



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Dinámicas de internalización de *Salmonella*  
Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates  
cherry (*Solanum lycopersicum* var.  
cerasiforme) higienizados con hipoclorito de  
sodio.**

**Tesis**

**para obtener el grado de**

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

**Presenta**

**Adriana Guadalupe Orozco García**

**DIRECTOR**

**Dra. Jeannette Barba León**

**Zapopan, Jalisco**

**Diciembre del 2017**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias


**Dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) higienizados con hipoclorito de sodio.**

Por

**Adriana Guadalupe Orozco García**

**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

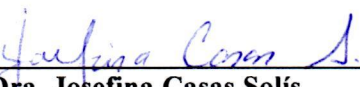
30-10-17  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Carla V. Sánchez Hernández**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado


31-10-17  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Elisa Cabrera Díaz**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

30/10/17  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Josefina Casas Solís**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

30/oct/17  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Lino De La Cruz Larios**  
Sinodal e integrante del jurado

30/10/2017  
Fecha

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inocuidad de Alimentos 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 de la Dra. Carla V. Sánchez Hernández, Dra. Elisa Cabrera Díaz, Dra. Josefina Casas Solís, Dra. Martha Escoto Delgadillo y el Dr. Lino de la Cruz Larios. 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 581243 para estudios de maestría de la L. C. A. Adriana Guadalupe Orozco García proporcionada por el CONACyT.

## **Dedicatoria**

A mi familia

“Mira de cerca al presente que estás construyendo, porque debe parecerse al futuro con el que sueñas”  
(Alice Walker)

## Agradecimientos

A Dios por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles en esta etapa de mi vida. A mis padres Ma. Irma García y Gpe. Raúl Orozco por mostrarme con su ejemplo y dedicación que nada es imposible, por brindarme su apoyo incondicional, comprensión e impulsarme todos los días a ser mejor persona a nunca rendirme por lo que quiero y a mostrarme que no existen barreras para lograr mis metas. A Edgar Ochoa por estar a mi lado, confiar, creer y apoyarme e impulsarme siempre en mis decisiones.

A mi directora de tesis la Dra. Jeannette Barba, por confiar y creer en mí desde el primer instante que me presente en su oficina, por estar siempre pendiente no solo del proyecto sino también de mi persona, por sus detalles, brindarme su amistad, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por ayudarme a creer en mí, a superarme y demostrarme que nada es imposible. Sobre todo quiero agradecerle por su paciencia para enseñarme en las áreas en las cuales no tenía conocimiento.

A mi asesora la Dra. Carla V. Sánchez por estar siempre disponible para ayudarme, por haberme tenido paciencia para enseñarme las bases de biología molecular, la inducción de las defensas de las plantas y las técnicas de purificación y desnaturalización del RNA. A mi asesora la Dra. Elisa Cabrera por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo, comprensión, paciencia y dedicación. A mi asesora la Dra. Josefina Casas y mis maestros la Dra. Patricia Zarazúa, Dra. Martha Escoto y al Dr. Lino de la Cruz, por acompañarme durante esta etapa y por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A las doctoras Nancy Martínez y Liliana Martínez por haberme recibido en su laboratorio y tratarme como uno más de sus alumnos por haberme enseñado a planear, organizar y rotular todo el material de un trabajo de una investigación así mismo por haberme apoyado y ayudado a redactar mi primer resumen para participar en un congreso. Además de brindarme su amistad y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Secretaría de Educación Pública (SEP) por otorgar el apoyo para el proyecto “Evaluación de la expresión de reguladores y determinantes de patogenicidad de *Salmonella enterica* internalizada en tomates (*Solanum lycopersicum*) higienizados con hipoclorito de sodio”. Además agradezco al CONACyT por otorgarme la beca de manutención durante mis estudios de maestría.

A mis amigos J. Antonio Vilchis, Brian Márquez y Mario Ballen por acompañarme, ayudarme, aconsejarme, apoyarme incondicionalmente y brindarme su amistad durante todo este arduo proceso.

## Índice

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Lista de figuras .....	VII
Lista de cuadros .....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Resumen .....	X
Abstract.....	XI
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Características generales de <i>Salmonella</i> .....	3
2.1.1 Nomenclatura y clasificación de <i>Salmonella</i> .....	5
2.1.2 Patogenicidad de <i>Salmonella</i> .....	6
2.1.3 Mecanismo de supervivencia y adaptación de <i>Salmonella</i> .....	8
2.2 <i>Salmonella</i> y enfermedades transmitidas por el consumo de tomates.....	11
2.3 Interacción entre <i>Salmonella</i> la planta y el fruto de tomate.....	14
2.3.1 Internalización de <i>Salmonella</i> en el tomate .....	18
3. Planteamiento del problema y justificación.....	19
4. Hipótesis .....	20
5. Objetivos .....	21
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. Materiales y Métodos .....	22
6.1 Cepas de trabajo.....	22
6.2 Determinación de parámetros de pH y grados Brix en los tomates cherry utilizados durante la investigación.....	22
6.3 Preparación del inóculo .....	23
6.4 Inoculación de los tomates cherry con <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo.....	23

6.5 Recuperación de células internalizadas en los tomates cherry .....	23
6.6 Recuperación de células internalizadas en los tomates cherry higienizados con hipoclorito de sodio .....	24
6.7 Obtención de células internalizadas en el tomate cherry para la purificación de RNA de <i>Salmonella</i> .....	25
6.8 Purificación del RNA de las células internalizadas de <i>Salmonella</i> .....	25
6.9 Tratamiento del RNA de <i>Salmonella</i> con DNAsa.....	26
6.10 Síntesis de cDNA y PCR tiempo real.....	26
6.11 Análisis estadístico .....	27
7. Resultados y discusión.....	28
7.1 Estandarización de la inoculación y recuperación de <i>Salmonella</i> Internalizada en el tomate cherry .....	28
7.2 Internalización de <i>Salmonella</i> Newport en el tomate cherry.....	30
7.3 Recuperación de <i>Salmonella</i> Newport internalizadas en tomate cherry sometidas a un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.....	32
7.4 Internalización de <i>Salmonella</i> Saintpaul en el tomate cherry.....	33
7.5 Internalización de <i>Salmonella</i> Montevideo en el tomate cherry .....	35
7.6 Comparación de la supervivencia de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en tomates cherry.....	37
7.7 Determinación de parámetros de pH y grados Brix en los tomates utilizados durante la investigación.....	40
7.8 Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>rpoS</i> de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo.....	41
8. Conclusiones.....	45
9. Literatura citada.....	46
Anexos .....	58
Anexo A. Evaluación de la descontaminación de la superficie de los tomates cherry en etanol al 70 ó 96% .....	59
Anexo B. Reactivos para la preparación de Luria de Bertani (LB) .....	61
Anexo C. Preparación de rifampicina.....	62
Anexo D. Preparación del inoculo con hipoclorito de sodio.....	63
Anexo E. Protección del RNA del paquete celular con RNAProtect (QIAGEN) .....	64
Anexo F. Protocolo para la purificación del RNA con el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN).....	65
Anexo G. Protocolo para el tratamiento de RNA.....	66
Anexo H. Protocolo para PCR tiempo final .....	67
Anexo I. Protocolo para retrotranscripción con el kit GoScript Reverse Transcription System (Promega) .....	68
Anexo J. Protocolo para PCR tiempo real.....	69

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura antigénica de <i>Salmonella</i> spp.....	5
Figura 2. Esquema del sistema de secreción tipo III de <i>S. enterica</i> .....	7
Figura 3. Estandarización del proceso de recuperación de <i>Salmonella</i> Newport internalizada en el tomate cherry .....	29
Figura 4. Supervivencia de <i>Salmonella</i> Newport internalizadas en el tomate cherry .....	32
Figura 5. Supervivencia de <i>Salmonella</i> Saintpaul internalizadas en el tomate cherry .....	35
Figura 6. Supervivencia de <i>Salmonella</i> Montevideo internalizadas en el tomate cherry.....	37
Figura 7. Supervivencia de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en el tomate cherry .....	39
Figura 8. Promedios de pH y °Brix $\pm$ error estándar de los tomates cherry utilizados durante los experimentos .....	41
Figura 9. Expresión relativa en LB de <i>rpoS</i> de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo. ....	42
Figura 10. Expresión relativa en LB de <i>rpoS</i> de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo internalizada en tomate cherry. ....	43
Figura 11. Expresión relativa de <i>rpoS</i> de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul o Montevideo cultivadas en medio LB a 18 °C o internalizadas en tomate. ....	44



## Lista de cuadros

Cuadro 1. Brotes de <i>Salmonella enterica</i> asociados al consumo de tomates .....	13
Cuadro 2. Cepas utilizadas durante la investigación. ....	22
Cuadro 3. Secuencia de primers y sondas TaqMAN® (Ensayos Custom TaqMAN® Gene Expression) . ....	27
Cuadro 4. Recuperación de <i>S. Newport</i> internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.....	31
Cuadro 5. Recuperación de <i>S. Saintpaul</i> internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.....	34
Cuadro 6. Recuperación de <i>S. Montevideo</i> internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.....	36
Cuadro 7. Recuperación de células de <i>Salmonella</i> Newport, Saintpaul y Montevideo internalizada en tomate cherry. ....	39

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ADE	Agua destilada estéril
ANOVA	Análisis de varianza
ASTEL-Rif	Agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura y 0.1g/L de rifampicina
$a_w$	Actividad de agua
AS	Ácido salicílico
AJ	Ácido jasmónico
BPW	Agua peptonada amortiguada
cDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
D	Días
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
EVNC	Estado viable no cultivable
ET	Etileno
G	Gramos
H	Horas
H <sub>2</sub> S	Ácido sulfhídrico
KHz	Kilohercio
Hz	Hercio
LB	Caldo Luria de Bertani
L	Litro
μL	Microlitro
Min	Minutos
ml	Mililitro
MAPK	Cascadas de proteína cinasas activada por mitógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PRRs	patrones de reconocimiento de receptores
PTI	Inmunidad activada por PAMP
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
Rpm	Revoluciones por minuto
RH	Respuesta hipersensible
S	Segundo
SSF	Solución salina fisiológica
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo 3
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonia

## Resumen

### **Dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) higienizados con hipoclorito de sodio.**

L. C. A. Adriana Guadalupe Orozco García

Director: Dra. Jeannette Barba León

Existen diversas investigaciones que demuestran que *Salmonella enterica* puede contaminar e internalizarse en el tomate durante el cultivo de la planta, fruto o lavado; siendo los serotipos de Newport y Montevideo los más adaptados para permanecer en el interior del fruto, y Saintpaul en la superficie del tomate. Poco se sabe al respecto de las dinámicas de interacción de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo cuando se encuentra internalizada en el tomate y por las características intrínsecas del fruto, el gen de estrés *rpoS* pudiera estar implicado en la internalización bacteriana. Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que la internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo ocurre en los tomates cherry cuando hay un gradiente de temperatura de 12 °C, donde la cantidad de células internalizadas es dependiente del serotipo y el tiempo de incubación ( $p < 0.05$ ). En contraste, en los experimentos realizados con tomates higienizados con hipoclorito de sodio no se observó recuperación en placa de las bacterias internalizadas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que *Salmonella* exista en el fruto en un estado de viable no cultivable, debido a que hay reportes que demuestran que el hipoclorito de sodio causa estrés en las células bacterianas. Nuestros resultados de qRT-PCR múltiple muestran la disminución de la transcripción de *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en el interior del tomate, en comparación a la registrada bajo una condición de inducción del gen *in vitro* ( $p < 0.05$ ). La disminución de la transcripción de *rpoS* en el tomate sugiere que el fruto no representa una condición de estrés para la bacteria.

