionar algunos [37]. Para determinar la colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de ratones BALB/c con *Salmonella* Newport internalizada en tomates, treinta y ocho ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad fueron inoculados por vía oral con un promedio de 2.61 Log₁₀ de UFC/mL de *Salmonella* Newport o *Salmonella* Typhimurium, suspendidas en solución salina fisiológica al 0.85% (SSF al 0.85%) y *Salmonella* Newport internalizada en el tomate cherry sin tratamiento de higienización o higienizados con hipoclorito de sodio durante la inoculación. La internalización fue promovida por una gradiente de temperatura de 12 °C y en el modelo murino se evaluaron dos periodos de internalización en el tomate, el de referencia, el cual carece de período de incubación post-inoculación y que se refiere como tiempo 0 horas (t: 0 h) y el incubado a 25 °C por tres días post-inoculación, el cual se refiere como tiempo tres días (t: 3 días). Treinta y ocho ratones BALB/c en dos réplicas independientes (diecinueve ratones por réplica) se inocularon por vía oral con sonda esofágica durante 6 días consecutivos. El inóculo administrado se determinó por la técnica de siembra por extensión en placas de agar AST-Rf (0.1 g/L) incubadas durante 24 h a 37 °C. Las UFC obtenidas se reportaron como Log₁₀ UFC/mL. Los resultados de las UFC

recuperadas de los inóculos administrados a los ratones BALB/c (n=6/inóculo) muestran que los inóculos suspendidos en SSF al 0.85% (*Salmonella* Newport y *Salmonella* Typhimurium) o recuperados del interior del tomate (*Salmonella* Newport t: 0 horas y t: 3 días sin Cl) mostraron diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) (Fig. 6). La prueba de comparación múltiple de Dunn mostró que la diferencia observada en la prueba de Kruskal-Wallis radica entre los inóculos de *Salmonella* Newport suspendida en SSF al 0.85% y *Salmonella* Newport recuperadas del interior del tomate incubado por tres días post-inoculación y sin higienizar (t: 3 días sin Cl) P<0.05 (Fig. 6) siendo los otros dos inóculos homogéneos entre ellos. Los inóculos de *Salmonella* Newport recuperados del interior del tomate y tratados con hipoclorito de sodio (t: 0 horas y t: 3 días con Cl) no reportaron cuentas viables cultivables en placas de AST-Rf (0.1 g/L), por lo que se omitieron de la figura 6.

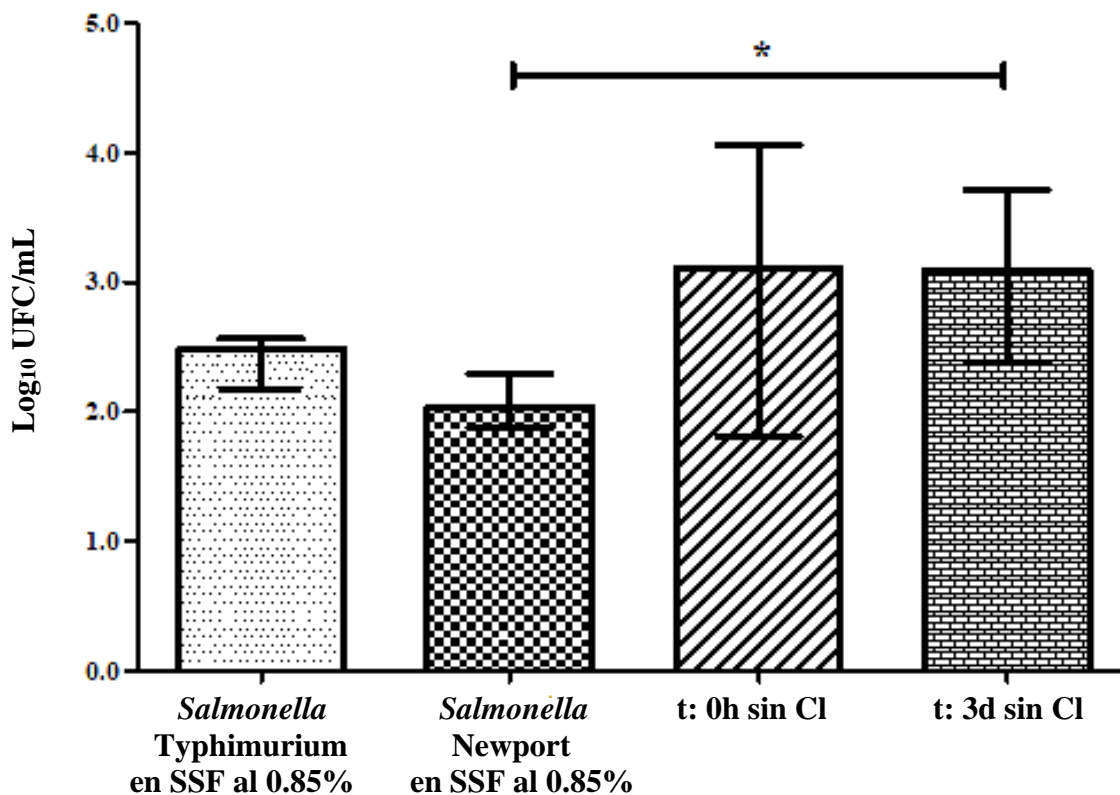


Figura 6. Mediana de UFC inoculadas a ratones vía oral con *Salmonella* Newport. Se muestra la mediana en Log₁₀ de las UFC inoculadas de dos réplicas independientes (n=12). El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba de rangos de Kruskal-Wallis con P<0.05 y post-Hoc de prueba de comparación múltiple de Dunn, comparando las medianas entre los inóculos. Las barras muestran el rango intercuartílico donde se concentra el 50% de los datos. La barra horizontal señala el tipo de inóculos donde existen diferencias estadísticamente significativas (*P < 0.05).

Recuperación de *Salmonella* Newport en el modelo murino

El sacrificio de los animales infectados se realizó al séptimo día para recuperar y cuantificar células viables del tracto gastrointestinal, bazo e hígado, para ello los órganos removidos se homogeneizaron en 5 mL de PBS utilizando un procesador de tejidos. De cada órgano homogenizado se obtuvieron 2 alícuotas, las cuales se centrifugaron para obtener 1 mL del sobrenadante y realizar con una de la alícuotas siembra directa en placas de AST-Rf (0.1 g/L). La segunda alícuota se utilizó para realizar dos diluciones decimales en PBS, las cuales fueron inoculadas en placas de AST-Rf (0.1 g/L). Las UFC recuperadas se reportaron como Log_{10} UFC/órgano.

En la Cuadro 7 se observa que los ratones inoculados con *Salmonella* Typhimurium suspendida en SSF al 0.85% no reportaron cuentas viables en ninguno de los órganos analizados. Estos resultados podrían deberse a que en los reportes de infección con *Salmonella* Typhimurium en el modelo murino, frecuentemente utilizan tratamientos previos a la inoculación, tales como agentes antimicrobianos como la estreptomicina o neutralizantes como bicarbonato de sodio [68], los cuales alteran transitoriamente la microbiota o el pH estomacal. Ambos tratamientos provocan que el ratón inoculado sea más susceptible a la infección experimental y la colonización sea exitosa [72] [73]. Adicionalmente, se ha reportado que al inocular *Salmonella* Typhimurium a una dosis de 4 Log_{10} UFC por vía oral a ratones BALB/c de seis semanas de edad, no se recuperan cuentas viables en intestino, bazo e hígado [74].

En contraste los individuos inoculados con *Salmonella* Newport suspendida en SSF al 0.85% o recuperada del interior del tomate higienizados con cloro reportaron una cantidad variable entre el número de individuos colonizados y los Log_{10} UFC recuperadas (Cuadro 7). Si bien se observa una recuperación de UFC de *Salmonella* Newport en el tracto gastrointestinal y algunos de los órganos evaluados, esta información debe ser considerada con precaución, debido al límite de detección de la técnica, cuyo rango contable es de 25-250 UFC por placa de Petri de tamaño estándar [75]. Los individuos inoculados con *Salmonella* internalizada en el tomate higienizados con hipoclorito t: 0h con Cl y t: 3d con Cl muestran colonización de algunos órganos con el 33.3% y 50% de los individuos colonizados, respectivamente. Dado que no se recuperaron cuentas viables en las placas inoculadas con la preparación de los

tomates internalizados e higienizados con cloro, y si se observaron UFC en los órganos de algunos individuos inoculados, es posible que este resultado se deba a que *Salmonella enterica* tiene la capacidad de entrar a un estado viable no cultivable, en donde las bacterias carecen de crecimiento observable en medios de cultivo rutinarios pero se encuentran vivas y pueden recuperar su actividad metabólica cuando el estrés desaparece [76]. No obstante, los resultados observados en los individuos inoculados con *Salmonella* Newport internalizada en los tomates higienizados con hipoclorito de sodio t: 0h y t: 3d, no son representativos del grupo estudiado y pueden ser inherentes al estado físico de los individuos que reportaron UFC en los órganos estudiados.

Cuadro 7. Recuperación de células de *Salmonella* Newport en órganos

Inóculo	Porcentaje de individuos colonizados	UFC/órgano recuperadas del tracto gastrointestinal	UFC/órgano recuperadas del Bazo	UFC/órgano recuperadas del Hígado
SSF al 0.85%	0% (0/6)	/	/	/
<i>Salmonella</i> Typhimurium en SSF al 0.85%	0% (0/6)	/	/	/
<i>Salmonella</i> Newport en SSF al 0.85%	50% (3/6)	155	/	10
		45	15	10
		10	/	/
t: 0h con Cl	33% (2/6)	5	/	/
		180	/	10
t: 3d con Cl	50% (3/6)	/	/	5
		50	/	/
		270	/	/

En los resultados obtenidos de los individuos inoculados con *Salmonella* Newport recuperado del interior del tomate sin higienizar y sin período de incubación (t: 0h) se observó que fue capaz de colonizar el tracto gastrointestinal del 83.33% (5/6) de los individuos inoculados, con una mediana de 1.66 Log₁₀ UFC/órgano. En los individuos 1, 3 y 5, la bacteria se recuperó en bazo con una mediana de 0.34 Log₁₀ UFC/órgano. Adicionalmente en los individuos 1 y 5 hubo una recuperación de UFC en hígado, no siendo así para el individuo 3 (Fig. 7). Al realizar la prueba de rangos de Kruskal-Wallis no se mostró diferencias significativas (P>0.05) entre las medianas de los log₁₀ UFC/órganos recuperadas de los ratones BALB/c (Fig. 7).

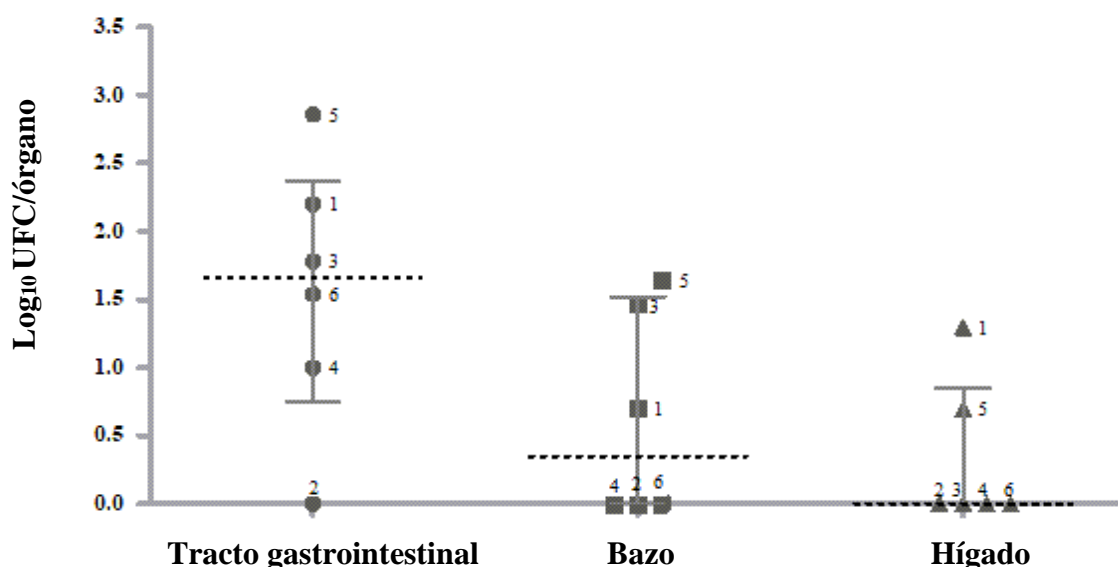


Figura 7. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport internalizada en tomate t: 0h sin CI. Se muestra los Log₁₀ UFC/órgano del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de dos réplicas independientes (n=6). Los individuos numerados de 1 al 3 corresponden a la primera réplica y los del 4 al 6 corresponden a la segunda. La línea punteada representa la mediana de los datos. Las barras muestran el rango intercuartílico donde se concentran el 50% de los datos.