## Abstract

### **Internalization dynamics of *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo on cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*) sanitized with sodium hypochlorite.**

L. C. A. Adriana Guadalupe Orozco García

Director: Dra. Jeannette Barba León

There are several investigations about that how *Salmonella enterica* contaminates and internalize into tomato plant during the cultivation. Also it knows that *Salmonella* contaminates the fruit during the washing in the commercialization plants. It has been reported that *Salmonella* Newport and Montevideo are the most adapted serotypes to remaining inside the fruit, and Saintpaul serotype it is the most adapted to remaining on the tomato surface. Little is known about the dynamic internalization of *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo when they are into cherry tomato. Also due to the intrinsic characteristics of the fruit, the stress gene *rpoS* could be involved in bacterial internalization. The results obtained in this study shows that the internalization of *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo in cherry tomatoes are dependent of the serotype and incubation time ( $p < 0.05$ ) when there are a gradient temperature of 12 °C. In contrast, there was not recovery of viable *Salmonella*'s cells in plate when the experiments were done with tomatoes sanitized with sodium hypochlorite. However, exits the possibility that *Salmonella* could be in at state of non-cultivable viability into the sanitized fruits, since there are reports that sodium hypochlorite causes stress on bacterial cells. Our results of multiple qRT-PCR shown a decreased transcription of *rpoS* in the cells of *Salmonella* Newport, Saintpaul and Montevideo recovered from the tomato interior in comparison to the one recorded under an *in vitro* gene induction condition ( $p < 0.05$ ). The decreased *rpoS* transcription observed from the cells recovered into the tomato suggests that the fruit does not represent a stress condition for the bacteria.

## 1. Introducción

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica producida por bacterias del género *Salmonella*, la cual está distribuida en el medio ambiente siendo su reservorio natural el tracto gastrointestinal. *Salmonella enterica* es uno de los principales contaminantes bacterianos del tomate y según la normatividad vigente a nivel nacional e internacional debe estar ausente en el fruto ya que su presencia puede desencadenar un cuadro infeccioso, que si no es tratado de manera adecuada puede llegar a ser grave. *Salmonella* es capaz de internalizarse en el tomate a través de la infiltración de agua durante el lavado del fruto debido a que las bacterias suspendidas en el agua pueden infiltrarse cuando la presión del agua sobre la superficie del tomate supera tanto la presión de gas interna como la hidrofobicidad de la superficie del fruto. Otro mecanismo para la infiltración implica el estado de dilatación de las células vegetales en la superficie del tomate, ya que cuando éstas se exponen al agua fría de lavado se contraen rápidamente y permiten la entrada de *Salmonella* a través de aberturas tales como la cicatriz del pedúnculo y fisuras causadas por insectos o daños mecánicos; sobre todo, se sabe que este mecanismo es favorecido cuando el gradiente de temperatura entre el agua del lavado y el fruto es igual o mayor de 12 °C. Recientemente se ha reportado que *Salmonella enterica* es capaz de internalizarse y sobrevivir dentro de la planta del tomate alcanzando partes tales como tallos, hojas, flor y fruto; lo cual podría proteger a la bacteria de los compuestos desinfectantes. Los serotipos más exitosos para adherirse al tomate son *S. Saintpaul* y *S. Montevideo*; no obstante, *S. Javiana* y *S. Newport* son exitosos para adherirse e internalizarse y *S. Typhimurium* es el serotipo menos eficiente. La evidencia anterior apoya la hipótesis de que la expresión genética es diferente entre serotipos y quizás estas diferencias son las que permiten que algunos serotipos de *Salmonella* puedan adaptarse a colonizar diferentes hospedantes tales como frutos, hortalizas o animales.

Diferentes estudios han demostrado que la expresión génica de *Salmonella* está influida por diversas condiciones ambientales tales como la osmolaridad, la concentración de oxígeno, la concentración de calcio, el cambio de pH de ácido a ligeramente alcalino, entre otros. En particular se ha observado que las células en fase de crecimiento estacionaria son más resistentes a muchos factores ambientales que en la fase exponencial. Al respecto, el factor sigma S es inducido al inicio

de la fase estacionaria del desarrollo bacteriano y ha sido reconocido como un factor clave en la producción de células resistentes en la fase estacionaria.

En este sentido se conoce que el factor sigma S (también conocido como RpoS, KatF o sigma 38) desempeña un papel clave en la supervivencia de las bacterias bajo condiciones de hambre o estrés. Por ello, la cuantificación de la transcripción de *rpoS*, el gen que da origen al factor sigma S, puede sugerir el grado de estrés al que está sometida *Salmonella* en el interior del tomate. Con base a lo expuesto anteriormente, en este estudio se determinaron las dinámicas de supervivencia de *Salmonella* Newport, *S. Saintpaul* o *S. Montevideo* internalizadas en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) en ausencia y en presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio, para después cuantificar la transcripción del gen de respuesta a estrés *rpoS*, como una forma indirecta de evaluar si el interior del tomate representa un estado de estrés para *Salmonella*.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Características generales de *Salmonella*

El género *Salmonella* se sitúa dentro de la familia Enterobacteriaceae, se compone de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas con forma de bacilo de un tamaño aproximado de 0.7 - 1.5 x 2 - 5 µm. La mayoría de las cepas son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (12, 106). También posee estructuras filamentosas llamadas fimbrias, las cuales se extienden fuera de la superficie celular, con tamaño promedio de 0.5-10 µm de longitud por 2-8 nm de ancho, permitiendo al microorganismo adherirse a superficies y tejidos animales para formar biopelículas en las superficies (100).

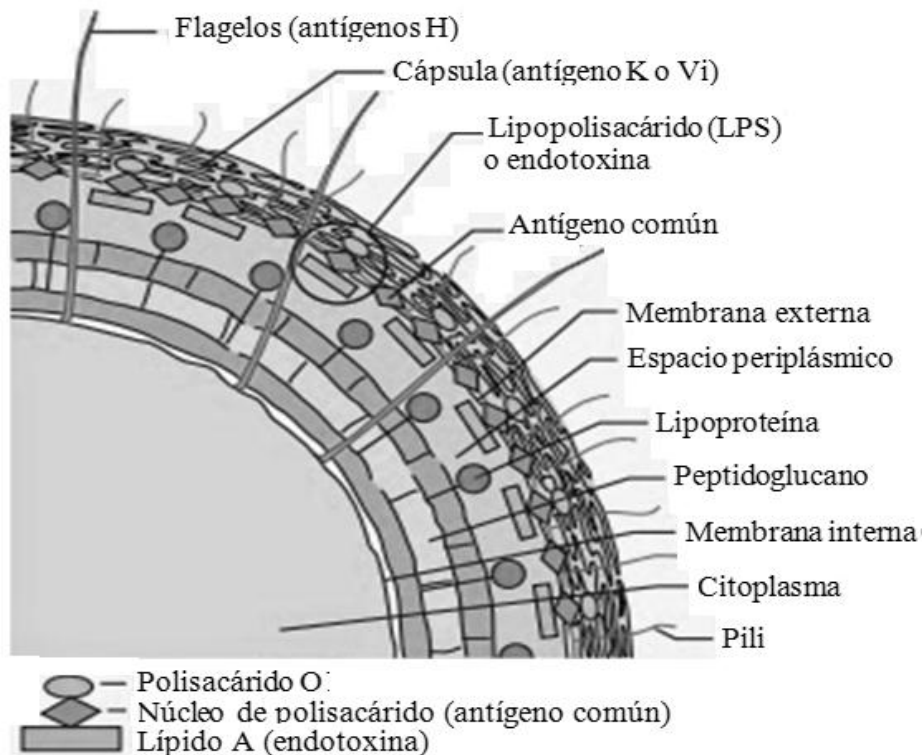
El primer reporte que se tiene de *Salmonella* es en el año 1874 por el médico inglés y epidemiólogo William Budd, quien describió la fiebre tifoidea (60). Sin embargo, la primera vez que se observó al bacilo tifoide fue por el patólogo y bacteriólogo Karl Joseph Eberth en el año 1880 en víctimas fallecidas por fiebre tifoidea por lo que la bacteria fue llamada *Eberthella typhosa*. En el año 1885 el bacteriólogo Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith aislaron y cultivaron a *S. Choleraesuis* de cerdos con peste porcina clásica (13). El bacteriólogo Lignières en el año 1900 nombra al género como "*Salmonella*" en honor al codescubridor Daniel Elmer Salmon (75). Cabe destacar que el primer brote por salmonelosis asociado al consumo de alimentos fue reportado en el año 1888 por Gäertner y fue causado por "*Bacterium enteritidis*" (ahora conocido como *S. Enteritidis*) (13).

La temperatura óptima para la proliferación de *Salmonella* es de 37 °C, aunque puede desarrollarse en el margen de 54 °C a 2 °C. Los valores de pH cercanos a la neutralidad favorecen su multiplicación, sin embargo, no es fácil definir el pH mínimo para su desarrollo ya que depende de una variedad de factores tales como la naturaleza del ácido, el serotipo, la temperatura de incubación y la actividad de agua ( $a_w$ ), esta última con un valor óptimo de alrededor 0.99  $a_w$  (75).

Las características bioquímicas de *Salmonella* son: catalasa positiva, oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos, fermentan glucosa (a excepción de *S. arizonae* que es capaz de fermentar la lactosa), manitol y sorbitol para la producción de ácido o ácido/gas. *Salmonella* es capaz de fermentar la sacarosa, pero en general no forman indol, tampoco hidrolizan urea o desaminan fenilalanina, pero normalmente forman H<sub>2</sub>S en agar de triple azúcar hierro. Pueden usar también el citrato como única fuente de carbono y pueden descarboxilar a lisina y ornitina, a excepción de *S. Paratyphi A* y *S. Typhi* (70).

Los serotipos o serovares se clasifican de acuerdo a la asociación particular de factores antigénicos somáticos O (lipopolisacárido), flagelares H (antígenos proteicos de los flagelos) y de virulencia Vi (polisacárido capsular) (Fig. 1) (64). Los antígenos O sirven para caracterizar los diferentes tipos antigénicos de *Salmonella enterica* subsp. I, los antígenos O más comunes son A, B, C1, C2, D y E. Las cepas de estos serogrupos causan aproximadamente el 99 % de las infecciones de *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente (75). Los antígenos H se encuentran constituidos por una proteína llamada flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar dos especificidades de su antígeno H (difásicos) o expresar solamente una sola (monofásicas). El antígeno Vi sólo está presente en *Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*. La expresión del antígeno Vi depende de al menos los genes *viA* y *viB*, donde ambos genes deben existir en la bacteria para que el antígeno se exprese (106).





**Fig. 1 Estructura antigénica de *Salmonella* spp (99).**

### 2.1.1 Nomenclatura y clasificación de *Salmonella*

La nomenclatura es el sistema de nombres o denominaciones utilizados en la ciencia para designar un objeto de estudio. La nomenclatura y clasificación de *Salmonella* han variado de forma reiterada desde el concepto serotipo-especie propuesto por Kauffmann en 1966. De acuerdo con la clasificación de Kauffman-White existen alrededor de 2, 659 serovares de *Salmonella* de los cuales solo 200 se han asociado con enfermedad humana (38). La propuesta de Kauffman-White la cual se fundamenta en las cualidades fenotípicas (serotipo y biotipo), aportaba información limitada en cuanto a la relación genética de los serovares, el grado de adaptación y patogenicidad a sus hospedantes (78). Por lo anterior, actualmente la nomenclatura se basa en estudios moleculares y considera que el género *Salmonella* se compone de dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*, esta última se divide en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (24).

Minor y Popoff en 1978 propusieron 7 sub-géneros que fueran señalados con números romanos (I, II, IIIa, IIIb, IV, V, y VI), donde la subespecie III se dividía en IIIa y IIIb por su relación genómica y reacciones bioquímicas. La subespecie IIIa (*S. enterica* subsp. *Arizonae*) incluye los serotipos monofásicos de Arizona y la subespecie IIIb (*S. enterica* subsp. *Diarizonae*) contiene los serotipos difásicos (18).