La recuperación de UFC del tracto gastrointestinal, bazo e hígado, extraídos de los animales inoculados con *Salmonella* Newport recuperada del interior del tomate con 3 días de incubación post-inoculación y sin higienizar (t: 3 días sin CI), muestran que en el 83.33% (5/6) de los individuos se recuperó *Salmonella* Newport en el tracto gastrointestinal con una mediana de 1.86 Log₁₀ UFC. De los cinco individuos el 66.66% (4/6) mostró una recuperación de alrededor de 1 Log₁₀ UFC en bazo y en el 83.33% (5/6) se recuperaron alrededor de 1.81 Log₁₀ UFC en hígado (Fig. 8).

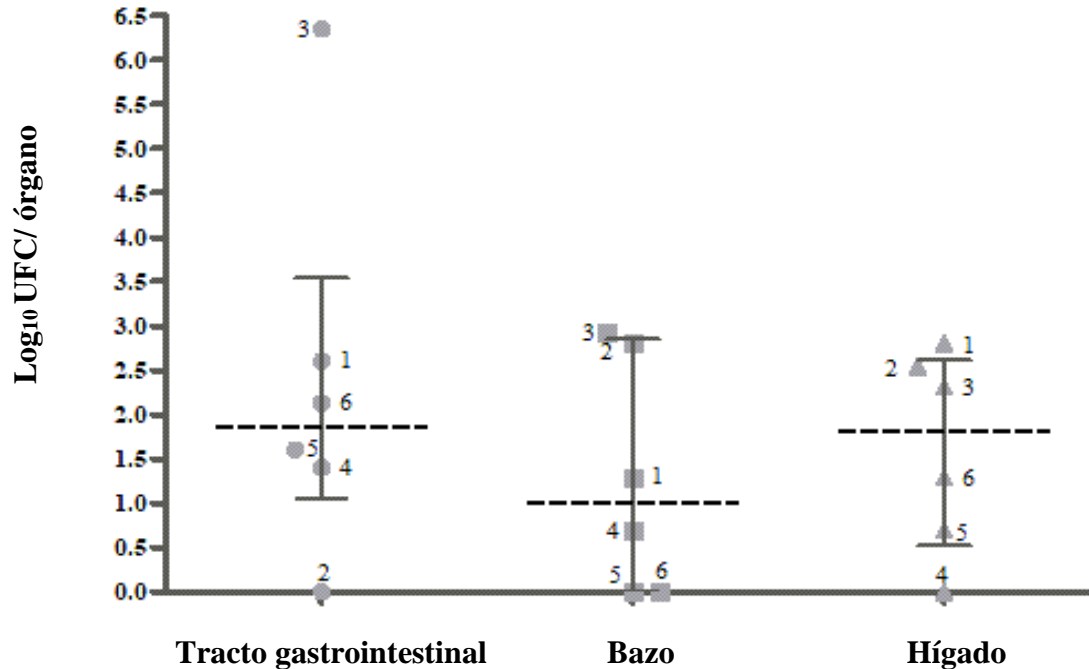


Figura 8. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport internalizada en tomate t: 3d sin Cl. Se muestra los Log₁₀ UFC/órgano del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de dos réplicas independientes (n=6). Los individuos numerados del 1 al 3 corresponden a la primera réplica y los numerados del 4 al 6 corresponden a la segunda. Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante la prueba de rangos de Kruskal-Wallis con P> 0.05, la línea punteada representa la mediana de cada grupo. Las barras muestran el rango intercuartílico donde se concentra el 50% de los datos.

En la figura 8 se puede observar que en los individuos 5 y 6 no se recuperaron UFC en bazo, pero sí en tracto gastrointestinal e hígado, esto sugiere que *Salmonella* Newport ascendió directamente del tracto gastrointestinal al hígado sin pasar por el bazo. A nuestro conocimiento no existe evidencia del orden de colonización de los órganos por parte de *Salmonella enterica*. Sin embargo, se ha reportado en cortes histológicos de hígados y vesículas biliares de ratones infectados con *Salmonella* Typhimurium que las lesiones hepáticas aparecen antes de las alteraciones patológicas en la vesícula biliar, lo que indica que las bacterias se están descargando del hígado a la vesícula biliar a través de la bilis [77]. En nuestro estudio no se puede realizar dicha comparación ya que vesícula biliar se analizó en conjunto con el hígado.

La comparación de las UFC recuperadas por órgano por individuo inoculadas con *Salmonella* Newport en SSF al 85% (n=6) y recuperados del interior del tomate sin incubación (t: 0 horas (n=6)) e incubadas durante 3 días post-inoculación a 25 °C (t: 3 días (n=6)) sin ningún proceso

de higienización, muestra recuperación variable en los órganos estudiados (Cuadro 8 y Fig. 9). Al realizarse la prueba de Kruskal-Wallis solo se encontró diferencias significativas entre las UFC recuperadas del hígado de los individuos inoculados con *Salmonella* Newport en SSF y recuperada del interior del tomate t: 3d sin cloro.

Cuadro 8. Log₁₀ UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport en SSF y recuperada del tomate no higienizado con hipoclorito de sodio.

Órganos	Tracto gastrointestinal			Bazo			Hígado		
	SSF	t: 0h	t: 3d	SSF	t: 0h	t: 3d	SSF	t: 0h	t: 3d
1	0.00	2.20	2.59	0.00	0.70	1.30	0.00	0.00	2.79
2	2.19	0.00	6.35	0.00	0.00	2.94	1.00	1.30	2.32
3	1.65	1.77	0.00	1.17	1.48	2.82	1.00	0.00	2.58
4	1.00	1.00	1.39	0.00	0.00	0.69	0.00	0.00	0.00
5	0.00	2.85	1.60	0.00	1.65	0.00	0.00	0.70	0.69
6	0.00	1.54	2.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.30

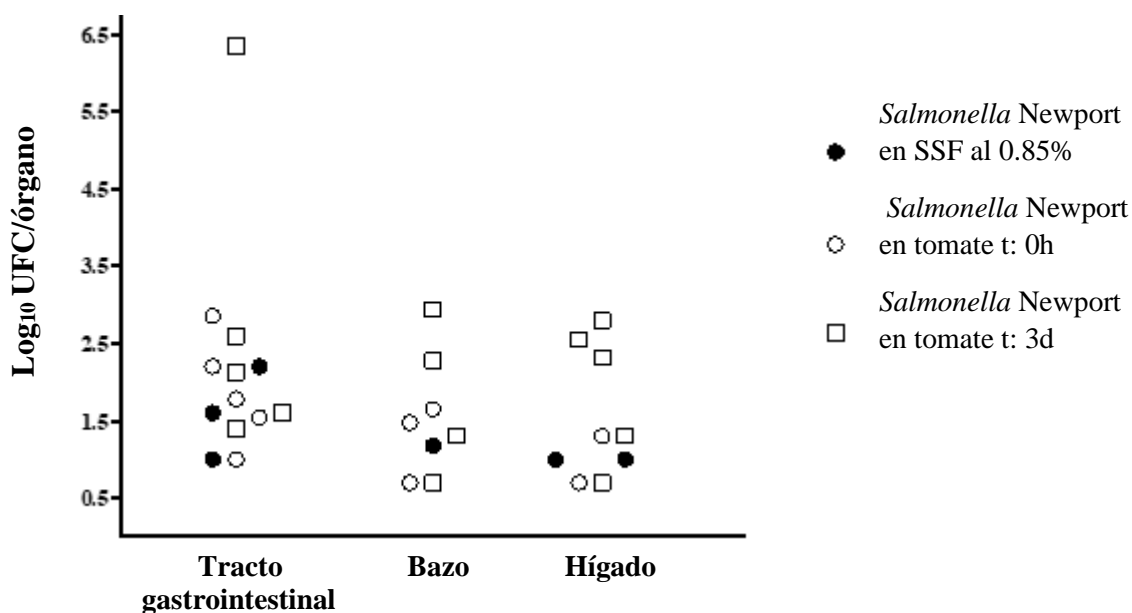


Figura 9. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport en SSF y recuperada del tomate. Se representan los Log₁₀ UFC/órgano del tracto gastrointestinal, bazo e hígado de dos réplicas independientes inoculados con *Salmonella* Newport en SSF al 0.85% (n=6, figuras sólidas,) y recuperada del interior del tomate t: 0h (n=6) y t: 3d (n=6) (figuras blancas).

Los resultados obtenidos muestran que *Salmonella* Newport internalizada en tomate y sin proceso de higienización es más eficiente en el establecimiento de la infección que la inoculada en SSF al 0.85%. Estas observaciones sugieren que *Salmonella* Newport internalizada en el tomate puede inducir una infección sistémica similar a lo descrito para *Salmonella* Typhimurium en el modelo murino. Para *Salmonella* Typhimurium se ha reportado un aumento en la cantidad de bacilos que se encuentran en los ganglios linfáticos, hígado y bazo después de 2 a 4 días, post-inoculación [78]; penetrando el epitelio del intestino delgado [79] y posteriormente infectando células fagocíticas que le permiten alcanzar y colonizar el hígado y el bazo [80].

Signos clínicos de ratones BALB/c

El estado clínico de los individuos de experimentación fue evaluado por un sistema de puntuación que se detalla en el Anexo D. De manera general, los puntos utilizados para valorar el estado clínico por día son: 0 (presencia notable de alteraciones), 1 (alteraciones parcialmente visibles) y 2 (ausencia de alteraciones). De acuerdo con el sistema de puntuación descrito por Özkaya et al. (2012) [65], si el puntaje promedio fue igual o superior a 8 puntos los ratones se consideran saludables, un rango de 4 a 7, los ratones fueron aceptados como moderadamente enfermos y una puntuación menor a 3, los ratones fueron aceptados como gravemente enfermos.

La mediana de los 6 signos clínicos evaluados en los 6 días de inoculación de los treinta y ocho individuos, (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendidos en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Newport suspendidos en SSF al 0.85%, recuperados del interior del tomate t: 0 h y t: 3 días sin o con proceso de higienización), mostraron un rango de 12 a 8.5 puntos (Fig. 10).

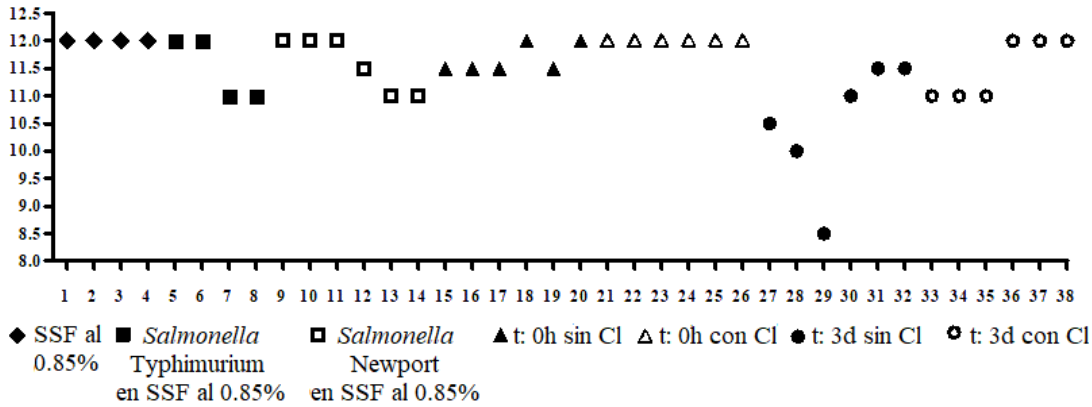


Figura 10. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport. Mediana de dos réplicas independientes de los signos clínicos presentados en los seis días de inoculación con *Salmonella* Newport, de los treinta y ocho individuos evaluados (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendidos en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Newport resuspendida en SSF al 85% y recuperada del interior del tomate t: 0 horas y t: 3 días sin CI/con CI). Los signos clínicos que se evaluaron fueron: consumo de alimento, actividad, condición del pelaje, posición encorvada, presencia de temblor y ataxia.

En la figura 10 se observa que 35 individuos registraron un rango de 12 a 11 puntos y tres individuos registraron un rango de 10.5 a 8.5 puntos, rangos considerados como saludables [65]. Cabe resaltar que los tres individuos con menor puntaje fueron inoculados con *Salmonella* Newport recuperados del interior del tomate con 3 días de incubación post-inoculación y sin higienizar (t: 3 días sin CI) y que el individuo marcado con el número 29 murió al quinto día de inoculación (Fig. 10).

Al explorar la relación existente entre el total de las UFC recuperadas de los 3 órganos por individuo y la mediana de los signos clínicos, observamos que existe una correlación inversa, entre la cantidad de Log₁₀ UFC/individuo con los signos clínicos registrados (Spearman P = -0.5159 P<0.05, N = 22) (Fig. 11). Por lo anterior concluimos que el aumento de las UFC recuperadas por órgano/individuo disminuye la mediana de los signos clínicos, tendiendo a obtener el puntaje que indica enfermedad [65].

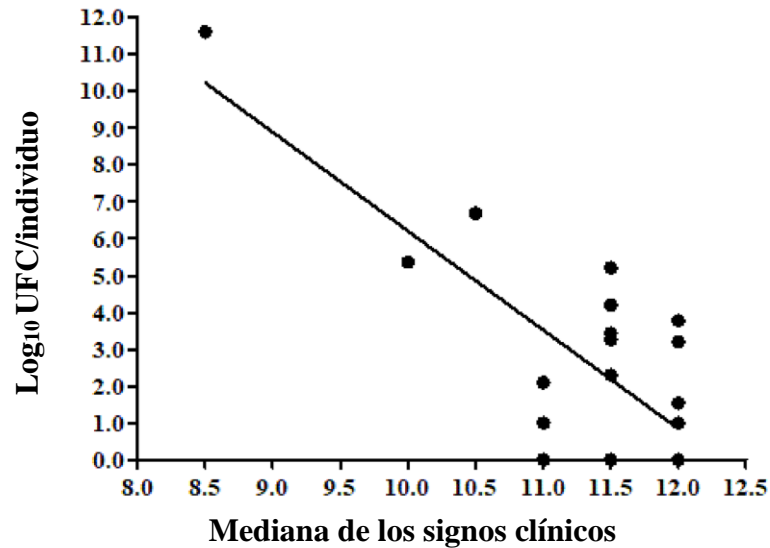


Figura 11. Correlación de las UFC recuperadas en órganos con los signos clínicos. El gráfico muestra el Log₁₀ UFC/individuo del total de las UFC recuperadas de los 3 órganos evaluados (tracto gastrointestinal, bazo e hígado) con la mediana de los signos clínicos presentados en los seis días de tratamiento con *Salmonella* Newport suspendida en SSF al 0.85% y recuperada del interior del tomate a los dos tiempos evaluados t: 0 h y t: 3 días y la SSF al 0.85% (n= 22)

Al respecto, existen evidencias que indican que los ratones inoculados con *Salmonella* Typhimurium a una dosis de 2.4×10^4 muestran signos de enfermedad a partir del día 3 post-infección [64]. Así mismo, se indica que la infección por vía oral de *Salmonella* tiene un período de incubación de tres, seis o más días y que los animales que viven de 1 a 2 semanas post-infección muestran lesiones más típicas [78]. Haciendo alusión a lo anterior podemos sugerir que los signos clínicos registrados en este estudio con *Salmonella* Newport podrían ser el inicio de manifestaciones clínicas de la enfermedad sistémica.

Con los datos obtenidos concluimos que *Salmonella* Newport colonizó el tracto gastrointestinal, bazo e hígado de ratones BALB/c cuando fue inoculada en SSF al 85% o recuperada del interior del tomate, siendo más eficiente la colonización cuando fue administrada con el tomate. Cabe resaltar que la cantidad de Log₁₀ UFC/mL entre los diferentes inóculos internalizados en tomate (t: 0 h y t: 3 días) fue estadísticamente homogénea (Fig. 6), lo cual sugiere que el período de adaptación de *Salmonella* Newport en el tomate podría volverla más apta para provocar la infección. Al respecto se ha reportado que *Salmonella* tolera ambientes con ácidos fuertes (pH de 2.5-4.0) cuando ésta es cultivada

previamente en ambientes con ácidos débiles (pH de 5.5-6.0). Estas condiciones de ácidos débiles (pH 5) inducen la expresión de los genes asociados a la virulencia (*hilA*) e invasión (*invA*) [72]. Adicionalmente se conoce que la tolerancia a los ácidos está regulada por los genes de virulencia ubicados en el plásmido spv, los cuales pueden interferir con las tasas de crecimiento bacteriano dentro de las células huésped durante las infecciones sistémicas [73]. Con lo anterior podemos inferir que la acidez del tomate (pH 4) y el tiempo en el que *Salmonella* permanece en el interior de éste favorecería la inducción de genes que permiten la infección sistémica en el modelo murino.

A nuestro conocimiento no hay evidencia que reporte algo similar a lo realizado en este estudio con *Salmonella* Newport, aunque existen diversos estudios que indican con gran detalle la colonización e infección causada por *Salmonella* Typhimurium en el mismo modelo. No obstante, las comparaciones deben hacerse con precaución, ya que en los reportes con *Salmonella* Typhimurium frecuentemente utilizan tratamientos previos a la inoculación, tales como agentes antimicrobianos o neutralizantes [68]. Cabe destacar que en este estudio no se utilizó ningún tratamiento previo a la inoculación, lo que indica que las bacterias suspendidas en SSF al 0.85% y las internalizadas en el tomate tuvieron que enfrentarse a las bacterias nativas del tracto gastrointestinal y el pH del estómago para la colonización y movilización a otros órganos.

Colonización de *Salmonella* Saintpaul en el modelo murino (*Mus musculus* BALB/c)

Salmonella Saintpaul se encuentra dentro de los 20 serovares que se aíslan comúnmente en casos de salmonelosis humana en los Estados Unidos. En la India, Vietnam y Arabia Saudita se ha aislado este serovar de alimentos tales como el camarón y pescado [81] carne de ave, carne de res, pimiento, tomates [82] alfalfa, serrano y mangos [37]. A treinta y ocho ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad se le administraron por vía oral un promedio de 2.68 Log₁₀ de UFC/mL de *Salmonella* Saintpaul o *Salmonella* Typhimurium, suspendidas en solución salina fisiológica al 0.85% y *Salmonella* Saintpaul internalizada en el tomate cherry sin higienizar o higienizado con hipoclorito de sodio con dos tiempos de internalización, t: 0 h y t: 3 días post-inoculación incubados a 25 °C. Al igual que con *Salmonella* Newport los treinta y ocho ratones BALB/c se inocularon por vía oral, durante 6 días continuos. El inóculo administrado se determinó por la técnica de siembra por extensión en placas de agar AST–

Rf (0.1 g/L) incubadas durante 24 h a 37 °C. Las UFC obtenidas se reportaron como Log₁₀ UFC/mL.

Las cuentas viables recuperadas de los inóculos administrados a los ratones BALB/c (n=6/inóculo) muestran que los inóculos suspendidos en SSF al 0.85% (*Salmonella* Saintpaul y *Salmonella* Typhimurium) o recuperados del interior del tomate a los tiempos evaluados y sin higienizar (*Salmonella* Saintpaul t: 0 horas y t: 3 días sin Cl) fueron estadísticamente diferentes (P <0.05) (Fig. 12).

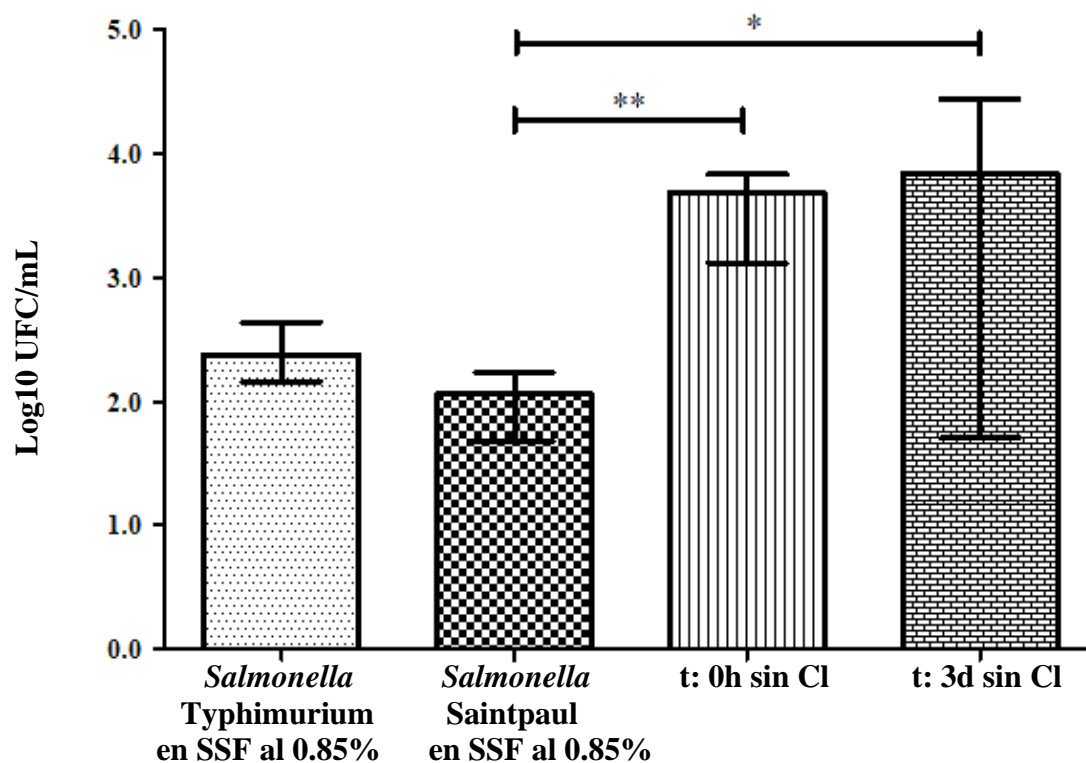


Figura 12. UFC inoculadas a ratones vía oral con *Salmonella* Saintpaul. Se muestra la mediana en Log₁₀ de las UFC inoculadas durante los 6 días/réplica (n=12). Se realizaron análisis estadístico de los datos mediante la prueba de rangos de Kruskal-Wallis con P<0.05 y post- Hoc de prueba de comparación múltiple de Dunn, comparando las medianas entre los inóculos. Las barras muestran el rango intercuartílico donde se concentra el 50% de los datos. La barra horizontal señala el tipo de inóculos donde existen diferencias estadísticamente significativas (*P<0.05 y ** P<0.01)

Al realizar la prueba de comparación múltiple de Dunn se observó que las diferencias se encuentran entre los inóculos de *Salmonella* Saintpaul suspendida en SSF al 0.85% y *Salmonella* Saintpaul recuperadas del interior del tomate en los tiempos evaluados (t: 0 h y t: 3 días sin Cl) (Fig. 12). Los inóculos recuperados del interior del tomate (*Salmonella*

Saintpaul t: 0 horas y t: 3 días) tratados con hipoclorito de sodio (con Cl) no reportaron cuentas viables cultivables en placas de AST-Rf 0.1 g/L, por lo que se omitieron de la figura 12.

Recuperación de *Salmonella* Saintpaul en el modelo murino

Respecto a las cuentas viables recuperadas en órganos, los ratones inoculados con *Salmonella* Typhimurium, y *Salmonella* Saintpaul recuperadas del interior del tomate higienizados con hipoclorito de sodio (t: 0 h y t: 3 días con Cl) no reportaron cuentas viables en ninguno de los órganos. De los órganos removidos y procesados de los individuos inoculados con *Salmonella* Saintpaul en SSF se recuperaron UFC en cantidades variables de acuerdo al inóculo administrado (Cuadro 9), resaltando que en el 50% (3/6) de los individuos se recuperaron cuentas viables en el tracto gastrointestinal y en dos de ellos en bazo e hígado.

Cuadro 9. Recuperación de células de *Salmonella* Saintpaul en órganos.