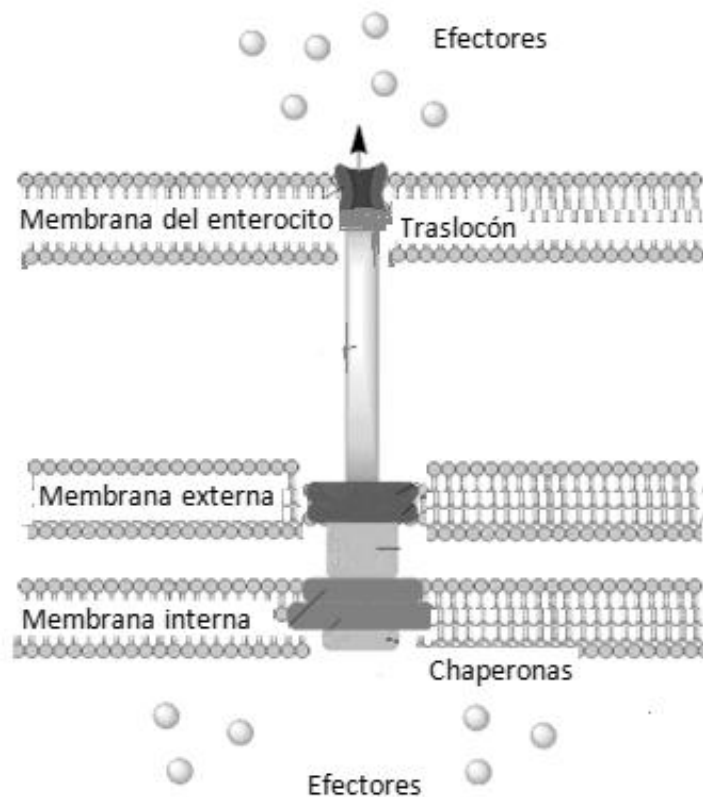
### **2.1.2 Patogenicidad de *Salmonella***

*Salmonella enterica*, puede causar enfermedad cuando se ingieren menos de 100 células (49). Sin embargo, varían mucho en su rango de hospederos y la enfermedad va desde enteritis hasta la fiebre tifoidea (100). El periodo de incubación de la enteritis se presenta entre las 6 a 72 horas de consumido el alimento (con un promedio de entre 12-36 h). La enfermedad se manifiesta por una enterocolitis repentina, generalmente autolimitante, que puede presentar la siguiente sintomatología: cefalea, dolor abdominal, diarrea, náuseas, a veces vómito y casi siempre fiebre (58). No obstante, la sintomatología de las infecciones gastrointestinales puede variar desde la infección asintomática hasta una diarrea grave, donde la salmonelosis es la enfermedad más común (4). La enfermedad sistemática es desarrollada por los serovares adaptados al hospedador y está relacionada con su resistencia a la destrucción fagocítica en el hospedante, donde el periodo de incubación varía de 3 a 56 días (75). El microorganismo puede, a veces, instalarse en cualquier tejido del cuerpo y originar abscesos, meningitis, pericarditis, neumonía, pioderma o pielonefritis. La gravedad de la enfermedad está relacionada por el serotipo, el número de células ingeridas y los factores relacionados con el hospedante (58, 70).

La supervivencia del microorganismo en un nicho determinado depende de su habilidad para adherirse, entre otros factores. Las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer moléculas con una estereoquímica específica, presentes en las células del hospedero, que pueden determinar los hospederos y el organotropismo de la bacteria (19). Una característica esencial de la patogenicidad de *Salmonella* es su habilidad para engañar a la célula hospedante en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedante (81).

Por otra parte, la capacidad de *Salmonella* para evadir y combatir las defensas del hospedante está dada por el aumento de la virulencia y la susceptibilidad de la célula hospedante (69). Son bien conocidos los factores bacterianos que influyen en la infección, los cuales están codificados en una amplia gama de elementos genéticos, incluyendo plásmidos, profagos e Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (por sus siglas en inglés, SPI) (53).

La isla de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* codifican una maquinaria compleja de translocación de proteínas, denominada sistema de secreción tipo III (por sus siglas en inglés, T3SS) (53, 92). El T3SS es una estructura tipo aguja que atraviesa las membranas interna y externa de la envoltura bacteriana y media la translocación de proteínas efectoras en las células huésped (Fig. 2). Estos efectores tienen la capacidad de modular diversas funciones de la célula hospedante, los cuales interactúan con proteínas del hospedante y causan fenotipos asociados con la patogénesis (20).



**Fig 2. Esquema del sistema de secreción tipo III de *S. enterica* tomando de De santos (2012) (16).**

### 2.1.3 Mecanismos de supervivencia y adaptación de *Salmonella*

Los alimentos son ambientes complejos en los cuales los microorganismos pueden enfrentar condiciones de estrés naturales tales como disponibilidad limitada de nutrientes, pH adverso, osmolaridad, oxidación y temperaturas extremas (1). Debido a que *Salmonella* es un microorganismo transmitido por los alimentos y el agua, la bacteria utiliza varios sistemas para sobrevivir, tales como su respuesta de tolerancia ácida adaptativa, la cual se caracteriza por la capacidad de tolerar acidez (49). Adicionalmente, las señales ambientales cambian la expresión génica por medio de una variedad de mecanismos de regulación que modulan la transcripción de las bacterias y que incluyen sistemas reguladores de dos componentes, factores sigma alternativos y represores transcripcionales (10). Los cuales podrían asegurar la supervivencia de la bacteria en una variedad de alimentos.

La regulación coordinada permite la expresión simultánea de múltiples genes que dan respuesta a un estímulo ambiental determinado. Se sabe que la transcripción y la expresión génica son dependientes de la RNA polimerasa, que al interactuar con el factor sigma forman una holoenzima que inicia el proceso de la transcripción (87). Se ha reportado que en *Escherichia coli* el factor sigma alternativo  $\sigma^{S/38}$  (RpoS) controla la respuestas a estrés, choque osmótico o hambruna, activando la transcripción de genes que responden a esas condiciones ambientales. Por ejemplo cuando *E. coli* es sometida a estrés osmótico RpoS activa la transcripción del gen *treA*, en condiciones de estrés por calor RpoS activa la transcripción del gen *otsAB* y en estrés oxidativo RpoS activa la transcripción de *katEG* y *xthA* (14, 15).

El nivel celular de RpoS está regulado por mecanismos que implican transcripción, traducción y estabilidad post-traducciona. Las diferentes condiciones de estrés afectan de manera diferente a estos niveles de control creando un complejo perfil de regulación (33). La transcripción del gen *rpoS* depende de dos promotores, uno de ellos ubicado río arriba del gen *nlpD*, generando un ARN mensajero policistrónico *nlpD-rpoS* que es independiente de los estímulos ambientales y pueden proporcionar un nivel bajo, pero constante, de transcripción de *rpoS* en todo el crecimiento.

La alarmona 3'-difosfato,5'-difosfato Guanosina (ppGpp), el polifosfato, *nlpD* y el acetato regulan positivamente la transcripción de *rpoS*, mientras que Fis es un regulador negativo que puede unirse a la región promotora *rpoS* para bloquear la transcripción. La traducción de *rpoS* también es importante para la inducción de RpoS en fase estacionaria, estimulándose por choque frío, poliaminas, alta osmolaridad, CspC y CspE, DsrA, RprA, OxyS, Hfq, HU, H-NS y UDP-glucosa. La unión de Hfq al RNAm de *rpoS* también puede permitir la unión de otros reguladores para iniciar la traducción. La depleción de UDP-glucosa estimula la expresión de RpoS en fase exponencial de una manera dependiente de Hfq. Las proteínas por choque frío CspC y CspE también pueden estimular la expresión de RpoS mediante la estabilización del RNAm. De forma similar, HU, una proteína nucleoide, estimula la traducción de *rpoS*, posiblemente, alterando la estructura secundaria del RNAm de *rpoS*. Sin embargo, durante la regulación post-traduccional la proteólisis regulada de RpoS es un mecanismo importante para mantener bajos niveles de este factor sigma en condiciones de crecimiento óptimo y para aumentar rápidamente sus niveles durante la adaptación a la inanición (14, 15, 32).

En *Salmonella* se ha descrito que RpoS regula los genes de virulencia *spv* y *yst*. Además se ha demostrado la importancia de RpoS en la formación de biopelículas y en la virulencia de *S. Typhimurium* (50), donde la infección en el modelo murino fue nula cuando se empleó la mutante en *rpoS* (33). También en *S. Enteritidis* se ha reportado que la inducción de *rpoS* se ve favorecida cuando la bacteria es incubada en caldo LB a 10 y 25 °C, y se reprime cuando es incubada a 37 y 42 °C (104). Otro factor que induce la expresión de *rpoS* es la alta osmolaridad, particularmente cuando *S. Typhimurium* es inoculada en caldo LB con 6 % de NaCl (56). Si bien RpoS tiene un efecto positivo sobre un gran número de genes que contribuyen a la resistencia a estrés, también tiene un efecto negativo en la expresión de varios genes que están bajo el control de otros factores sigma y que confieren a *Salmonella* una ventaja en el crecimiento (50).

Interesantemente el gen *rpoS* es altamente polimórfico, incluso dentro de las cepas de una especie y por lo tanto los efectos observados entre las cepas suelen ser diferentes. Al respecto diversas investigaciones han reportado que a pesar de que la secuencia de aminoácidos de RpoS de *S. Dublin* y *S. Typhimurium* es idéntica, la mutante de *rpoS* de *S. Dublin* induce una protección contra la

infección de *S. Dublin* pero dicha protección no se logra con la preparación heteróloga de *S. Typhimurium* (17). También la inducción del estado viable no cultivable (EVNC), un estado fisiológico observado en algunas bacterias Gram negativas, fue rápidamente inducido en *S. Typhimurium* en comparación con la observada en *S. Dublin*. Al respecto los autores proponen que este fenómeno puede ser atribuido a la correlación existente entre la regulación de *rpoS*, el serotipo y la fuente de aislamiento (47). Otro ejemplo de la variación fenotípica del gen observada por Kusumoto y col. (2012) fue cuando *S. Dublin*, *S. Oranienburg* y *S. Typhimurium* fueron sometidas a estrés osmótico, observándose que en el primer día del experimento la expresión de *rpoS* en *S. Typhimurium* disminuye 50 %, en *S. Oranienburg* 40 % y en *S. Dublin* se reducía gradualmente. Los autores suponen que la reducción variable de RpoS en los tres serotipos, permitió un patrón de respuesta diferencial en la entrada de los serotipos estudiados al EVNC. Demostrado que RpoS influye en el tiempo de entrada en el EVNC en *Salmonella* spp (47).

El estado viable no cultivable (EVNC) se ha propuesto como una estrategia de supervivencia provocada por frío, alta osmolaridad, desecación y privación nutricional (83). No obstante, la entrada de la bacteria a condiciones desfavorables puede dar como resultado una latencia o un EVNC, en el cual la bacteria puede subsistir por períodos prolongados de tiempo (90). Las bacterias en EVNC se encuentran vivas ya que muestran varias funciones vitales tales como el alargamiento celular, la actividad de la cadena respiratoria o la incorporación de sustratos radiomarcados (10, 102). Se ha reportado que cuando *S. Typhimurium* es sometida a niveles sub letales de cloro, se provoca una tensión en la célula bacteriana que induce el EVNC (83). En el EVNC la expresión génica de *Salmonella* se ve modificada y puede potencializar su virulencia, se ha reportado que bajo determinadas condiciones las bacterias pueden “resucitar” y abandonar este estado (76, 93). Li y col. (2014) reportaron que la ausencia de *rpoS* favorece la entrada de las células al EVNC, lo cual sugiere que RpoS puede mejorar la capacidad de las células para adaptarse al medio ambiente y por lo tanto dificulta la formación del EVNC (47, 52). Aunque el mecanismo molecular subyacente en la formación del EVNC de las bacterias aún se desconoce, los factores de regulación genéticos RpoS y OxyR parecen ser importantes para inducir dicho estado (17, 93).

## **2.2 *Salmonella* y enfermedades transmitidas por el consumo de tomates.**

En los últimos años ha ido en aumento el consumo de hortalizas, el cuál se ha relacionado con el incremento de los brotes de enfermedades por el consumo de alimentos (ETA) (30, 109). Se atribuye que las ETAs causaron en el periodo de 1998-2008 en Estados Unidos alrededor del 38 % al 46 % de las hospitalizaciones y el 23 % de muertes (23). En los Estados Unidos el costo aproximado de las enfermedades transmitidas por los alimentos supera los 15,600 millones de dólares, mientras que la salmonelosis cuesta 3,600 millones de dólares anuales (42).

La razón principal por la que los productos hortofrutícolas son uno de los principales vehículos de brotes transmitidos por alimentos, es debido a que la mayoría de ellos se consumen crudos y no existe un proceso que pueda asegurar la eliminación de las bacterias en los productos frescos (30, 34). De manera general, *Salmonella enterica* es reconocida en el mundo como una de las principales bacterias patógenas humanas asociadas a la contaminación de productos hortofrutícolas y frutos como el tomate (22).