Inóculo	Porcentaje de individuos colonizados	UFC recuperadas del tracto gastrointestinal (UFC/órgano)	UFC recuperadas del Bazo	UFC recuperadas del Hígado
SSF 0.85%	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> Typhimurium en SSF al 0.85%	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> Saintpaul en SSF al 0.85%	50% (3/6)	25	155	790
		15	/	/
		20	5	110
t: 0h sin Cl	50% (3/6)	/	10	/
		/	5	/
		30	/	/
t: 3d sin Cl	16.66% (1/6)	204,400	10,435	22,740
t: 0h con Cl	/	/	/	/
t: 3d con Cl	/	/	/	/

Los datos obtenidos con *Salmonella* Saintpaul deben analizarse con precaución, debido al límite de detección de la técnica, donde se establece un rango contable de 25-250 UFC por placa de Petri de tamaño estándar [75]. Respecto a las UFC recuperadas de los individuos inoculados con *Salmonella* Saintpaul en SSF e internalizada en el tomate t: 0h sin Cl, es probable que estos resultados se deban a factores intrínsecos propios a los individuos, y no necesariamente representen la generalidad del grupo. En los individuos inoculados con *Salmonella* internalizada en el tomate higienizado con hipoclorito de sodio no se observaron cuentas viables en ninguno de los órganos. Por los datos obtenidos con *Salmonella* Saintpaul en SSF al 0.85% e internalizadas sin periodo de incubación (t: 0h) no se descarta la idea de que este serovar pueda colonizar eficientemente el tracto gastrointestinal de ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad.

Signos clínicos de ratones BALB/c

El estado clínico de los individuos de experimentación fue calculado con el sistema de puntuación señalado en *Salmonella* Newport. La mediana de los 6 signos clínicos evaluados en los 6 días de inoculación de los treinta y ocho individuos (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendida en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Saintpaul suspendidas en SSF al 0.85%, recuperados del interior del tomate sin incubación t: 0 horas e incubados t: 3 días sin Cl/con Cl) se encuentran en un rango de 12 a 11.5 puntos (Fig. 13).

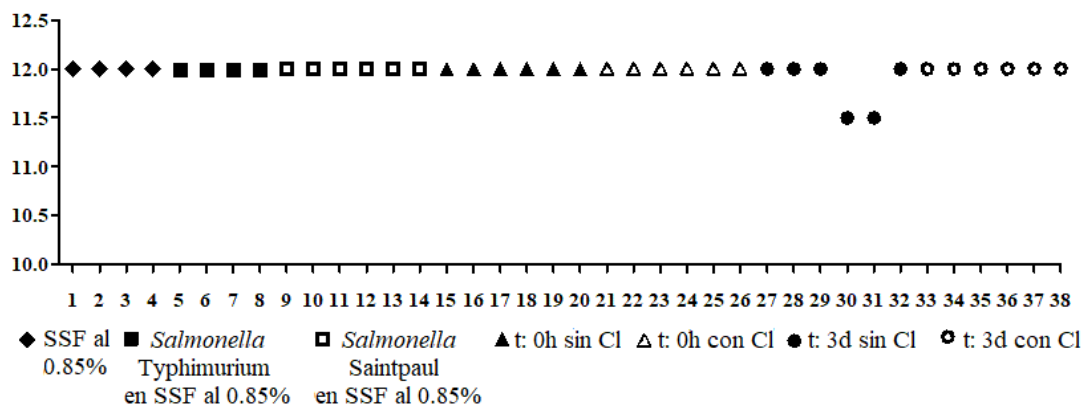


Figura 13. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Saintpaul. El gráfico muestra la mediana de los signos clínicos presentados en los seis días de tratamiento con *Salmonella* Saintpaul de los treinta y ocho individuos evaluados (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendidos en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Saintpaul suspendidas en SSF al 0.85%, recuperados del interior del tomate t: 0h y t: 3 días sin Cl/ con Cl) en dos réplicas independientes. Los signos clínicos evaluados fueron: consumo de alimento, actividad, condición del pelaje, posición encorvada, presencia de temblor y ataxia.

En la figura 13 se observa que 2 individuos inoculados con *Salmonella* Saintpaul recuperados del interior del tomate incubados 3 días post-inoculación y sin higienizar (t: 3 días sin CI) registraron una puntuación ligeramente menor (11.5) a lo registrado para el resto de los individuos (Fig. 13). No obstante, esta variación, los individuos inoculados con *Salmonella* Saintpaul se consideraron saludables [65]. Lo anterior implica que *Salmonella* Saintpaul no fue capaz de inducir manifestaciones visibles de infección sistémica en ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad ya que la puntuación obtenida por individuo estuvo en el rango de 12 a 11.5 (Fig. 13).

Cabe destacar que *Salmonella* Saintpaul suspendida en SSF al 0.85% a una dosis de 2.06 Log₁₀ UFC/mL colonizó del tracto gastrointestinal del 50% de los individuos evaluados, en contraste *Salmonella* Typhimurium en SSF al 0.85% no colonizó a ninguno de los individuos evaluados. Al respecto se ha reportado que ratones adultos (6 semanas de edad) no sucumben ante dosis menores de 4 Log₁₀ UFC de *Salmonella* Typhimurium y por lo tanto no se recuperan UFC en bazo, hígado e intestino en ratones BALB/c de seis semanas de edad [74].

Una posible explicación de la razón por la que *Salmonella* Saintpaul no fue eficiente en la colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado podría deberse a que existe evidencia de que carece de un factor de virulencia cromosómica. Esta conclusión surge de un experimento en el cual se introdujo el plásmido de virulencia (vsdC) de *Salmonella* Dublin, el cual confiere la capacidad de causar infección en ratones BALB/c, a algunos serovares libres del plásmido como *Salmonella* Heidelberg y Newport los cuales si produjeron infección al ser transformados con el plásmido vsdC. En contraste, la infección no se produjo en cepas de *Salmonella* Derby y Saintpaul que fueron transformadas con el mismo plásmido [83].

Colonización de *Salmonella* Montevideo en ratones BALB/c

Salmonella Montevideo fue el principal serovar aislado en muestras de carne molida de res, en un monitoreo realizado en los Estados Unidos que duró 10 años, también se ha aislado en carne molida de pollo, huevo de mesa, carne de cerdo, queso, pimienta [7], alfalfa, tomates, chiles rojos entre otros [37].

Treinta y ocho ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad fueron inoculados con un promedio de 2.48 Log₁₀ de UFC/mL de *Salmonella* Montevideo o *Salmonella* Typhimurium, suspendidas en solución salina fisiológica al 0.85% y *Salmonella* Montevideo internalizada en el tomate cherry higienizado con y sin hipoclorito de sodio a dos diferentes tiempos (t: 0h; y t: 3 días). Similar a lo descrito para *Salmonella* Newport los treinta y ocho ratones BALB/c se inocularon por vía oral, durante 6 días continuos. El inóculo administrado se determinó por la técnica de siembra por extensión en placas de agar AST-Rf (0.1 g/L) incubadas durante 24 h a 37 °C. Las UFC obtenidas se reportaron como Log₁₀ UFC/mL. Las cuentas viables recuperadas de los inóculos administrados a los ratones BALB/c (n=38) muestran que los inóculos suspendidos en SSF al 0.85% (*Salmonella* Montevideo y *Salmonella* Typhimurium) o recuperados del interior del tomate sin higienizar (*Salmonella* Montevideo t: 0 horas y t: 3 días sin Cl) fueron estadísticamente homogéneos P>0.05 (Fig. 14).

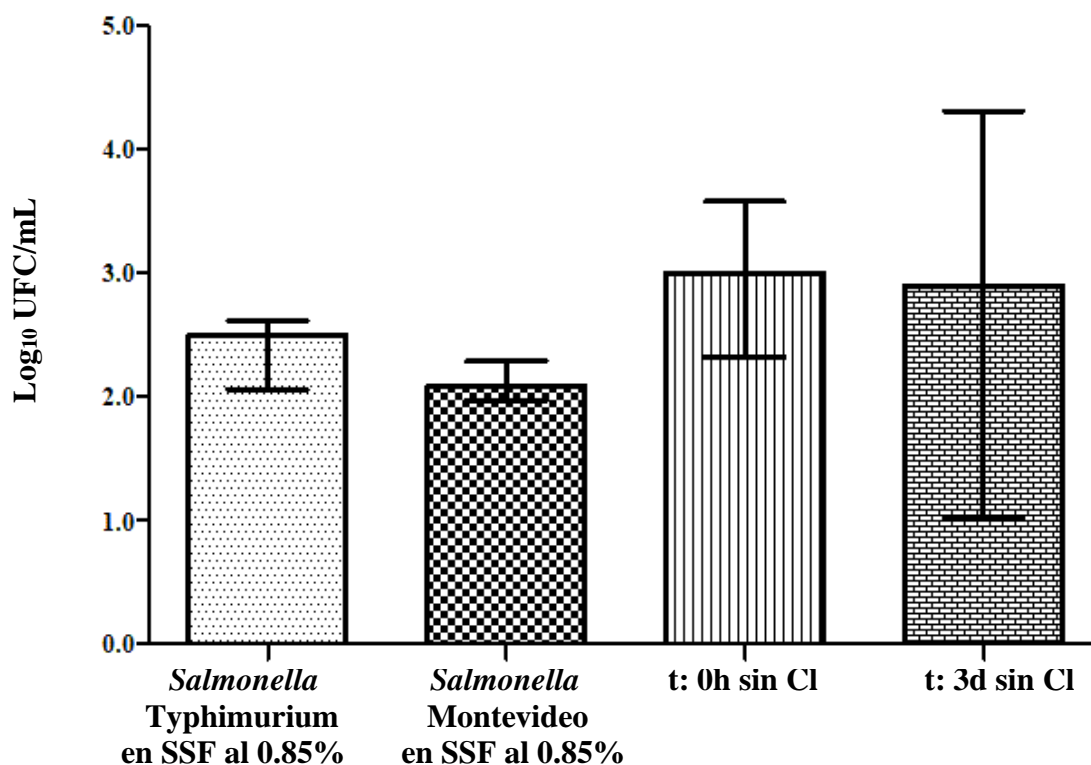


Figura 14. UFC inoculadas a ratones vía oral con *Salmonella* Montevideo. El gráfico muestra la mediana en Log₁₀ de las UFC inoculadas durante 6 días/réplica (n=12). Se realizó el análisis estadístico de los datos con la prueba de rangos de Kruskal-Wallis con P>0.05. Las barras muestran el rango intercuartílico donde se concentra el 50% de los datos.

Los inóculos recuperados del interior del tomate (*Salmonella* Montevideo t: 0 horas y t: 3 días) tratados con hipoclorito de sodio no reportaron cuentas viables cultivables en placas de AST-Rf 0.1 g/L, por lo que se omitieron de la figura 14.

Recuperación de *Salmonella* Montevideo en el modelo murino

De los treinta y ocho individuos estudiados en este experimento, sólo de 1 individuo se recuperaron UFC en el tracto gastrointestinal e hígado, el cual fue inoculado con *Salmonella* Montevideo recuperado del interior del tomate sin incubación y sin higienizar (t: 0 horas sin Cl). También se recuperaron UFC en el tracto gastrointestinal de un solo individuo inoculado con *Salmonella* Montevideo recuperado del interior del tomate sin incubación post-inoculación e higienizado con hipoclorito de sodio (t: 0 horas con Cl). Un fenómeno similar fue observado en los individuos inoculados con *Salmonella* Montevideo internalizadas en el tomate e incubados 3 días post-inoculación y sin higienizar (t: 3d sin Cl) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Recuperación de células de *Salmonella* Montevideo en órganos.

Inóculo	Porcentaje de individuos colonizados	UFC recuperadas del tracto gastrointestinal (UFC/órgano)	UFC recuperadas del Bazo	UFC recuperadas del Hígado
SSF 0.85%	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> Typhimurium en SSF al 0.85%	/	/	/	/
<i>Salmonella</i> Montevideo en SSF al 0.85%	/	/	/	/
t: 0h sin Cl	16.66 % (1/6)	160	/	85
t: 3d sin Cl	16.66 % (1/6)	1000	/	/
t: 0h con Cl	16.66 % (1/6)	550	/	/
t: 3d con Cl	/	/	/	/

El número de individuos que fueron colonizados (1/6) no representa la generalidad del grupo estudiado y la recuperación de cuentas viables observadas puede ser inherentes al individuo.

En general, *Salmonella* Montevideo obtuvo una menor recuperación de UFC en órganos e individuos en comparación a lo obtenido con *Salmonella* Newport y Saintpaul. Una posible explicación de este comportamiento podría deberse a que este serovar carece de genes tales como *gogA*, *gogB*, *sseI*, *gtgE*, *sspH1*, *sopE* y *sodC1* que codifican efectores importantes para la supervivencia y persistencia en células hospedantes, ya que regulan negativamente su respuesta inmune. Otros genes de virulencia que no están presentes en *Salmonella* Montevideo son: *spv* el cual retrasa la muerte de las células epiteliales, *sseK2* que inhibe la respuesta antibacteriana e inflamatoria del huésped y *sspH2* que es importante en el tráfico y la maduración de la vacuola que contiene a *Salmonella* por sus siglas (SCV) [84].

Signos clínicos de ratones BALB/c

Similar a lo realizado para *Salmonella* Newport y Saintpaul, el estado clínico de los individuos de experimentación fue calculado por un sistema de puntuación. La mediana de los 6 signos clínicos evaluados en los 6 días de inoculación de los treinta y ocho individuos (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendidos en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Montevideo suspendidas en SSF al 0.85%, recuperados del interior del tomate sin incubación t: 0 horas e incubados t: 3 días sin CI/con CI) muestran un rango de 11 a 12 puntos (Fig. 15), rango que se considera como saludable.

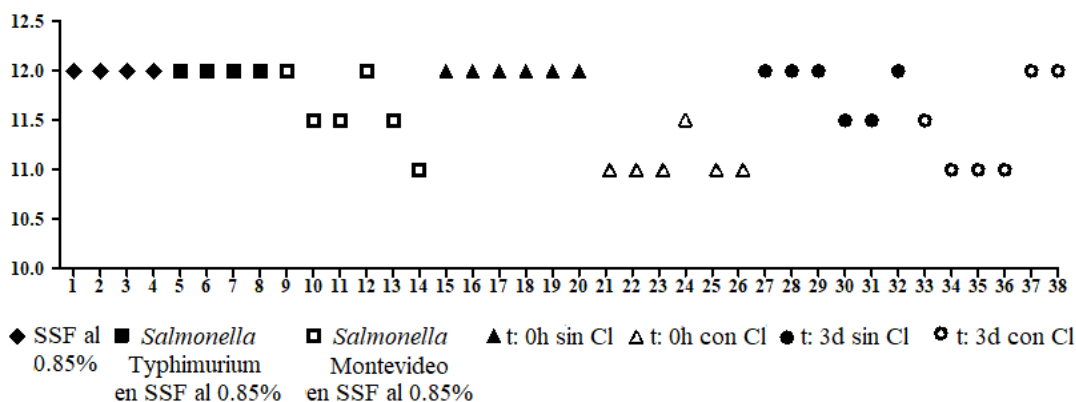


Figura 15. Signos clínicos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Montevideo. El gráfico muestra la mediana de los signos clínicos presentados en los seis días de tratamiento con *Salmonella* Montevideo de los treinta y ocho individuos evaluados (n=4/SSF al 0.85%) (n=4/*Salmonella* Typhimurium suspendidos en SSF al 0.85%) (n=6/*Salmonella* Montevideo suspendidas en SSF al 0.85 %, *Salmonella* Montevideo recuperados del interior del tomate t: 0h y t: 3 días sin CI/ con CI) en dos réplicas independientes. Los signos clínicos que se evaluaron fueron: consumo de alimento, actividad, condición del pelaje, posición encorvada, presencia de temblor y ataxia.

La ausencia de signos clínicos en los ratones BALB/c puede deberse a la edad de los ratones utilizados en el experimento (de cinco a seis semanas de edad) la cual no es susceptible a la enfermedad. Al respecto, Simmons & Simpson (1980) [85] observaron una epidemia de salmonelosis asociado con *Salmonella* Montevideo en 6 colonias de ratones albino (AS 1, BALB/c, CBA, C3H, C57BL y DBA/2). Después de un mes de seguimiento reportaron que las manifestaciones clínicas sólo se presentaron en ratones de menos de 3 semanas de edad de las cepas de ratón albino AS 1, BALB/c, sin que ocurriera la muerte de ningún individuo de 4 o más semanas de edad. Las manifestaciones clínicas observadas en ratones de menos de 3 semanas de edad fueron pérdida de la actividad, pelaje hirsuto y sin brillo, anorexia y pérdida de peso; asimismo, eventualmente desarrollaban conjuntivitis y la frecuencia respiratoria acelerada. Otro estudio realizado con *Salmonella* Abortusovis, Enteritidis y Montevideo donde se inocularon ratones BALB/c por vía oral con aproximadamente 10^9 UFC de cada cepa de *Salmonella* no reportaron manifestaciones clínicas en ninguno de los individuos estudiados [86]. Con base a los datos obtenidos se infiere que en este estudio *Salmonella* Montevideo no es eficiente en la colonización del tracto gastrointestinal, hígado y bazo en ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad cuando es inoculada por vía oral en SSF o internalizada en tomate, durante 6 días continuos.

Comparación de la infección de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en el modelo murino

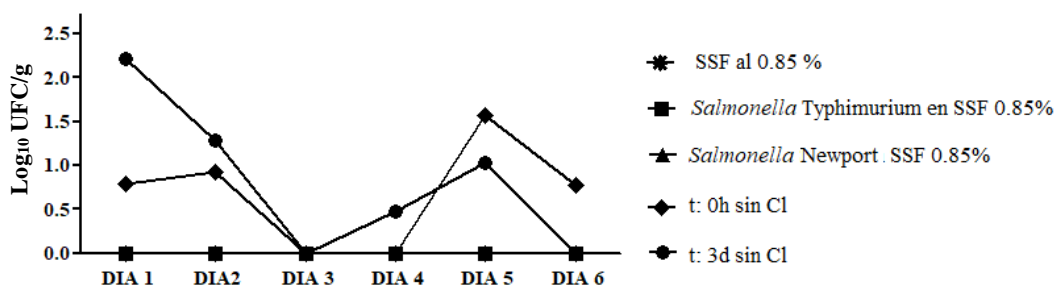
La mayoría de los individuos de las 3 cepas estudiadas estuvieron en un rango de 11 a 12 puntos, el cual se considera como saludable Özkaya et al. (2012) [65]. En cambio, sobresalen 3 individuos de este rango, que pertenecen a los ratones inoculados con *Salmonella* Newport recuperadas del interior del tomate a los tres días post-inoculación sin cloro. Al contrastar las manifestaciones clínicas del modelo murino inoculados con *Salmonella* Newport y las cuentas viables recuperadas de los órganos de los mismos individuos, se sugiere que esta variación podría ser el inicio de manifestaciones clínicas de la infección sistémica.

Para evaluar si *Salmonella* era viable después de pasar por los jugos gástricos, se determinaron las cuentas viables de las cepas analizadas en las heces recuperadas de cada grupo inoculado con las diferentes preparaciones. Los resultados de las UFC recuperadas en

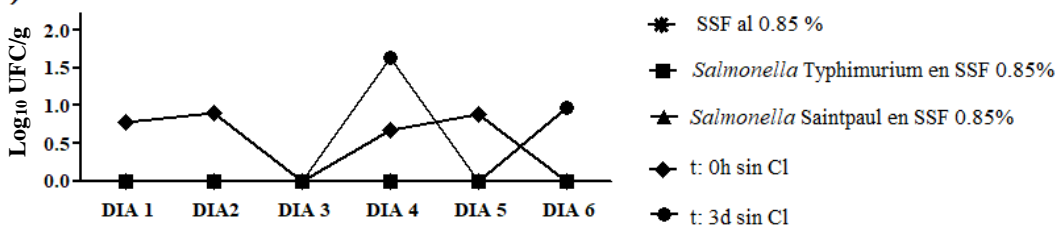
las heces muestran que en el grupo inoculado con SSF al 0.85% y *Salmonella* Typhimurium suspendida en SSF al 0.85% no se recuperaron UFC (Fig. 16).

La recuperación de cuentas viables en los distintos grupos muestras cantidades variables a lo largo de los días de inoculación para todos los grupos y serovares; sin embargo, al comprar los grupos inoculados con solución salina con los grupos inoculados con *Salmonella* internalizada en tomate, mediante la prueba de rangos de Kruskal-Wallis se observaron diferencia significativas (figura 16). Respecto a los grupos inoculados con *Salmonella* internalizada en el tomate higienizado con hipoclorito de sodio, no se recuperaron en todos los días y se observan en el cuadro 11.

a) UFC de *Salmonella* Newport recuperada en heces



b) UFC de *Salmonella* Saintpaul recuperadas en heces



c) UFC de *Salmonella* Montevideo recuperadas en heces

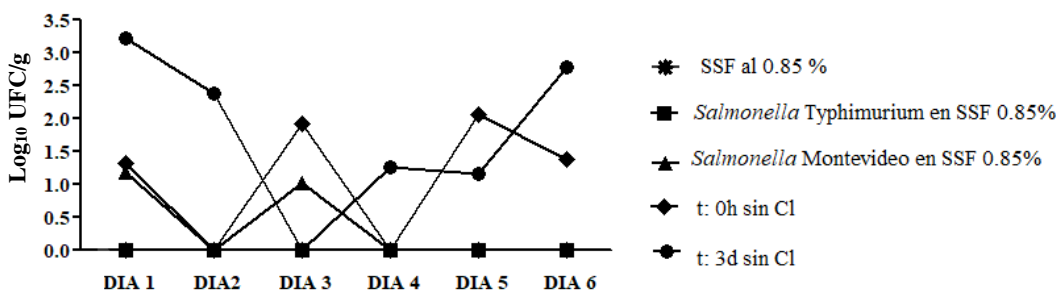


Figura 16. UFC de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo recuperadas de heces. Se grafica la mediana de los Log₁₀ UFC de las heces recolectadas en cada uno de los grupos analizados durante los 6 días de inoculación de dos réplicas independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de rangos de Kruskal-Wallis con P<0.05.

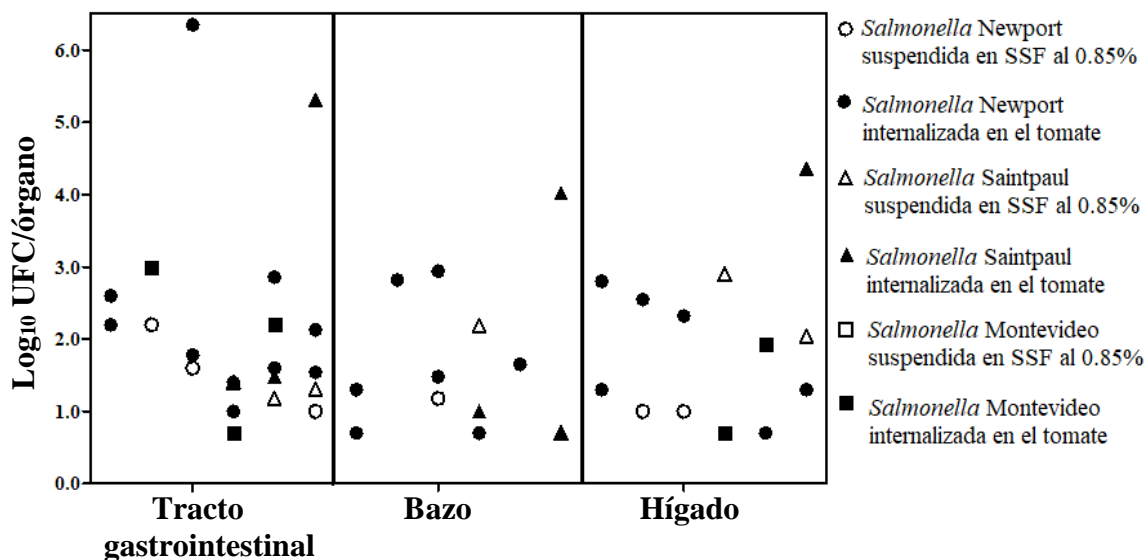
Cuadro 11. UFC de *Salmonella* Newport y Montevideo recuperadas en heces.

Día	<i>Salmonella</i> Newport t: 3d con CI	<i>Salmonella</i> Montevideo t: 0h con CI
1	0.36 Log ₁₀ UFC/g	1.21 Log ₁₀ UFC/g
4	1.36 Log ₁₀ UFC/g	1.31 Log ₁₀ UFC/g
5	0.38 Log ₁₀ UFC/g	0.00 Log ₁₀ UFC/g

Es probable que la recuperación nula de UFC en heces de los grupos inoculados con *Salmonella* Typhimurium se deba a la cantidad de inóculo administrado vía oral (10^2 - 10^3), ya que se ha descrito que dosis pequeñas de *Salmonella* Typhimurium (10^3) inoculados por vía oral no se recuperan en heces [87]. Los datos de recuperación en heces y la ausencia de manifestaciones clínicas en los inóculos de *Salmonella* Typhimurium sugieren que las bacterias perecen durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal.