El tomate es una baya ovalada, redonda o periforme cuya forma depende de su variedad (cherry, saladette, tipo pera y bola). La variedad cherry es pequeña, de epicarpio delgado, sabor dulce, de color rojo o amarillo. Este fruto es consumido principalmente en fresco como parte de ensaladas o salsas y forma parte de la materia prima en la industria de alimentos procesados (jugos, purés, salsas, etc.) (79). El tomate ha sido involucrado en varios brotes por su consumo (Cuadro 1) y las investigaciones sobre los brotes mencionan que la contaminación del tomate puede provocarse con el agua de riego, agua de lavado de las instalaciones de empaque o en la preparación de alimentos (101). Para reducir los riesgos de contaminación del fruto es importante seguir los lineamientos de buenas prácticas. Si el tomate después de su cosecha es lavado por inmersión en tinas, debe cuidarse que el agua de la tina se mantenga limpia de sedimentos y materia orgánica. Así mismo, debe revisarse cada hora la temperatura, la concentración del desinfectante y el pH de la solución. Por eficiencia y bajo costo, el cloro es el desinfectante más usado en el lavado del tomate cosechado.

De acuerdo a lo recomendado por el manual de buenas prácticas agrícolas del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), la concentración de cloro en el agua de lavado utilizada debe estar entre 100 y 300 ppm de cloro total, lo que equivale a 50-75 ppm de cloro libre (86). A nivel internacional el *Codex Alimentarius* recomienda que los tomates sean lavados con una solución desinfectante a niveles suficientes para asegurar que el agua en los tanques de prelavado y lavado no se convierta en una fuente de contaminación del fruto y que el agua utilizada para el enjuague final sea potable (11).

El consumo de este fruto se ha relacionado desde el año 1990 al 2010 con 15 brotes de salmonelosis, los cuales ocasionaron 1,959 enfermedades y 384 hospitalizaciones (42). La mayoría de los brotes se notificaron durante el año 2000-2010 (80 %); donde el 73 % ocurrió entre mayo y septiembre. Algunos de los brotes fueron causados por *Salmonella* Newport (n de brotes = 6), Braenderup (n = 2), Baildon, Enteritidis, Javiana, Montevideo, Thompson, Typhimurium (n = 1 cada uno) y serotipos múltiples (n = 1). La mayoría de los brotes se asociaron con tomates servidos predominantemente en restaurantes (93 %). Los tomates implicados fueron de la variedad bola (69 % de los brotes), Roma (23 %) y uva (8 %) (5) (Cuadro 1). Adicionalmente *Salmonella* ha sido aislada del 9.9 % de jitomates cultivados en invernaderos hidropónicos, lo que indica que el nivel de protección de estos invernaderos no excluye la presencia de bacterias patógenas entéricas (51).



**Cuadro 1. Brotes de *Salmonella enterica* asociados al consumo de tomates**

<b>Serotipo</b>	<b>Año</b>	<b>N° de casos</b>	<b>Variedad de tomate</b>	<b>Lugar de Preparación</b>	<b>Lugar de contaminación</b>
Javiana	1990	176	Bola	Restaurante, hogar, guardería	Empaque
Montevideo	1993	100	Bola	Restaurante y hogar	Empaque
Baildon	1998-99	86	Bola	Restaurante y hogar de enfermera	Cultivo o empaque
Thompson	2000	43	*	Restaurante y hogar de enfermera	Cultivo o empaque
Newport	2002	333	Bola	Restaurante, hospital, Universidad, guardería	Cultivo
Newport	2002	8	Uva	Restaurante y hogar	Cultivo o empaque
Javiana	2002	90	*	*	*
Javiana	2004	471	*	*	*
Braenderup	2004	123	Roma	Restaurante	Cultivo o empaque
Multiple +	2004	429	Roma	Restaurante	Cultivo, empaque o instalaciones de procesamiento de corte en fresco
Newport	2005	71	Bola	Restaurante	Cultivo
Enteritidis	2005	77	*	Restaurante	Cultivo o empaque
Braenderup	2005	82	Roma	Restaurante	Cultivo
Typhimurium	2006	190	Bola	Restaurante	Cultivo
Newport	2006	115	Bola	Restaurante	Cultivo o empaque
Newport	2007	65	Bola	Restaurante	Cultivo o empaque
Newport	2010	51	Bola	Restaurante	Cultivo
Newport	2010	99	*	*	*

\*Desconocida; + Javiana (89 % de los casos), Typhimurium (6 %), Anatum (1 %), Thompson (<1 %), Muenchen (<1 %), y spp. (1 %) (5, 67).

### 2.3 Interacción entre *Salmonella*, la planta y el fruto del tomate

Los nutrientes son elementos indispensables para el crecimiento de todos los organismos vivos, incluyendo plantas y patógenos. La fitosfera, rizósfera, apoplasto, el floema, el xilema y los organelos celulares son nichos nutritivos en las plantas que son el blanco de patógenos bacterianos (95). Recientemente se ha reportado que las plantas pueden albergar patógenos humanos y se ha demostrado que *Salmonella enterica* coloniza varias especies de plantas, como *Arabidopsis*, *Medicago sativa* (alfalfa), *Solanum lycopersicum* (tomate) y varias hortalizas de hoja verde (21). Al respecto, se ha postulado que varias estructuras foliares pueden funcionar como posibles sitios de internalización o adhesión de *Salmonella*, donde los estomas (abertura natural en la superficie de la hoja) son los sitios preferentes para la entrada de la bacteria a las plantas, donde el proceso de entrada posiblemente es mediado por los flagelos bacterianos (100). En lechuga el contacto con *S. Typhimurium* propicia el cierre parcial de los estomas, lo cual protege al patógeno de agentes desinfectantes (57).

Adicionalmente, las características de la superficie de plantas y frutas incrementan la posibilidad de contaminación bacteriana debido a que poseen una textura microrugosa que suelen presentar una carga estática, características que facilitan la adhesión y establecimiento de la bacteria (94). En consecuencia, los flagelos actúan como organelos de motilidad que ayudan a la bacteria a establecerse en hábitats favorables y pueden ser factores de adhesión que promuevan la unión a la superficie de la planta o el fruto (105). También la formación de biopelículas podría influir en la adhesión de *Salmonella* en los tejidos vegetales donde la matriz de exopolímeros, fimbrias agregantes finas (Tafi o curli), celulosa y lipopolisacárido (91) podrían estar involucrados en la persistencia de *Salmonella* en la planta o los frutos.

El sistema de secreción tipo III (SST3) es otro mecanismo que se ha comprobado utiliza *Salmonella Typhimurium* para la colonizar e internalizarse en plantas, debido a que las mutantes de *S. Typhimurium* en los genes del SST3 *prgH* e *invA* (codificados por la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*) y *ssaV* y *ssaJ* (codificadas por la isla de patogenicidad 2) tuvieron tasas de proliferación más bajas y provocaron síntomas relacionados con la respuesta hipersensible (RH) en

plantas de *Arabidopsis* (31). Por otra parte, la comparación de transcriptomas de repuesta a infección con *Salmonella* Typhimurium y la mutante en *prgH* reveló que los genes de *Arabidopsis* altamente conservados involucrados en la defensa, se encuentran sobrerregulados por la infección con la mutante *prgH* (31).

Otro estudio analizó la respuesta oxidativa en plantas de *Nicotiana tabacum* después de la exposición con *S. Typhimurium*, observándose que *Salmonella* no fue capaz de desencadenar una respuesta oxidativa, mientras que las bacterias tratadas con calor o cloranfenicol fueron elicitores de esta respuesta, estos resultados indicaron que el patógeno suprime activamente esta respuesta inmune. Además, la delección de *invA* redujo la capacidad de *Salmonella* para suprimir la respuesta oxidativa (89). Lo anterior evidencia que los mecanismos utilizados por *Salmonella* para su colonización en animales y plantas podrían ser similares (31, 63).

Por otra parte se han identificado algunos de los genes y mecanismos que las bacterias entéricas usan para colonizar las superficies externas de las plantas huésped, donde los polímeros bacterianos (celulosa, poli-b-1,6-N-acetil-D-glucosamina, ácido colánico, cápsula de antígeno O) y fimbrias están implicados en la adhesión de *Salmonella* en las superficies de hortalizas (63). Se propone que una vez que las bacterias se adhieren a la planta, inicia un proceso de reconocimiento en la superficie de la misma (26). Al respecto se ha demostrado que *Salmonella* Typhimurium, Javiana, Newport, Saintapul y Montevideo se transportan dentro de las plantas de tomate a través de las raíces, hidátodos, estomas, tallos, hojas, botones y flores. Incluso después de la inoculación de las hojas de plantas de tomate, *S. Typhimurium* se aisló de la semilla y fruto de la planta (40, 109), sugiriendo que la bacteria puede moverse a través del floema, el cual es el medio principal de transporte de líquidos y azúcares en la fruta (26).

Estudios realizados con los fitopatógenos bacterianos *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas putida* han demostrado que *rpoS* es importante para su supervivencia en ambientes competitivos y en condiciones de estrés para la colonización en tabaco, frijol y pepino (17).

Así mismo, estudios en alfalfa con mutantes de *S. Newport* en *rpoS* mostraron una deficiencia en la colonización de la hortaliza en comparación a lo observado con la cepa silvestre a las 24 h, aunque el número de células alcanzaron un nivel similar después de 48 h (17). Los resultados de las investigaciones realizadas por Dong y col. (2010) y Marvasi y col. (2014), sugieren que las interacciones de *Salmonella* con las plantas son determinadas por el genotipo del hospedante y la diferencia asociada en las propiedades biológicas, fisiológicas y químicas de los cultivos, así como las respuestas de los patógenos (17, 55).

Se conoce que para contrarrestar las infecciones, las plantas poseen mecanismos de defensa que van desde barreras físicas (películas de cera en la superficie de sus órganos, paredes celulares rígidas, etc.), hasta potentes mecanismos moleculares de resistencia en cada célula y señales sistémicas provenientes del sitio de la infección, los cuales tienen marcadas similitudes con la inmunidad innata de los animales (65). El sistema inmune de las plantas está constituido por la inmunidad innata basada en el reconocimiento de un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP, del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*), mediante receptores de reconocimiento (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptors*) los cuales se encuentran en la superficie de las células vegetales y se denominan inmunidad activada por PAMP (PTI, del inglés: *PAMP-triggered immunity*) (57).

El reconocimiento de PAMP conduce a una serie de respuestas tempranas y tardías, incluyendo la activación de cascadas de quinasa, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inducción de genes de defensa y la acumulación de hormonas de defensa. Sin embargo, los patógenos que logran evadir estas respuestas utilizan los sistemas de secreción para administrar efectores a la célula huésped que interfieren con PTI y permiten la progresión de la enfermedad (21). Las plantas combaten estos patógenos adaptados con una familia versátil de receptores intracelulares nucleótidos vinculantes-repetición rica en leucina (NB-LRR, del inglés: *nucleotide binding-leucine rich repeat*) que reconocen a los efectores e inician la inmunidad desencadenada por el efector (ETI). La percepción NB-LRR de los efectores patógenos amplifica las respuestas del PTI que conduce típicamente a la acumulación de la hormona de defensa ácido salicílico (AS) y la muerte celular localizada (21, 57, 65).

La regulación de la red de defensa de las plantas inducida por patógenos involucra la acción de fitohormonas, como el etileno (ET) o las pequeñas moléculas de señalización AS y el ácido jasmónico (AJ) que responden a un determinado tipo de atacante. La señalización por ET es importante para la respuesta de la planta ante la invasión de patógenos, un daño mecánico o la inducción por herbívoros. La señalización por AS es crítica en el establecimiento de la resistencia a una infección bacteriana local y sistémica, mientras que la señalización por AJ se induce en respuesta a heridas o depredación mecánica de herbívoros (2, 72, 65).

En *A. thaliana* y *N. tabacum* (tabaco), se ha demostrado que los patógenos biotróficos son generalmente sensibles a las respuestas de defensa reguladas por AS, mientras que los patógenos con un estilo de vida necrotrófico son comúnmente disuadidos por las defensas controladas por AJ y ET (2, 72). Al respecto, se ha reportado que el AS, el ET y la vía mediadora del AJ son cruciales para restringir la proliferación de *Salmonella Typhimurium* en *Arabidopsis*. Donde las cascadas de proteína quinasa activada por mitógenos (Por sus siglas en inglés MAPK) están implicadas en la respuesta a la infección por *Salmonella*. Schikora y col. (2008) reportaron que las tres cinasas MPK3, MPK4 y MPK6, comúnmente asociadas con la respuesta inmune en *Arabidopsis*, fueron activadas 15 minutos después del contacto con *S. Typhimurium*. Además las mutantes *mpk3* y *mpk6* son altamente susceptibles a la infección por *S. Typhimurium* (84).