Comparando las UFC recuperada de las heces de las 3 cepas estudiadas, podemos inferir que los serotipos que tuvieron la capacidad de prevalecer en heces fueron las inoculadas en el tomate, sugiriendo que el alimento protege a *Salmonella* de la acidez gástrica [88] [89]. La cantidad variable de Log₁₀ UFC recuperadas por día probablemente se deba a que se produce una excreción transitoria de los bacilos en las heces [78]. Tomando en cuenta la información anterior y los resultados obtenidos en las heces y órganos se sugiere que el tomate puede proteger a los serotipos de *Salmonella* estudiados contra las condiciones ácidas del estómago y facilitar la llegada y colonización del tracto gastrointestinal.

Respecto a las UFC recuperadas en órganos, en la figura 17 se presenta el total de órganos en los cuales se recuperaron cuentas viables de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo. De un total de 270 órganos procesados sólo en 47 órganos se recuperaron UFC en las 3 cepas estudiadas inoculadas con los diferentes grupos evaluados; tomando los 47 órganos colonizados por *Salmonella* como el 100% se destaca que el 74.46% (35/47) de la colonización en órganos fue de ratones inoculados con *Salmonella* internalizada en el tomate, en contraste con los inóculos de las tres cepas suspendidas en SSF al 0.85% sólo se recuperó el 25.53% (12/47) de los órganos (Fig. 17).



17. UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella*. Se muestran los Log₁₀ UFC recuperadas de órganos de ratones BALB/c inoculados con *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo suspendidas en SSF al 0.85% (figuras blancas) y recuperadas del interior del tomate (figuras negras).

Comparando la capacidad de colonización de las tres cepas estudiadas se infiere que *Salmonella* Montevideo y Saintpaul no son eficientes en la colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado en comparación a lo observado con *Salmonella* Newport en donde se recuperaron UFC en la mayor cantidad de los individuos evaluados (Fig. 19). Lo reportado con *Salmonella* Newport puede relacionarse con su capacidad de adaptación efectiva a entornos cambiantes, tales como las condiciones de la superficie de las hojas de las plantas hasta los ambientes ácidos de los tomates y macrófagos [90].

7. Conclusión y perspectivas

Los resultados obtenidos muestran que la cepa de *Salmonella* Newport analizada en este estudio e internalizada en el tomate cherry no higienizado tienen mayor capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal, bazo e hígado en el modelo murino (*Mus musculus*) BALB/c; colonizando el 92% de los individuos evaluados.

La higienización con 288 ppm de hipoclorito de sodio en el tomate cherry internalizado con *Salmonella* Newport en tiempo cero horas y tres días, disminuyó la capacidad de colonización del tracto gastrointestinal, bazo e hígado en el modelo murino; colonizando el 41% de los individuos evaluados.

Nuestros resultados y el poco conocimiento existente sobre la interacción de *Salmonella* con el fruto o la planta del tomate, genera la oportunidad para estudiar más a fondo los mecanismos fisiológicos y moleculares existentes en la interacción entre los serotipos estudiados y el tomate, los cuales pueden ocasionar cambios en la virulencia de *Salmonella* y el desarrollo de la infección.

7. Literatura citada

- [1] T. M. Dawoud, Z. Shi, Y. . M. Kwon y S7. C. Ricke, «Overview of salmonellosis and food-borne *Salmonella*: historical and current perspectives,» de *Producing Safe Eggs*, Academic Press, 2017, pp. 113-138.
- [2] P. A. Grimont y F. X. Weill, «Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars,» *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, vol. 9, pp. 1-166, 2007.
- [3] M. P. Ryan, . J. O'Dwyer y C. C. Adley, «Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*,» *BioMed research international*, vol. 2017, pp. 1-6, 2017.
- [4] S. Issenhuth-Jeanjean, P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P. I. Fields y F. X. Weill, «Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme,» *Research in microbiology*, vol. 165, n° 7, pp. 526-530, 2014.
- [5] D. Arrieta Baez, R. Ruiz de Esparza y M. Jiménez Estrada, «Mexican Plants Used in the Salmonellosis Treatment,» de *Salmonella - A Diversified Superbug*, IntechOpen, 2012, pp. 169-184.
- [6] R. Albuquerque Costa, F. C. Teles de Carvalho y R. H. Silva dos Fernandes Vieira, «Antibiotic Resistance in *Salmonella*: Risk for Tropical Aquaculture,» de *Salmonella-A Diversified Superbug*, IntechOpen, 2012, pp. 195- 206.
- [7] A. Andino y . I. Hanning, «*Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars.,» *The Scientific World Journal*, pp. 1-16, 2015.
- [8] F. W. Schofield, «*Salmonella* infections of domestic animals: their relationship to Salmonellosis (food infection in man),» *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, vol. 9, n° 3, pp. 62 - 68, 1945.
- [9] A. Álvarez-Ordóñez, . M. Begley , M. Prieto, W. Messens , . M. López, A. Bernardo y C. Hill , «*Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract,» *Microbiology*, vol. 157, n° 12, pp. 3268-3281, 2011.
- [10] Elika, «Elikagaien Segurtasuna,» 23 Mayo 2019. [En línea]. Available: <https://elikagaiensegurtasuna.elika.eus/salmonella/>. [Último acceso: 11 junio 2019].
- [11] A. Fàbrega y J. Vila, «*Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation,» *Clinical microbiology reviews*, vol. 26, n° 2, pp. 308-341, 2013.
- [12] I. M. Figueroa Ochoa y A. Verdugo Rodríguez, «Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp,» *Revista latinoamericana de microbiología*, vol. 49, n° 1-2, pp. 25-42, 2005.
- [13] J. Fierer y D. G. Guiney, «Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection.,» *The Journal of clinical investigation*, vol. 107, n° 7, pp. 775-780, 2001.

- [14] E. H. Weening, J. D. Barker, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, R. M. Tsois y A. J. Bäumlner, «The *Salmonella* enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice,» *Infection and immunity*, vol. 73, n° 6, pp. 3358-3366, 2005.
- [15] G. S. Chilcott y K. T. Hughes, «Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*,» *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, n° 4, pp. 694-708., 2000.
- [16] J. R. Ellermeier y J. M. Slauch, «Adaptation to the host environment: regulation of the SPII type III secretion system in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium,» *Current opinion in microbiology*, vol. 10, n° 1, pp. 24-29, 2007.
- [17] A. Haraga, M. B. Ohlson y S. I. Miller, «Salmonellae interplay with host cells,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, n° 1, pp. 53-66, 2008.
- [18] M. Hensel, «*Salmonella* Pathogenicity Island 2,» *Molecular microbiology*, vol. 36, n° 5, pp. 1015-1023, 2000.
- [19] N. Buchmeier, A. Blanc-Potard, S. Ehrt, D. Piddington, L. Riley y E. A. Groisman, «A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella* enterica,» *Molecular microbiology*, vol. 35, n° 6, pp. 1375-1382, 2000.
- [20] R. G. Gerlach, D. Jäckel, B. Stecher, C. Wagner, A. Lupas, W.-D. Hardt y M. Hensel, «*Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system,» *Cellular microbiology*, vol. 9, n° 7, pp. 1834-1850, 2007.
- [21] S. L. Marcus, J. H. Brumell, C. G. Pfeifer y B. B. Finlay, «*Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages,» *Microbes and infection*, vol. 2, n° 2, pp. 145-156, 2000.
- [22] J. Liu, J. T. Guo, Y. G. Li, R. N. Johnston, G. R. Liu y S. L. Liu, «The type VI secretion system gene cluster of *Salmonella* typhimurium: Required for full virulence in mice,» *Journal of basic microbiology*, vol. 53, n° 7, pp. 600-607, 2013.
- [23] M. L. Lesnick, N. E. Reiner, J. Fierer y D. G. Guiney, «The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells,» *Molecular microbiology*, vol. 39, n° 6, pp. 1464-1470, 2001.
- [24] P. Broz, M. B. Ohlson y D. M. Monack, «Innate immune response to *Salmonella* typhimurium, a model enteric pathogen,» *Gut microbes*, vol. 3, n° 2, pp. 62-70, 2012.
- [25] B. P. Hurley y B. A. McCormick, «Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella* typhimurium,» *Trends in microbiology*, vol. 11, n° 12, pp. 562-569, 2003.
- [26] M. M. Sánchez Jiménez y N. M. Cardona Castro, «Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal,» *Infectio*, vol. 7, n° 1, pp. 22-29, 2011.

- [27] R. Manon, A. Nadia, N. Fatemeh, V. P. Isabelle, V. Philippe y W. Agnes, «The different strategies used by *Salmonella* to invade host cells,» de *En Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*, IntechOpen, 2012, pp. 1-28.
- [28] K. Zhang, G. Griffiths , U. Repnik y M. Hornef, «Seeing is understanding: Salmonella's way to penetrate the intestinal epithelium.,» *International Journal of Medical Microbiology*,, vol. 308, n° 1, pp. 97-106, 2018.
- [29] P. Mastroeni y A. Grant, «Dynamics of spread of *Salmonella enterica* in the systemic compartment,» *Microbes and infection*, vol. 15, n° 13, pp. 849-857, 2013.
- [30] C. F. Pui, W. C. Wong, L. C. Chai, R. Tunung, P. Jeyaletchumi, M. S. Noor Hidayah , A. Ubong, M. G. Farinazleen, Y. K. Cheah y R. Son, «Salmonella: A foodborne pathogen.,» *International Food Research Journal*, vol. 18, n° 5, pp. 465-473, 2011.
- [31] OMS, «World Health Organization,» 20 Febrero 2018. [En línea]. Available: <https://www.who.int/topics/salmonella/es/>. [Último acceso: Lunes 3 Junio 2019].
- [32] O. Gal-Mor, E. C. Boyle y . G. A. Grassl, «Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ,» *Frontiers in microbiology*, vol. 5, n° 391, pp. 1-10, 2014.
- [33] L. Gutiérrez-Cogco, E. Montiel-Vázquez, P. Aguilera-Pérez y M. González-Andrade, «Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México,» *salud pública de méxico*, vol. 27, pp. 490-495, 2000.
- [34] Secretaría de Salud, «Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica,» 17 junio 2019. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/469528/sem23.pdf>. [Último acceso: 21 junio 2019].
- [35] S. D. Bennett, K. W. Littrell, T. A. Hill, M. Mahovic y C. B. Behraves, «Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990–2010: a recurring public health problem,» *Epidemiology & Infection*, vol. 143, n° 7, pp. 1352-1359, 2015.
- [36] J. A. Bartz, H. G. Yuk, M. J. Mahovic, B. R. Warren, A. Sreedharan y K. R. Schneider, «Internalization of *Salmonella enterica* by tomato fruit,» *Food Control*, vol. 55, pp. 141-150, 2015.
- [37] I. B. Hanning, J. D. Nutt y S. C. Ricke, «Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures,» *Foodborne pathogens and disease*, vol. 6, n° 6, pp. 635-648, 2009.
- [38] W. N. Irvine, I. A. Gillespie, F. B. Smyth, P. J. Rooney, A. McClenaghan, M. J. Devine y V. K. Tohan, «Investigation of an outbreak of *Salmonella enterica* serovar Newport infection,» *Epidemiology & Infection*, vol. 137, n° 10, pp. 1449-1456, 2009.

- [39] A. M. Valadez , K. R. Schneider y M. D. Danyluk, «Outbreaks of foodborne diseases associated with tomatoes,» *IFAS Extension*, pp. 1-5, 2013.
- [40] N. Holden, L. Pritchard y I. Toth, «Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria.,» *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, n° 4, pp. 689-703, 2009.
- [41] A. Wiedemann, I. Virlogeux-Payant, A. M. Chaussé, A. Schikora y P. Velge, «Interactions of *Salmonella* with animals and plants,» *Frontiers in microbiology*, vol. 5, n° 791, pp. 1-18, 2015.
- [42] J. D. Rossbach, R. C. Fink, M. J. Sadowsky y F. Diez-Gonzalez, «Factors influencing the *Salmonella* internalization into seedpods and whole plants of *Arachis hypogaea* (L.),» *Food microbiology*, vol. 66, pp. 184-189., 2017.
- [43] A. Schikora, A. Carreri, E. Charpentier y H. Hirt, «The dark side of the salad: *Salmonella* typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle,» *PLoS One*, vol. 3, n° 5, pp. -e2279, 2008.
- [44] A. V. Garcia, A. Charrier, A. Schikora, J. Bigeard, S. Pateyron, M.-L. de Tauzia-Moreau, A. Evrard, A. Mithöferd, M. . L. Martin-Magniette, I. Virlogeux-Payant y H. Hirt, «*Salmonella* enterica flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*,» *Molecular plant*, vol. 7, n° 4, pp. 657-674, 2014.
- [45] N. Shirron y S. Yaron, «Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium,» *PLoS One*, vol. 6, n° 4, p. e18855, 2011.
- [46] G. Gu, J. Hu, J. M. Cevallos-Cevallos, S. M. Richardson, J. A. Bartz y A. Van Bruggen, «Internal colonization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in tomato plants,» *PloS one*, vol. 6, n° 11, p. e27340, 2011.
- [47] J. D. Barak, L. C. Kramer y L.-y. Hao, «Colonization of Tomato Plants by *Salmonella* enterica Is Cultivar Dependent, and Type 1 Trichomes Are Preferred Colonization Sites,» *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 77, n° 2, pp. 498-504, 2011.
- [48] X. Guo, J. Chen, R. E. Brackett y L. R. Beuchat, «Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening,» *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 67, n° 10, pp. 4760-4764, 2001.
- [49] J. Zheng, S. Allard, S. Reynolds, P. Millner, G. Arce, R. Blodgett y E. Brown, «Colonization and internalization of *Salmonella* enterica in tomato plants,» *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 79, n° 8, pp. 2494-2502, 2013.
- [50] CONABIO, «Biodiversidad Mexicana,» 2013. [En línea]. Available: <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/jitomate.html>. [Último acceso: 24 junio 2019].

- [51] F. M. Sobreira., F. M. Sobreira, C. F. Barrera Sánchez, D. Gonçalves Neder y F. de Pina Matta, «Análisis de ruta de tomate Cherry en poscosecha.,» *Agronomía Colombiana*, vol. 27, n° 3, pp. 401-406, 2009.
- [52] SAGARPA, «Jitomate Mexicano Planeación Agrícola Nacional 2017-2030,» SAGARPA, Ciudad de México, 2017.
- [53] S. Yaron, «Microbial attachment and persistence on plants.,» Academic Press, 2014, pp. 21-57.
- [54] X. Shi, Z. Wu, A. Namvar, M. Kostrzynska, K. Dunfield y K. Warriner, «Microbial population profiles of the microflora associated with pre-and postharvest tomatoes contaminated with *Salmonella typhimurium* or *Salmonella montevideo*,» *Journal of applied microbiology*, vol. 107, n° 1, pp. 329-338, 2009.
- [55] J. T. Noel, N. Arrach, A. Alagely, M. McClelland y M. Teplitski, «Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology,» *PLoS One*, vol. 5, n° 8, p. e12406., 2010.
- [56] C. A. Kaspar y M. L. Tamplin, «Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish,» *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, n° 8, pp. 2425-2429, 1993.
- [57] E. Cabrera-Diaz, C. M. Barbosa-Cardenas, J. A. Perez-Montaña, D. Gonzalez-Aguilar, C. Pacheco-Gallardo y J. Barba , «Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico,» *Journal of food protection*, vol. 76, n° 12, pp. 2004-2010, 2013.
- [58] A. G. Orozco García, «Dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) higienizados con hipoclorito de sodio,» Zapopan, 2017.
- [59] J. E. Monge-Pérez, «Characterization of 14 tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes grown under greenhouse conditions in Costa Rica,» *Tecnología en Marcha*, vol. 29, n° 4, pp. 58-68, 2014.
- [60] A. Warninga, A. K. Datta y J. A. Bartz, «Mechanistic understanding of temperature-driven water and bacterial infiltration during hydrocooling of fresh produce,» *Postharvest Biology and Technology*, vol. 118, pp. 159-174, 2016.
- [61] X. Xia, Y. Luo, Y. Yang, B. Vinyard y J. Meng, «Effects of tomato variety, temperature differential, and post-stem removal time on internalization of *Salmonella enterica* serovar Thompson in tomatoes,» *Journal of food protection*, vol. 75, n° 2, pp. 297-303, 2012.
- [62] J. H. Siller-Cepeda , M. A. Báez Sañudo, A. Sañudo Barajas y R. Báez Sañudo, «SENASICA,» 2002. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/manuales-buenas-practicas-agricolas>. [Último acceso: 23 MAYO 2018].

- [63] Diario Oficial de la Federación, «Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO- 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.,» pp. 1-58, 1999.
- [64] X. Zhu, H. Lei, J. Wu, J. V. Li, H. Tang y Y. Wang, «Systemic Responses of BALB/c Mice to *Salmonella typhimurium* Infection,» *Journal of Proteome Research*, vol. 13, n° 10, pp. 4436-4445, 2014.
- [65] H. Özkaya, A. B. Akcan, G. Aydemir, S. Aydinöz, Y. Razia, S. T. Gammon y J. McKinney, «*Salmonella typhimurium* infections in BALB/c mice: a comparison of tissue bioluminescence, tissue cultures and mice clinical scores,» *New Microbiologica*, vol. 35, n° 1, pp. 53-59, 2012.
- [66] A. S. de Aluja y F. C. Casas , Técnicas de necropsia en animales domésticos, 2a. ed., D. J. Aldrete Velasco, Ed., D.F.: El Manual Moderno, 2002.
- [67] Diario Oficial de la Federación, «Norma Oficial Mexicana. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.,» pp. 1-15, 2002.
- [68] O. Rodríguez-Morales, M. Fernández-Mora, I. Hernández-Lucas, A. Vázquez, J. L. Puente y E. Clava, «*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ompS1 and ompS2 mutants are attenuated for virulence in mice,» *infection and immunity*, vol. 74, n° 2, pp. 1398-1402, 2006.
- [69] J. Gonzalez Pedraza, N. Pereira Sanandres, Z. Soto Varela, E. Hernández Aguirre y J. Villarreal Camacho, «Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección,» *Salud Uninorte*, vol. 30, n° 1, pp. 73-94, 2014.
- [70] Diario Oficial de la Federación, «Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.,» pp. 1-96, 2014.
- [71] B. R. Jackson, P. M. Griffin, D. Cole, K. A. Walsh y S. J. Chai, «Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008,» *Emerging infectious diseases*, vol. 8, pp. 1239-1244, 2013.
- [72] R. J. Dubos y R. W. Schaedler, «The effect of the intestinal flora on the growth rate of mice, and on their susceptibility to experimental infections,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 111, n° 3, pp. 407-417, 1960.
- [73] B. Stecher, R. Robbiani, A. W. Walker, A. M. Westendorf, M. Barthel, M. Kremer, S. Chaffron, A. J. Macpherson, J. Bue, J. Parkhil, G. Dougan, C. v. Mering y W.-D. Hardt, «*Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota,» *PLoS biology*, vol. 5, n° 10, p. e244, 2007.
- [74] S. M. Burns-Guydish, I. N. Olomu, H. Zhao, R. J. Wong, D. K. Stevenson y C. H. Contag, «Monitoring age-related susceptibility of young mice to oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection using an in vivo murine model,» *Pediatric research*, vol. 58, n° 1, pp. 153-158, 2005.

- [75] S. Sutton, «Accuracy of plate counts,» *Journal of validation technology*, vol. 17, n° 3, pp. 42-46, 2011
- [76] J. D. Oliver, «The Viable but Nonculturable State in Bacteria,» *The Journal of Microbiology*, vol. 43, pp. 94-100, 2005
- [77] A. Menendez, E. T. Arena, J. A. Guttman, L. Thorson, B. A. Vallance, W. Vogl y B. B. Finlay, «*Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever,» *The Journal of infectious diseases*, vol. 200, n° 11, pp. 1703-1713., 2009.
- [78] R. T. Habermann y W. J. Fletcher P. , «Salmonellosis in laboratory animals,» *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 20, n° 5, pp. 933-947, 1958.
- [79] D. M. Monack, D. M. Bouley y S. Falkow, «*Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 199, n° 2, pp. 231-241, 2014.
- [80] A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, A. J. Bäumlner, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren y W. T. Parks, «Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes,» *Nature*, vol. 401, n° 6755, pp. 804-808, 1999.
- [81] T. Akiyama, A. A. Khan, C. M. Cheng y R. Stefanova, «Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples,» *Food microbiology*, vol. 28, n° 6, pp. 1124-1128, 2011.
- [82] A. Lehmacher, J. Bockemühl y S. Aleksic, «Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips.,» *Epidemiology & Infection*, vol. 115, n° 3, pp. 501-511, 1995.
- [83] F. C. Fang, M. Krause, J. Fierer y D. G. Guiney, «Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence,» *Journal of bacteriology*, vol. 173, n° 21, pp. 6783-6789, 1991.
- [84] S. V. Nguyen, D. M. Harhay, J. L. Bono, T. P. Smith, P. I. Fields, B. A. Dinsmore, M. Santovenia, R. Wang, J. M. Bosilevac y G. P. Harhay, «Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Montevideo reveals lineage-specific gene differences that may influence ecological niche association,» *Microbial genomics*, vol. 4, n° 8, pp. 1-17, 2018.
- [85] J. C. Simmons y W. Simpson, «*Salmonella* Montevideo salmonellosis in laboratory mice: successful treatment of the disease by oral oxytetracycline,» *Laboratory animals*, vol. 14, n° 3, pp. 217-219, 1980.
- [86] M. C. Swearingen, S. Porwollik, P. T. Desai, M. McClelland y B. M. Ahmer, «Virulence of 32 *Salmonella* Strains in Mice,» *PloS one*, vol. 7, n° 4, p. e36043, 2012.

- [87] P. C. Miller y M. Bohnhoff, «A study of experimental *Salmonella* infection in the mouse,» *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 111, n° 2, pp. 107-116, 1962.
- [88] J. L. Smith, «The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions,» *Journal of food protection*, vol. 66, n° 7, pp. 1292-1303, 2003.
- [89] J. Y. D'aoust, «*Salmonella* and the chocolate industry. A review,» *Journal of Food Protection*, vol. 40, n° 10, pp. 718-727, 1977.
- [90] A. S. George, C. E. Cox, P. Desai, S. Porwollik, W. Chu, M. H. de Moraes, M. McClelland, M. T. Brandl y M. Teplitski, «Interactions of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Pectobacterium carotovorum* within a tomato soft rot,» *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 84, n° 5, pp. e01913-17, 2018
- [91] J. Sambrook y D. W. Russell, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3rd ed., vol. 3, New York: CSH PRESS, 2001

Anexos

Anexo A. Medios para la preparación de Luria de Bertani (LB)

Para la preparación de 1 Litro de caldo LB se homogenizan los reactivos del cuadro 1, una vez homogenizados se ajusta el pH a 7.5. Para ajustar el pH, si este es menor al señalado, se le adiciona hidróxido de sodio 1 Normal y si es mayor, se le agrega ácido clorhídrico 1 Normal.

Cuadro 1. Medios de cultivo para la preparación de caldo LB

Medio de cultivo	Cantidad (g)
Triptona	10
Cloruro de sodio	10
Extracto de lavadura	5
Agua	Cbp 1 L

Anexo B. Certificados de calidad y salud de ratones BeALB/c

Experimento realizado el 27-09-18.



CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Factura E3651** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México al día **19 del mes de septiembre de 2018**.

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	20	BALB/cAnNHsd	3-4 semanas	Hembra

México, D.F. 19 de Septiembre de 2018
Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio
Ciudad de México, D.F.

Médico Veterinario Responsable

Envigo RMS SA de CV
Ignacio Aldama 74 int 6, Col del Carmen Coyoacán 04100, Ciudad de México
T +52 55 62735030 / +52 55 62733375

envigo.com

Experimento realizado el 12-10-18.



CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Remisión 3346** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México al día **04 del mes de Octubre de 2018**.

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	20	BALB/cAnNHsd	3-4 semanas	Hembras


Marisol Rivera Huerta
Médico Veterinario Zootecnista
Cédula Profesional No. 3163086

Médico Veterinario Responsable

Envigo RMS SA de CV
Ignacio Aldama 74 int 6, Col del Carmen Coyoacán 04100, Ciudad de México
T +52 55 62735030 / +52 55 62733375

Experimento realizado el 13-11-18.

ENVIGO

CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Remisión 3466** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México al día **05 del mes de Noviembre de 2018**.

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	20	BALB/cAnNHsd	3-4 semanas	Hembras

Marisol Rivera Huerta
Médico Veterinario Zootecnista
Cédula Profesional No. 316388F

Médico Veterinario Responsable

Envigo RMS SA de CV
Ignacio Aldama 74 int 6, Col del Carmen Coyoacán 04100, Ciudad de México
+52 55 62735030 +52 55 62733375

Experimento realizado el 11-12-18.

ENVIGO

CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Remisión 3569** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México al día **03 del mes de diciembre de 2018**.