García y col. (2014) reportaron que la flagelina de *S. Typhimurium* en *A. thaliana*, induce una inmunidad promovida por PAMP (PAMP-triggered immunity (PTI) mediante el reconocimiento del dominio flg22 por la cinasa receptora FLS2. En contraste la mutante en *fls2* de *S. Typhimurium* mostró reducir pero no inhabilitar la activación de PTI en *Arabidopsis*, lo que sugiere que las plantas también reconocen otros PAMP de *S. Typhimurium*. Adicionalmente la mutante *prgH*, un componente del T3SS de *S. Typhimurium* indujo una expresión potenciada de los genes de defensa de *Arabidopsis*, lo que sugiere que los efectores T3SS también están implicados en la supresión de la defensa de la planta (21).

Se ha reportado que las fitohormonas también tienen un papel no sólo contra la persistencia de patógenos entéricos en las plantas, sino también contra la formación de biopelículas en *Salmonella*, ya que en la planta del tomate el aumento en los niveles de AJ y sus precursores, a consecuencia de la presencia de la bacteria suprimieron la expresión de YihT, lo cual inhibió la formación de biopelículas en la planta y redujo la síntesis del antígeno O de *Salmonella* (105).

### **2.3.1 Internalización de *Salmonella* en el tomate.**

Desde hace tiempo se conocen que los tomates son portadores de poblaciones internas de diversos microorganismos que pueden provenir desde antes de la cosecha. La relación de estas bacterias con los tejidos que las rodean no es clara, ya que la fruta puede almacenarse durante varias semanas sin evidencia de deterioro (3). Se ha reportado que los serotipos más adaptados para colonizar el tomate son *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo. Como se mencionó anteriormente su internalización se puede dar durante el cultivo logrando internalizarse en el fruto desde su desarrollo (26).

Aunque los primeros informes no estaban claros al respecto del sitio de proliferación, informes recientes sugieren que la proliferación actualmente está ocurriendo dentro de los espacios libres del fruto (3). La internalización de la bacteria puede ser durante la etapa de lavado en la planta empacadora, sobre todo cuando la presión del agua sobre la superficie del tomate supera la presión de gas interna como la hidrofobicidad de la superficie del fruto. Otro mecanismo para la internalización de *Salmonella* implica el estado de dilatación de las células vegetales en la superficie del tomate, ya que cuando éstas se exponen al agua fría de lavado se contraen rápidamente y permiten la entrada de la bacteria a través de aberturas como la cicatriz del pedúnculo y fisuras causadas por insectos o daños mecánicos (98). Adicionalmente, si *Salmonella* se encuentra sobre las superficies de los tomates puede formar biopelículas que proliferarán cuando las condiciones ambientales se vuelvan propicias para el crecimiento, permitiendo que la bacteria pueda encontrarse tanto en la superficie como en el interior del tomate (37).

### 3. Planteamiento del problema y justificación

La adaptación de *Salmonella* en la superficie e interior del tomate es un tema reciente de investigación debido a que el hábitat principal del patógeno es el tracto gastrointestinal de los animales y el hombre. En México en el año 2017 se han estimado alrededor de 24,473 casos de salmonelosis, 12,435 de fiebre tifoidea, 3,166 de fiebre paratifoidea y 1, 510,361 casos de infecciones intestinales indefinidas que pudieron ser causadas por *Salmonella* (85). El tomate se contamina con *Salmonella* principalmente por falta de cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas, incluyendo riego con aguas contaminadas o no tratadas, mal manejo del composteo o falta de higiene de los trabajadores, entre otros factores causales. Estudios recientes muestran que cuando las semillas de tomate están contaminadas con *Salmonella*, la bacteria es capaz de sobrevivir durante el proceso de germinación, alcanzar las hojas y finalmente los frutos. Se ha reportado que *Salmonella enterica* es capaz de internalizarse y sobrevivir dentro de la planta del tomate lo cual podría proteger a la bacteria de los compuestos desinfectantes. Existen evidencias de que *Salmonella* puede internalizarse, sin embargo se desconoce el comportamiento del patógeno una vez internalizado en términos de su capacidad de respuesta ante las condiciones del interior del fruto tanto a nivel de sobrevivencia como a su respuesta génica.

#### **4. Hipótesis**

Los serotipos de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo lograrán internalizarse en el tomate cherry.

La higienización con hipoclorito de sodio reducirá las unidades formadoras de colonias de las células recuperadas de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo del interior del tomate cherry.

El gen *rpoS* se transcribirá cuando *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo se encuentren internalizadas en el tomate cherry.



## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar las dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en frutos de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme).
- Evaluar la capacidad de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio en frutos de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme).
- Evaluar la transcripción del gen *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en frutos de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme).

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Cepas de trabajo

Los serotipos de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio fueron aisladas de diferentes fuentes (Cuadro 2) y se indujo la generación de una resistencia espontánea a rifampicina (0.1 g/L) de acuerdo al procedimiento descrito por Kaspar y Tamplin (1993) (45). Las cepas se conservaron con glicerol al 25 % a -20 °C y en tubos inclinados con agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura y 0.1 g/L de rifampicina a 4 °C hasta su uso posterior.

**Cuadro 2. Cepas utilizadas durante la investigación**

Cepa	N° de identificación	Fuente de aislamiento	Procedencia
S. Newport	45 *	Epicarpio de aguacate	°LMIA
S. Saintpaul	188	Carne de bovino	Cabrera y col. (2013) (9)
S. Montevideo	17	Carne de bovino	Cabrera y col. (2013) (9)
S. Saintpaul	188 RF	Carne de bovino	En este estudio
S. Montevideo	17 RF	Carne de bovino	En este estudio

\* RF: Resistente a Rifampicina; °: Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de Alimentos de la Universidad de Guadalajara.

### 6.2 Características de los tomates cherry

Se seleccionaron tomates de la variedad cherry libres de daños físicos, de color rosado, firmes con un peso aproximado de 7g, pH 4 y 7 °Brix. Previo a los experimentos de inoculación, los tomates se acondicionaron a 25 °C/24 h (Binder BD 115-UL).

### 6.3 Determinación de Parámetros de pH y grados Brix en los tomates cherry utilizados durante la investigación.

Para la medición de los parámetros fisicoquímicos, se colocó un tomate libre de daños físicos, color rosado y firme dentro de una bolsa estéril (Whirl-Pak), la cual se colocó en un agitador peristáltico durante 1 min para romper y homogenizar la muestra. La medición de pH se llevó a cabo en la muestra homogenizada mediante la inmersión del electrodo de un potenciómetro Thermo scientific (Orion 3 star). Los grados Brix se midieron de ~500 µL del jugo del tomate con un refractómetro ATAGO (Master-T 0-33 %).

#### **6.4 Preparación del inóculo**

Para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, se reactivaron de manera individual las cepas resistentes a rifampicina de *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo en medio Luria Bertani (LB) (Anexo B) y se incubaron a 37 °C/24 h (memmert 854 Schwabach). Posteriormente se tomaron 670 µL del cultivo previo y se inocularon en tubos con 10 mL de LB para incubarse a 37 °C/4 h. Después se hizo otra transferencia de 670 µL a tubos nuevos 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 por centrifugación 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) (Anexo C).

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

Previo a los experimentos de inoculación, los tomates se acondicionaron a 25 °C. Veintidós tomates por experimento se inocularon con cada una de las cepas estudiadas. En cada experimento, los tomates fueron sumergidos en una bolsa estéril (Whirl-Pak) con 200 mL de cada suspensión bacteriana (Newport, Saintpaul o Montevideo) y fueron incubados durante 30 min/12 °C (MMM Group Climacell) para promover la internalización de las células en el fruto (26, 101). Los tomates se dejaron secar por una hora a temperatura ambiente, para posteriormente transferir los frutos a una incubadora (Binder BD 115-UL) ajustada a 25°C para realizar la toma de muestra en los intervalos de 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 32 h, 3 d, 6 d y 12 d.

#### **6.6 Recuperación de células internalizadas en los tomates cherry.**

En los intervalos de tiempos indicados se removieron de la incubadora (Binder BD 115-UL) dos tomates para procesarlos y realizar recuentos del patógeno en la parte interna del fruto. Brevemente, los tomates se desinfectaron de manera externa por inmersión en etanol al 96 % por 2 min. Se dejaron secar 30 min, posteriormente se enjuagaron en 50 mL de agua peptonada amortiguada (BPW) 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 (Anexo A). Una vez desinfectados, el tomate se transfirió a una bolsa estéril (Whirl-Pak) con 50 mL de BPW para después colocarlo en un agitador peristáltico (BagMixer® 400) durante 1 min a 50/60 Hz, para romper el fruto y liberar el contenido interno de manera homogénea. La concentración bacteriana de cada una de las tres cepas de *Salmonella* internalizadas se cuantificó en placas de AST-Rf (1g/L). Las placas se incubaron a 37 °C/24 h (Memmert 854 Schwabach) y se cuantificaron las colonias de cada placa reportándose como Log UFC/50 mL. Los experimentos realizados se llevaron a cabo por duplicado con tres repeticiones independientes.

### **6.7 Recuperación de las células internalizadas en tomate cherry higienizados con hipoclorito de sodio.**

La cuantificación de *Salmonella enterica* internalizadas en tomate cherry higienizados con hipoclorito de sodio se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos antes mencionados modificando el lavado de las bacterias, donde se sustituyó la SSF por agua destilada estéril (Anexo D). Doscientos ochenta y ocho ppm de hipoclorito de sodio se adicionaron a la suspensión bacteriana utilizada para inocular los tomates y en adelante los experimentos de inoculación y recuperación de células internalizadas se continuaron como previamente fue descrito. Los experimentos realizados con hipoclorito de sodio se llevaron a cabo por triplicado con dos repeticiones independientes.

### **6.8 Obtención de células internalizadas en el tomate cherry para la purificación de RNA de *Salmonella*.**

Se llevaron a cabo los procedimientos antes mencionados para la inoculación y recuperación de las células internalizadas en el tomate cherry en los tiempos de 0 y 3 días. Una vez obtenida la suspensión bacteriana del interior del tomate se realizaron dos filtraciones para retirar la pulpa y semillas del fruto con papel filtro estéril de 10 cm<sup>2</sup> el cual se colocó en un embudo estéril soportado en un tubo cónico estéril de 50 mL (Falcón) para recuperar aproximadamente 35 mL de la suspensión. La suspensión obtenida se centrifugó (Labogene 1730R) a 6,000 rpm/15 min/16 °C, se decantaron aproximadamente 30 mL del sobrenadante y los 5 mL restantes se centrifugaron

(Labogene 1730R) a 11 000 rpm/15 min/16 °C, para obtener el paquete celular el cual se protegió con RNAProtect (Qiagen) según las especificaciones del fabricante (Anexo E). El paquete celular protegido se almacenó a 20 °C hasta que se purificara el RNA.

### **6.9 Purificación del RNA de las células internalizadas de *Salmonella***

Una vez obtenido el paquete celular se realizó la purificación del RNA utilizando el kit RNeasy Mini kit (Qiagen) según las especificaciones del fabricante (Anexo F) con algunas modificaciones en la lisis celular. Brevemente, al paquete celular se le agregaron 350 µL de buffer RLT preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante y después se homogenizó en vortex (Daigger Genie 2) por 5 min el cual posteriormente se centrifugó (Eppendorf 5415 C) a 11,000 rpm/15 s; después se transfirieron por pipeteo los 350 µL del lisado a un microtubo nuevo evitando aspirar los residuos de la pulpa del tomate. Después se adicionaron 350 µL de etanol al 70 % y se centrifugó a 11,000 rpm/15 min, para transferir los 700 µL resultantes a una columna de spin RNeasy. A partir de este paso se siguieron las especificaciones del fabricante para la obtención del RNA. La elución del RNA fue agregando 20 µL de agua incluida en el kit a la columna dejando interactuar ésta con las muestras por 1 min, para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm/1 min, en una segunda ocasión se agregaron nuevamente 20 µL de agua del kit a la columna para repetir la elución bajo las condiciones previamente descritas. Se cuantificó 1 µL de RNA por espectrofotometría a 260 nm (Quawell Q5000).

### **6.10 Tratamiento del RNA de *Salmonella* con DNAsa**

Se trataron 0.5 µg/µL de RNA con 1 U/µL de DNAsa (Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se incubó a 37 °C/24 h (Thermo Shaker MS-100) (Anexo G). La reacción de tratamiento con DNAsa se detuvo adicionando 1 µL de solución Stop, se centrifugó a 12,000 rpm/15 seg (Eppendorf 5415 C) para posteriormente incubarse a 65 °C/10 min (Thermo Shaker MS-100). La pureza del RNA fue verificada por la amplificación del gen *rpoS* mediante el empleo de la técnica PCR de punto final (Anexo H) utilizando los primers *rpoS*-F1 con 5'-GGTAAAAATTGCCCGCCGTT-3' y *rpoS*-R1 5'-TGTCCAGCAACGCTTTTTTCG-3, Utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización 95 °C/25", alineamiento

58 °C/25”, elongación 72 °C/25”. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en cámaras ENDURO™ (Labnet) con geles de agarosa al 1 % (Promega), y un tiempo de corrida de 1 h a 80V utilizando una fuente de poder Powerpac 300 (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con greengel (Biotium) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

### 6.11 Síntesis de cDNA y PCR tiempo real

La retrotranscripción se realizó empleando el Kit GoScript Reverse Transcription System (Promega) siguiendo las condiciones del proveedor (Anexo I). Para ello se mezclaron 0.05 µg/µL de RNA libre de DNA con 1 µg/µL de Random Primers (mezcla de hibridación) y agua. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se les adicionó la mezcla de amplificación utilizando 160 U/µL de retrotranscriptasa (M-MLV RT), la cual se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL (Anexo I). El volumen total de la mezcla de amplificación se adicionó a la mezcla de hibridación para obtener un volumen final de 20 µL. El alineamiento se realizó calentando la muestra a 25 °C/5 min y la amplificación se llevó a cabo a 42 °C/1 h utilizando un termociclador (Applied Biosystems® 9902). El qRT-PCR múltiple se llevó a cabo utilizando el termociclador StepOne Plus™ (Applied Biosystems® Life Technologies™), cuantificando la fluorescencia de los fluoróforos VIC (16 *S*) o FAM (*rpoS*) (Cuadro 3). La reacción se llevó a cabo empleando aproximadamente 1 µg de cDNA correspondiente a cada muestra cuantificado por espectrofotometría a 280 nm (Quawell Q5000), en un volumen final de 15 µL siguiendo las recomendaciones del proveedor (Anexo J). Las condiciones de amplificación fueron las especificadas para la Master mix AmpliTaq Gold® (95 °C/10 min, desnaturalización 95 °C/ 15 s, alineamiento y elongación 60 °C/1 min. Durante 40 ciclos). El análisis de la expresión relativa de *rpoS* se realizó calculando la  $\Delta Ct$  mediante el empleo de la siguiente fórmula (77):

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

Con los datos de los promedios de  $\Delta Ct$  se obtuvo el error estándar y se llevó a cabo el análisis estadístico.

**Cuadro 3. Secuencia de primers y sondas TaqMan® (Ensayos Custom TaqMan® Gene Expression)**

Gen de amplificación	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'--- 3')	Secuencia de la sonda (5'--- 3')	Cita
<i>16S</i>	16SSALENT-F	GAGACACGGTCCAGACTCCTA	VIC-CCCACTGCTGCCTCC- NFQ	A
	16SSALENT-R	TGCGCCCATTGTGCAATATTC		
<i>rpoS</i>	AICSXN2_F	GCAGGTATACGTTTCAGCTCTTTAAC	FAM-TCGCTTGCCGATTCAC- NFQ	Este estudio
	AICSXN2_R	TGGTGGATTCGCCAGACAAT		

A: Sánchez et al., 2015 (81)

### 6.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las células internalizadas en tomate y la transcripción del gen *rpoS*, se analizaron estadísticamente utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII mediante el empleo de las pruebas de análisis de varianza simple (ANOVA) y de rangos múltiples (*LSD* por sus siglas en inglés) con un nivel de confianza del 95 % para la evaluación de grupos homogéneos.

## 7. Resultados y discusión

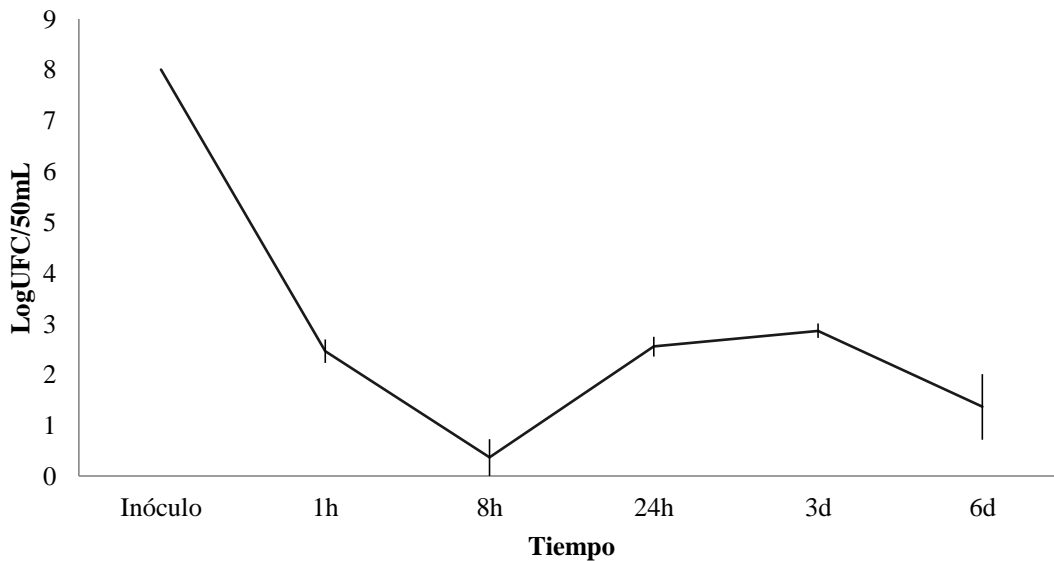
Diversas investigaciones han demostrado la interacción de *Salmonella enterica* en la planta y el fruto del tomate durante el cultivo (3, 26, 59, 88, 98, 109, 110). Pero poco se ha estudiado sobre el comportamiento de la bacteria una vez que ésta logra internalizarse en el fruto. Por otra parte el factor sigma S desempeña un papel clave en la supervivencia de las bacterias bajo condiciones de hambruna o estrés (36). Por ello el objetivo de este estudio fue el determinar las dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio, y cuantificar la transcripción del gen *rpoS*. Para llevar a cabo este objetivo se realizaron algunos experimentos preliminares que sirvieron para establecer la forma de descontaminación de la superficie del fruto (Anexo A), la inoculación y la recuperación de las células internalizadas y que se describen a continuación.

### 7.1 Estandarización de la inoculación y recuperación de *Salmonella* internalizada en el tomate cherry.

Las investigaciones de brotes relacionados con tomates sugieren que el agua de lavado en las instalaciones de empaque puede ser uno de los factores que contribuyen a la contaminación microbiana del fruto (101). Para determinar el método de inoculación y recuperación de *Salmonella* en nuestro estudio, se evaluó la internalización de *S. Newport* en el tomate cherry mediante la inoculación por inmersión de los frutos con  $1 \times 10^8$  UFC/mL durante 1 min/12 °C para promover la internalización de bacteria en el tomate, ya que se ha reportado que un gradiente de temperatura de 12 °C promueve la infiltración de las bacterias suspendidas en el agua de lavado, debido a que la presión del agua sobre la superficie del tomate supera tanto las presiones internas de gas como la hidrofobicidad de la superficie del tomate (98). Posteriormente los tomates se removieron del inóculo y se dejaron secar durante 1 h para después ser trasladados a una incubadora a 25 °C. Para determinar el número de células internalizadas se procedió a remover de la incubadora dos tomates en los tiempos de 1 h, 8 h, 1 d, 3 d y 6 d para la desinfección de la superficie y realizar recuentos del patógeno en la parte interna del fruto de acuerdo al procedimiento estandarizado previamente (Anexo A). Brevemente, los tomates se desinfectaron de manera externa por inmersión en etanol al 96 % por 2 min. Se dejaron secar 30 min, posteriormente se enjuagaron en 50 mL de BPW y se sometieron a un baño ultrasónico durante 1 min.



Una vez desinfectados, los tomates se transfirieron a una bolsa estéril con otros 50 ml de BPW para después colocarla en un agitador peristáltico durante 1 min, para promover la ruptura del fruto y liberar de manera homogénea su contenido interno. La cuantificación de la concentración bacteriana de *Salmonella* Newport se realizó por recuentos en placas de AST-Rf (0.1 g/L). Las placas se incubaron a 37 °C/24 h y se cuantificaron las células de cada placa reportándose como Log UFC/50 mL. Los resultados de este experimento preliminar fue la incapacidad en la recuperación de las células internalizadas, por lo que se modificó el tiempo de inmersión del fruto en el inóculo a 12 °C de 1 min a 30 min, de acuerdo a lo reportado por Xia y col. (2012) y Gu y col. (2011) realizada la modificación antes mencionada se llevó a cabo un experimento similar al previamente descrito, obteniendo en promedio 1.9 Log UFC/50 mL de *Salmonella* recuperada del interior del fruto (Fig. 3) (26, 101). Con los resultados obtenidos procedimos a llevar a cabo los experimentos de internalización y supervivencia de los tres serotipos de interés para este estudio.



**Fig. 3 Estandarización del proceso de recuperación de la internalización de *Salmonella* Newport en el tomate cherry.** Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

## 7.2 Internalización de *Salmonella* Newport en tomate cherry.

*Salmonella* puede internalizarse en los tomates a través de la infiltración de agua durante el lavado. Otro mecanismo para la infiltración de *Salmonella* en el fruto involucra las células dilatadas de la superficie tibia del tomate, cuando estas células se exponen al agua de lavado fría se contraen rápidamente y succionan el agua contaminada a través de aberturas, tales como la cicatriz del pedúnculo y las fisuras causadas por insectos o daños mecánicos (98). Poco se ha estudiado sobre la supervivencia de *Salmonella* una vez que se encuentran internalizadas en el tomate, por ello para determinar la internalización de *S. Newport* en el fruto se inocularon veintidós tomates y se tomaron muestras (2 tomates/muestra) a diferentes intervalos de tiempo (0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 32 h, 3 d, 6 d y 12 d) siguiendo los protocolos de inoculación y recuento de células internalizadas establecidos en este estudio. Los resultados obtenidos muestran que la recuperación en placa de *S. Newport* fue variable durante todos los tiempos evaluados y oscilan entre 0.7 Log UFC/50 mL hasta 3.5 Log UFC/50 mL, obteniendo una diferencia estadística significativa en los tiempos de 4 h, 8 h y 6 d (Fig. 4 y Cuadro 4). Varios estudios han confirmado la presencia de *S. Newport* en las raíces (65 %), hojas (40 %), tallos (10 %) y frutos (6 %) de la planta de tomate, siendo su nicho preferente la raíz de la planta (25, 27, 31, 109).