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	20	BALB/cAnNHsd	3-4 semanas	Hembras


Marisol Pineda Huerta
Médico Veterinario

Médico Veterinario Responsable

Envigo RMS SA de CV
Ignacio Aldama 74 int 6, Col del Carmen Coyoacán 04100, Ciudad de México
T +52 55 62735030 / +52 55 62733375

Experimento realizado el 14-12-18.

CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Factura E4026** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México al día **06 del mes de diciembre de 2018**.


Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	20	BALB/cAnNHsd	3-4 semanas	Hembras

Marisol Rivera Huerta
Médico Veterinario Zootecnista
Cédula Profesional No. 3162988


Médico Veterinario Responsable

Envigo RMS SA de CV
Ignacio Aldama 74 int 6, Col del Carmen Coyoacán 04100, Ciudad de México
T +52 55 62735030 / +52 55 62733375

Experimento realizado el 22-01-19.



UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN □ FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO / Servicio de Inmunología

CERTIFICADO DE SALUD

Se expide el siguiente certificado de salud para los siguientes animales:


20 ratones hembras de la cepa BALB/C, los cuales fueron reproducidos en el Servicio de Inmunología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
Este certificado hace constar que los animales:

- Se encuentran en buen estado de salud y en condiciones físicas para realizar un viaje con cualquier destino nacional,
- No presentan síntomas de enfermedades infectocontagiosas en el momento de la exploración,
- Han sido desparasitados
- Se realizó un estudio microbiológico de los animales monitor y de las instalaciones en las que están alojados (se anexa copia de estudio microbiológico de caja monitor).


Dichos animales se acondicionaron en las instalaciones del bioterio y se prepararon para envío en 1 caja transportadoras con 20 animales.


Se expide el certificado el día 14 de enero del 2019.

En constancia firma,



Dr. Alberto Yairh Limón-Flores
Ced. Prof. 8028838
Responsable del bioterio


DEPARTAMENTO
DE INMUNOLOGIA

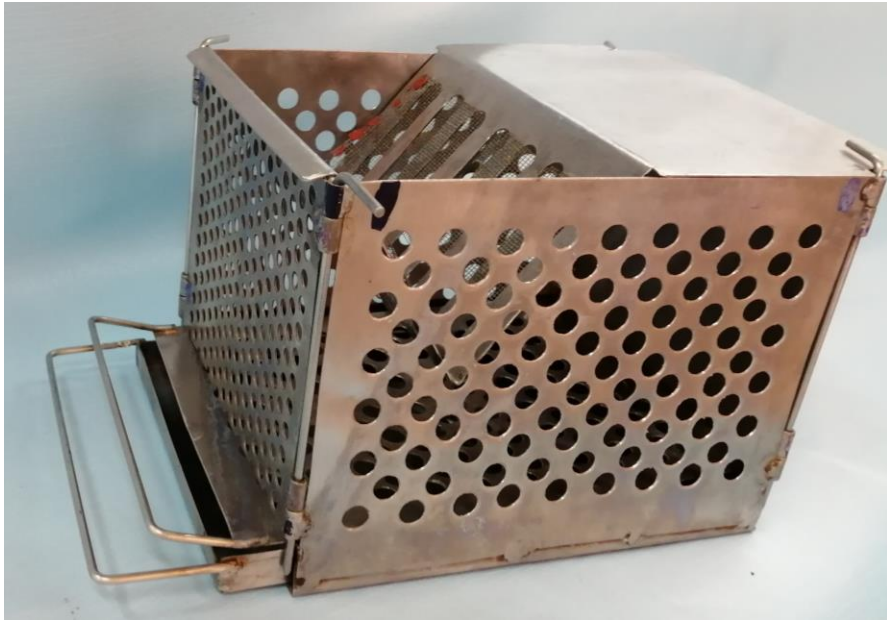


**Visión
2020
UANL**

*"Educación de clase mundial,
un compromiso social"*

Ave. Gonzalitos 235 Nte. Col. Mitras Centro
C.P. 64460, Monterrey, N.L., México
Tel. (81) 8329 4211, Fax: (81) 8333 1058
http://inmunomed_uanl.com

Anexo C. Diseño de jaulas



Anexo D. Formato de evaluación de signos clínicos

DÍA TX	FECHA	HORA	PESO	TEMP	APAR. HECES	ALIMENTACIÓN	ACTIVIDAD	PELAJE	POSICIÓN	TEMBLOR	ATAXIA						
						No consume	0	No hay	0	Áspero, opa.	0	Encorvado	0	Presente	0	Abierto, ext.	0
ALIMENTO	Gramos administrados					Disminuyó	1	Disminuyó	1	Disperso	1	Parcial	1	Parcial	1	Parcial	1
	Gramos recogidos					Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2
Observaciones:																	
DÍA TX	FECHA	HORA	PESO	TEMP	APAR. HECES	ALIMENTACIÓN	ACTIVIDAD	PELAJE	POSICIÓN	TEMBLOR	ATAXIA						
						No consume	0	No hay	0	Áspero, opa.	0	Encorvado	0	Presente	0	Abierto, ext.	0
ALIMENTO	Gramos administrados					Disminuyó	1	Disminuyó	1	Disperso	1	Parcial	1	Parcial	1	Parcial	1
	Gramos recogidos					Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2
Observaciones:																	
DÍA TX	FECHA	HORA	PESO	TEMP	APAR. HECES	ALIMENTACIÓN	ACTIVIDAD	PELAJE	POSICIÓN	TEMBLOR	ATAXIA						
						No consume	0	No hay	0	Áspero, opa.	0	Encorvado	0	Presente	0	Abierto, ext.	0
ALIMENTO	Gramos administrados					Disminuyó	1	Disminuyó	1	Disperso	1	Parcial	1	Parcial	1	Parcial	1
	Gramos recogidos					Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2
Observaciones:																	
DÍA TX	FECHA	HORA	PESO	TEMP	APAR. HECES	ALIMENTACIÓN	ACTIVIDAD	PELAJE	POSICIÓN	TEMBLOR	ATAXIA						
						No consume	0	No hay	0	Áspero, opa.	0	Encorvado	0	Presente	0	Abierto, ext.	0
ALIMENTO	Gramos administrados					Disminuyó	1	Disminuyó	1	Disperso	1	Parcial	1	Parcial	1	Parcial	1
	Gramos recogidos					Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2
Observaciones:																	
DÍA TX	FECHA	HORA	PESO	TEMP	APAR. HECES	ALIMENTACIÓN	ACTIVIDAD	PELAJE	POSICIÓN	TEMBLOR	ATAXIA						
						No consume	0	No hay	0	Áspero, opa.	0	Encorvado	0	Presente	0	Abierto, ext.	0
ALIMENTO	Gramos administrados					Disminuyó	1	Disminuyó	1	Disperso	1	Parcial	1	Parcial	1	Parcial	1
	Gramos recogidos					Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2	Normal	2
Observaciones:																	

Puntos utilizados para valorar el estado clínico por día son:

- 0 (presencia notable de alteraciones)
- 1 (alteraciones parcialmente visibles)
- 2 (ausencia de alteraciones)

El puntaje promedio por semana:

- Mayor a 8 (saludables)
- De 4 a 7 (moderadamente enfermos)
- Menor a 3 (gravemente enfermos)

Anexo E. Carta de aprobación expedida por parte del Comité de Bioética para el desarrollo del protocolo de experimentación en animales.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS/
Secretaría Académica / Coordinación de Investigación

CINV/164/2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto se hace constar que el proyecto, acorde a protocolo entregado en esta dependencia por la responsable Dra. en C. Jeannette Barba León, titulado "**Efecto de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en la colonización del sistema digestivo y bazo de ratones (*Mus musculus*) Balb/c**" se desarrolla siguiendo los lineamientos descritos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso y manejo de animales de experimentación.

Es importante señalar que todos los procedimientos a los animales de experimentación son conducidos con trato humanitario y ético.

Los colaboradores de este proyecto son la MVZ. Lilia Mercedes Mancilla Becerra, el Dr. en C. César Pedroza Roldán y el Dr. en C. Mario Alberto Ruiz López.


Se extiende la presente a petición de la interesada para los fines que juzgue convenientes.



COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN
C.U.C.B.A.

Las Agujas, Nextipac; Zapopan, Jalisco; 11 de diciembre de 2018

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"


DRA. BLANCA CATALINA RAMÍREZ HERNÁNDEZ
Coordinadora de Investigación

C.c.p. Archivo

Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Las Agujas; Nextipac, Zapopan, Jalisco
Tel. +52(33)3777 1150 Ext: 33229, 33105 y 32970 Directo: +52(33)3777 1155

Carta expedida por parte del Comité de Bioética al término del protocolo de experimentación en animales.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS/
Secretaría Académica / Coordinación de Investigación

C.INV.061/2019

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto se hace constar que el proyecto, acorde al protocolo entregado en esta dependencia por la responsable Dra. en C. Jeannette Barba León, titulado **"Efecto de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en la colonización del sistema digestivo y bazo de ratones (*Mus musculus*) Balb/c"** se desarrolló siguiendo los lineamientos descritos por el Reglamento de Bioética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso y manejo de animales de experimentación y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.


Es importante señalar que todos los procedimientos realizados a los animales de experimentación son conducidos con trato humanitario y ético.

Los colaboradores de este proyecto son la MVZ. Lilia Mercedes Mancilla Becerra, el Dr. en C. César Pedroza Roldán y el Dr. en C. Mario Alberto Ruiz López.

Se extiende la presente a petición de la interesada para los fines que juzgue convenientes.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac; Zapopan, Jalisco; 03 de abril de 2019


DRA. BLANCA CATALINA RAMÍREZ HERNÁNDEZ
Coordinadora de Investigación



C.c.p. Archivo

Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco
Tel. +52(33)3777 1150 Ext: 33229, 33105 y 32970 Directo: +52(33)3777 1155

Anexo F. Curso de capacitación de manejo y vías de administración en ratón



MEMORÁNDUM

Puebla, Pue., 15 de marzo de 2018.

**PARA: DRA. JEANNETTE BARBA LEÓN.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.**

**DE: M.V.Z. FRANCISCO RAMOS COLLAZO.
DIRECTOR DEL BIOTERIO "CLAUDE BERNARD"**

Informo a Usted que la M.V.Z. LILIA MERCEDES MANCILLA BECERRA, aprobó el curso de manejo y vías de administración en ratón.

Sin más por el momento, quedo a sus órdenes.

**ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"**

**M.V.Z. FRANCISCO RAMOS COLLAZO.
DIRECTOR DEL BIOTERIO "CLAUDE BERNARD"**



Anexo G. Procedimiento de la inoculación con sonda

Los animales de experimentación fueron retirados uno a uno de la jaula tomándolos de la zona media de la cola, y se apoyaron sobre la rejilla, sin soltarlo se colocó la base de la cola del ratón entre el dedo anular y el meñique, dejando libre el dedo pulgar e índice, para luego tomarlo de la parte superior del cuello y hombros, pellizcando la piel suave y firmemente. El animal se sostiene a la altura de los ojos y se coloca la sonda esofágica (previamente cargada) introduciéndola lentamente de forma lateral a la lengua; cuando el ratón expone la lengua por reflejo, comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago. Posterior a la administración del inóculo (500 μ L) se retira la sonda y se coloca el ratón de nuevo en la jaula.

Anexo H. Procedimiento de eutanasia en ratones

En el fondo de un tubo cónico de 50 mL se colocó un algodón impregnado con aproximadamente 0.3 mL de anestesia SOFLORAN® VET (Isoflurano), se introdujo al ratón en dicho tubo y se cerró parcialmente hasta que el animal perdió movilidad (aproximadamente de 30 – 60 segundos, después de la inhalación). Después se procedió a realizar la eutanasia por dislocación cervical de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Brevemente, se colocó al animal sobre una superficie plana en decúbito ventral, se sujetó colocando el dedo índice en la región cervical ejerciendo presión y con la otra mano se jaló de la cola con fuerza para provocar la separación de las vértebras cervicales del cráneo.

Anexo I. Preparación PBS

Para la preparación de 1 Litro de PBS se realizan diluciones separadas de los reactivos especificados en el cuadro 2. Con las soluciones preparadas se realiza la mezcla correspondiente al pH 7.4 de acuerdo con lo descrito por Sambrook & Russell (2001) [91] (cuadro 3).

Cuadro 2. Reactivos para la preparación de PBS 100 mL a 0.1M

Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4)	14.196 g
Fosfato de Sodio Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	11.99 g

Cuadro 3. Preparación para 0.1M de PBS a 25°C

pH	Volumen para 1 M Na_2HPO_4 (mL)	Volumen para 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (mL)
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4

Sambrook y Russell (2001) [91].