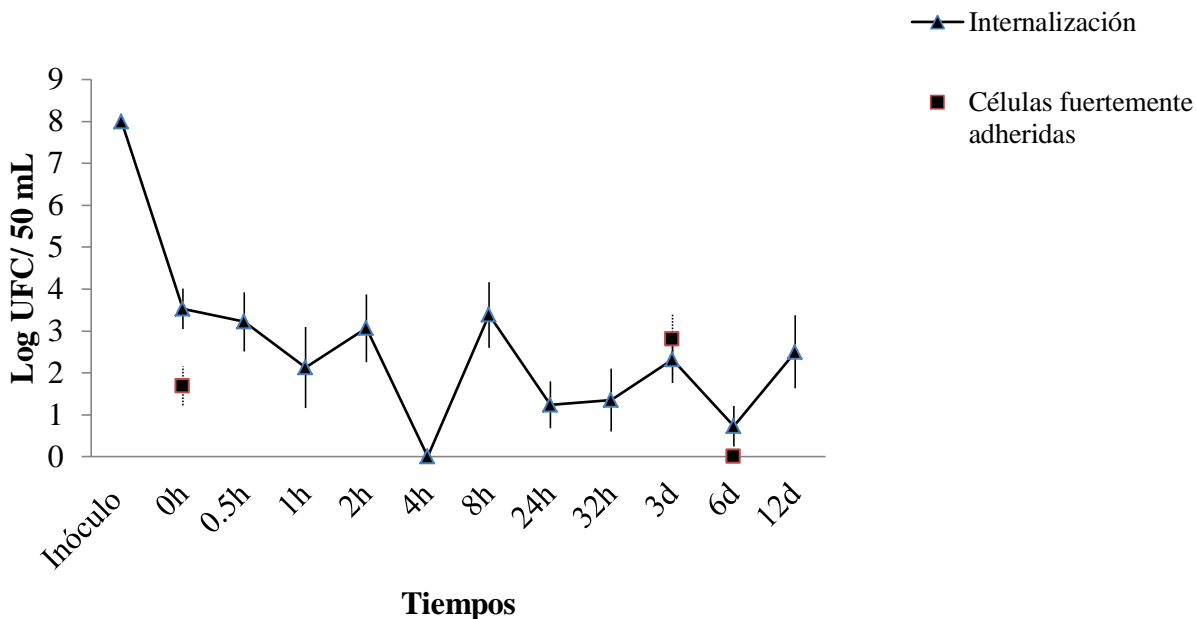
De los resultados obtenidos con *S. Newport* cabe resaltar que no se recuperaron células cultivables en placa a las 4 h, resultado que contrasta a lo obtenido a las 8 h, donde sí se observó una recuperación de células en una concentración similar a las recuperadas a las 0 h (3.5 Log UFC/50 mL). Un fenómeno similar se observa al comparar los resultados de los recuentos obtenidos entre los tiempos de 6 d y 12 d, donde observamos una recuperación de las células cultivables de 0.7 Log UFC/50 mL a 2.5 Log UFC/50 mL, respectivamente; curiosamente en ambos tiempos (4 h y 6 d) al duplicarse el tiempo de incubación (8 h y 12 d) la recuperación de células viables cultivables aumenta en promedio en 2 Log UFC/50 mL. Estos resultados podrían sugerir que a los tiempos de 4 h y 6 d post-inoculación *S. Newport* se encuentra en un estado viable no cultivable, lo cual impidió o limitó el recuento de las células por siembra en placa.

Al respecto se ha reportado que *Salmonella* entra en un estado viable no cultivable cuando la bacteria se encuentra bajo estrés el cual puede ser provocado por una deficiencia de nutrientes, por un cambio osmótico, por cambios de temperaturas, por deshidratación, o por factores que pudieran ser inherentes a el interior del fruto (83, 108). Es importante mencionar que aunque la bacteria se encuentre en un estado viable no cultivable ésta conserva su patogenicidad, incluso es posible la recuperación del estado viable no cultivable a un estado viable cuando se utilizan condiciones favorables que le permiten a *Salmonella* reanudar su división celular (48, 68, 76, 83).

**Cuadro 4. Recuperación de *S. Newport* internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.**

<b>Tiempos</b>	<b>Log de UFC internalizadas ± SE</b>	<b>*Análisis estadístico</b>
0h	3.5 ± 0.5	D
0.5h	3.2 ± 0.7	CD
1h	2.1 ± 1.0	BCD
2h	3.1 ± 0.8	CD
4h	0 ± 0	A
8h	3.4 ± 0.8	D
24h	1.2 ± 0.6	ABC
32h	1.4 ± 0.8	ABC
3d	2.3 ± 0.6	BCD
6d	0.7 ± 0.5	AB
12d	2.5 ± 0.9	BCD

\*Las letras representan la homogeneidad de grupos entre las medias.



**Fig. 4 Supervivencia de células de *Salmonella* Newport internalizadas en el tomate cherry.** Los triángulos representan los Log UFC/50mL de células internalizadas de *Salmonella* Newport en el tomate cherry. Los cuadrados representan las células fuertemente adheridas en la superficie del tomate recuperadas del medio de enjuague previo a la ruptura del fruto. Cada valor graficado representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

### 7.3 Recuperación de *Salmonella* Newport internalizadas en tomate cherry sometidas a un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.

El lavado con agua e hipoclorito de sodio se utiliza comúnmente como tratamiento post-cosecha en la industria del tomate para reducir los microorganismos patógenos y el deterioro del fruto (54). Para evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio para inactivar a *Salmonella* Newport en el inóculo y así prevenir su internalización en el tomate cherry, se sumergieron 22 tomates por experimento en un inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Salmonella* Newport adicionado con 288 ppm de hipoclorito de sodio y se incubaron 30 min/12 °C para promover la internalización de la bacteria por un gradiente de temperatura de 12 °C. Los resultados de este experimento mostraron la incapacidad de recuperar células viables en placa debido a que *S. Newport* fue expuesta al hipoclorito de sodio (Cuadro 4). Sin embargo, no se descarta la idea de que exista la presencia de las células de *Salmonella* Newport,

en el fruto en un estado de viable no cultivable debido a que el hipoclorito de sodio pudo causar estrés en las células bacterianas (83).

Diversos investigadores han evaluado diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio que van desde las 100 a 320 ppm durante 2 min para la desinfección de la superficie de tomates observando una reducción ~ 2 a 6 Log UFC sin obtener una eliminación total de *Salmonella* (39, 43, 54). Al respecto, varias investigaciones sobre la desinfección de frutas y hortalizas mencionan que ningún desinfectante es 100 % eficaz contra la eliminación de microorganismos (61, 97, 107). Sin embargo, una vez que los tomates están contaminados internamente con *Salmonella*, son difíciles de desinfectar, debido a que los desinfectantes no pueden eliminar y/o inactivar las bacterias internalizadas (98). Ritter y col. (2012) realizaron pruebas *in vitro* para comparar la resistencia al hipoclorito de sodio de *S. Enteritidis* e investigar la base genética de esta resistencia, sus resultados indicaron que el gen *rpoS* es inducido durante la exposición al hipoclorito de sodio y probablemente coordina la expresión de otros genes implicados en las respuestas a estrés (74). Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con precaución ya que otros autores han reportado que la inducción del estado viable no cultivable en *S. Oranienburg*, *S. Dublin*, y *S. Typhimurium* requiere de niveles bajos de expresión de *rpoS* (47).

#### **7.4 Internalización de *Salmonella* Saintpaul en tomate cherry.**

La internalización de *S. Saintpaul* en el fruto se evaluó siguiendo los mismos procedimientos utilizados para *S. Newport* utilizando un gradiente de temperatura de 12 °C entre el inóculo y los tomates para promover la internalización de *S. Saintpaul*, desinfectando la superficie del fruto con etanol y recuperando las células internalizadas mediante la ruptura y homogenización del tomate en un agitador peristáltico. Los resultados muestran que *S. Saintpaul* tuvo una internalización inicial (0 h) de 2.3 Log de UFC/50 mL, posteriormente se adapta y a la media hora alcanza 3.8 Log de UFC/50 mL, posteriormente su tasa de población se reduce a 2.4 Log de UFC/50 mL (1 h) y se mantiene constante a través de los tiempos evaluados en aproximadamente 2 Log de UFC/50 mL, sin que exista una diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos evaluados (Cuadro 5,

Fig. 5). *Salmonella* Saintpaul es el serovar aislado con mayor frecuencia de las superficies del fruto (48 %) y se ha demostrado que es capaz de adherirse a la superficie del tomate (109).

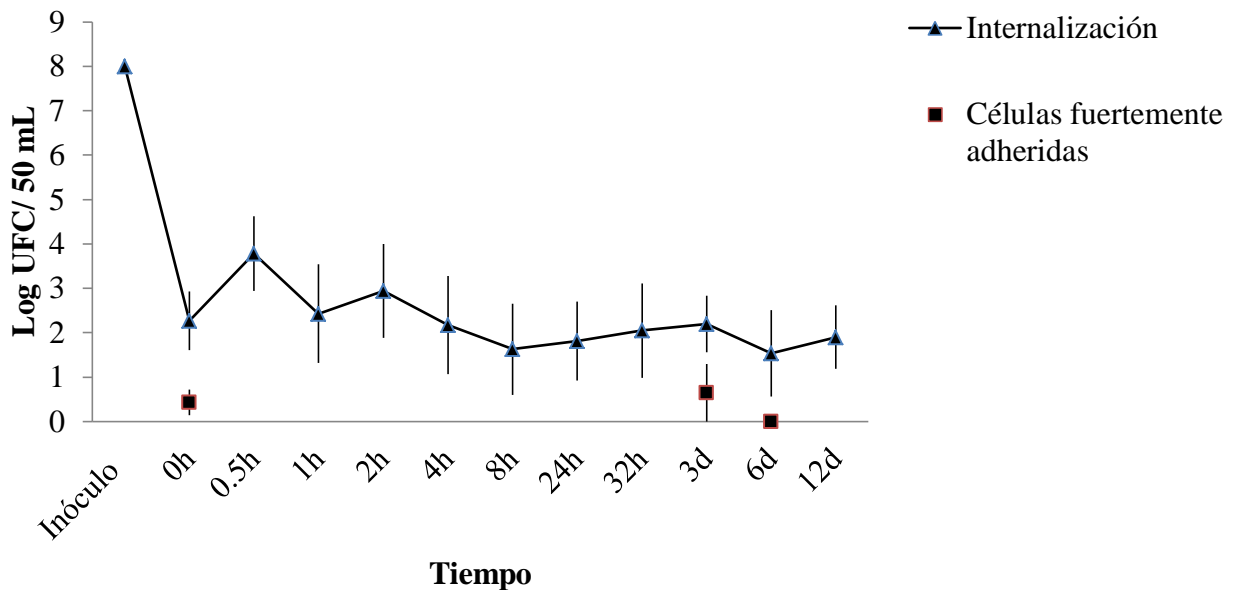
Al respecto en el año 2008 se asoció a *S. Saintpaul* con un brote por el consumo de tomate o chile jalapeño provenientes de México, utilizados para preparar salsas en restaurantes de comida mexicana en los Estados Unidos; sin embargo, el estudio del brote arrojó que el causante del mismo fue el chile Jalapeño (46).

Los experimentos de inactivación de *S. Saintpaul* con hipoclorito de sodio para prevenir su internalización en el tomate cherry, mostraron una incapacidad para recuperar células viables en placa (Cuadro 5), similar a lo observado con *S. Newport*. No obstante, los resultados obtenidos con *S. Saintpaul* en hipoclorito de sodio, no descartamos que ésta se encuentre un estado viable no cultivable.

**Cuadro 5. Recuperación de *S. Saintpaul* internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.**

<b>Tiempos</b>	<b>Log de UFC internalizadas <math>\pm</math> SE</b>	<b>*Análisis estadístico</b>
0h	2.3 $\pm$ 0.7	A
0.5h	3.8 $\pm$ 0.8	A
1h	2.4 $\pm$ 1.1	A
2h	2.9 $\pm$ 1.1	A
4h	2.2 $\pm$ 1.1	A
8h	1.6 $\pm$ 1.0	A
24h	1.8 $\pm$ 0.9	A
32h	2.0 $\pm$ 1.1	A
3d	2.2 $\pm$ 0.6	A
6d	1.5 $\pm$ 1.0	A
12d	1.9 $\pm$ 0.7	A

\*La letra representa la homogeneidad de los grupos entre las medias.



**Fig. 5 Supervivencia de células de *Salmonella* Saintpaul internalizadas en el tomate cherry.** Los triángulos representan los Log UFC/50mL de células internalizadas en el tomate cherry. Los cuadrados representan las células fuertemente adheridas de la superficie del tomate. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

### 7.5 Internalización de *Salmonella* Montevideo en tomate cherry.

*Salmonella enterica* puede adaptarse rápidamente al medio ambiente y sobrevivir durante largos períodos de tiempo en diversos hábitats (80). De manera similar a *S. Newport* y *Saintpaul* estudiamos la supervivencia de *S. Montevideo* en el interior del tomate cherry, siguiendo los protocolos establecidos en este estudio para la inoculación y recuperación de las células internalizadas. Los resultados obtenidos mostraron que *S. Montevideo* fue uno de los serotipos mejor adaptados en el interior del tomate, tuvo una internalización inicial (0 h) de 3 Log de UFC/50 mL, decreciendo aproximadamente a 1 Log de UFC/50 mL a los 30 min, para recuperarse 4.2 Log de UFC/50 mL a la hora y manteniéndose relativamente constante en el resto de los tiempos evaluados. Se observó el máximo de células recuperadas a las 4 h (4.4 Log de UFC/50 mL) y el mínimo a los 3d (2.8 Log de UFC/50 mL), esta variabilidad de datos hacen que el análisis estadístico señale diferencias de grupos en los tiempos evaluados (Cuadro 6, Fig. 6).

Se ha reportado que de los 250 serotipos aislados de tomates de invernadero, el 64 % de los aislamientos fueron Montevideo demostrando que es el serotipo más adaptado a la planta y fruto de tomate (66, 88).

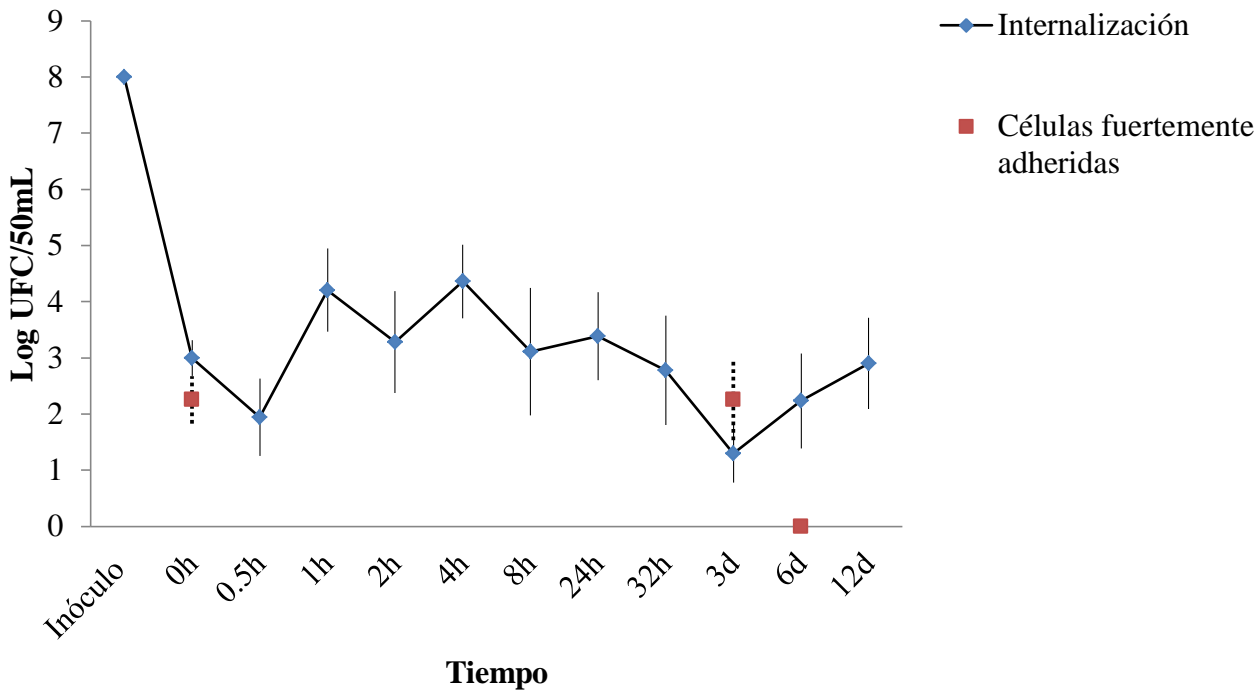
Los resultados obtenidos de los experimentos donde se usó el hipoclorito de sodio para prevenir la internalización de *S. Montevideo* en el tomate cherry mostraron su eficacia para impedir el proceso, ya que no se recuperaron células viables en placa para su recuento (Cuadro 6). No obstante los resultados obtenidos en este experimento, no descartamos que *S. Montevideo* pueda sobrevivir en el interior del tomate en un estado viable no cultivable.

**Cuadro 6. Recuperación de *S. Montevideo* internalizada en tomate cherry en ausencia y presencia de un proceso de higienización con hipoclorito de sodio.**

<b>Tiempos</b>	<b>Log de UFC internalizadas ± SE</b>	<b>Análisis estadístico</b>
0h	3.0 ± 0.3	AB
0.5h	1.9 ± 0.7	AB
1h	4.2 ± 0.7	A
2h	3.3 ± 0.9	AB
4h	4.4 ± 0.7	A
8h	3.1 ± 1.1	ABC
24h	3.4 ± 0.8	AB
32h	2.8 ± 1.0	ABC
3d	1.3 ± 0.5	A
6d	2.2 ± 0.8	ABC
12d	2.9 ± 0.8	ABC

\*Las letras representan la homogeneidad de grupos entre las medias.





**Fig. 6 Supervivencia de células de *Salmonella* Montevideo internalizadas en el tomate cherry.** Los triángulos representan los Log UFC/50mL de células internalizadas. Los cuadrados representan las células fuertemente adheridas en la superficie del tomate. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

### 7.6 Comparación de la supervivencia de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en tomates cherry.

El análisis estadístico de grupos que compara los resultados de supervivencia de los tres serotipos evaluados en los tiempos de 0 h, 4 h, 24 h, 3 d, 6 d y 12 d muestran que sólo en el tiempo de 4 h hay una diferencia de grupos, el resto de los tiempos analizados no mostró cambios (Cuadro 7, Fig. 7). Este análisis muestra que aunque los recuentos de células recuperadas del interior del fruto entre los serotipos fue diferente en los tiempos evaluados, en el análisis estadístico global de la recuperación de la UFC fue similar para los tres serotipos.

No obstante, los recuentos de UFC recuperadas en el interior del fruto en los tiempos de 1 h y 4 h de *Salmonella* Montevideo (4.2 UFC Log/50mL y 4.4 UFC Log/50mL) fue mayor en comparación a lo recuperado con *S. Newport* (2.1 Log UFC /50mL en 1 h y 0 Log UFC /50mL en 4 h) y *S. Saintpaul* (2.4 Log UFC /50mL en 1 h y 2.2 Log UFC /50 mL en 4 h) (Cuadro 7, Fig. 7), sugiriendo que *S. Montevideo* tiene una adaptación mejor en el interior del tomate en los tiempos mencionados. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores donde reportan que *S. Montevideo* se aisló con mayor frecuencia de las flores de la planta e interior del tomate en comparación de otros serotipos (109), además de que es el serotipo más persistente en los tomates cuando éste se introdujo a través de las flores de la planta del tomate (27, 88).

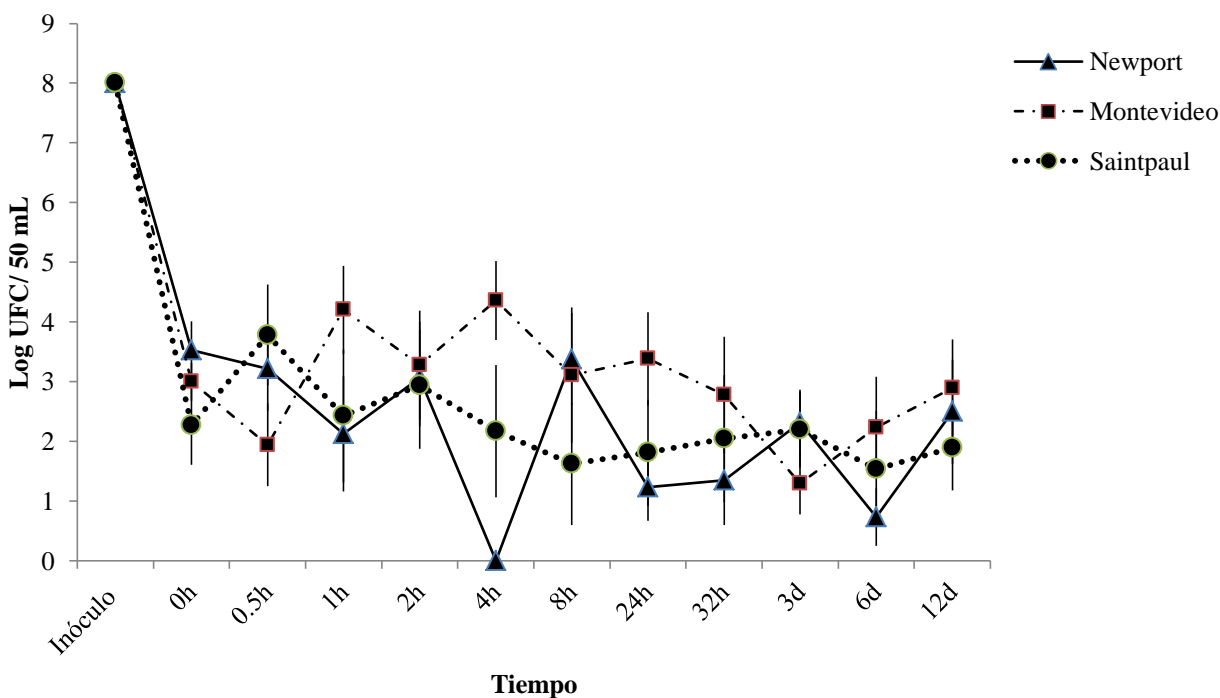
Por su parte en nuestro estudio, *S. Saintpaul* fue el serotipo que se mantuvo estable y constante durante los tiempos evaluados, en contraste a lo observado con *S. Newport* (Cuadro 7, Fig. 7), el cual tuvo un comportamiento más errante a lo largo de los tiempos evaluados. Diferentes autores también han observado que diversos serotipos de *Salmonella* tales como Newport, Hadar, Montevideo y Typhimurium muestran un comportamiento diferente en la interacción con el tomate, siendo *S. Newport* el que tiene una mayor adaptabilidad (29, 88).

Adicionalmente, se ha reportado que el área del pedúnculo es donde se concentra el mayor número de células internalizadas en el fruto, probablemente debido a que en esta área ocurre el intercambio de dióxido de carbono y oxígeno en el tomate para su maduración (101). En nuestro estudio la ubicación de las células internalizadas en el fruto no se determinó, debido a que la recuperación de las células se obtenía mediante la ruptura y homogenización del fruto en un homogeneizador peristáltico; sin embargo, sería interesante el estudio de la ubicación de las células internalizadas. Además debido al intercambio de gases que experimenta el fruto durante su maduración, no descartamos la idea de que algunas de las células que se encontraban en el interior del fruto hayan sido expulsadas durante este proceso, al respecto se ha reportado que la capacidad de *Salmonella* para persistir en los tomates depende de la madurez del fruto y, en cierta medida, de la funcionalidad de las vías de señalización del etileno (55), aunque el efecto de éste en la proliferación de *Salmonella* no ha sido estudiado.

**Cuadro 7. Recuperación de células de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en tomates cherry**

Tiempo	Log UFC/50mL ± SE			Análisis estadístico
	Newport	Saintpaul	Montevideo	
0h	3.5 ± 0.5	2.3 ± 0.7	3.0 ± 0.3	A
4h	0 ± 0	2.2 ± 1.1	4.4 ± 0.7	B
24h	1.2 ± 0.6	1.8 ± 0.9	3.4 ± 0.8	A
3d	2.3 ± 0.6	2.2 ± 0.6	1.3 ± 0.5	A
6d	0.7 ± 0.5	1.5 ± 1.0	2.2 ± 0.8	A
12d	2.5 ± 0.9	1.9 ± 0.7	2.9 ± 0.8	A

\*Las letras representan la homogeneidad de grupos entre las medias.










**Fig. 7 Supervivencia de células de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo internalizadas en el tomate cherry.** Los triángulos representan los Log UFC/50mL de células internalizadas en el tomate cherry de *S. Newport*, círculos a *S. Saintpaul* y los cuadrados a *S. Montevideo*. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

### **7.7 Determinación de parámetros de pH y grados Brix en los tomates cherry utilizados durante la investigación.**

Se han considerado que el pH ácido ( $\text{pH} < 4$  a  $6$ ) de algunas frutas y hortalizas inhibe el crecimiento de bacterias capaces de causar infecciones en humanos (96). Así mismo, es conocido que el tomate tiene un pH de 3.4 a 4.8 dependiendo de la variedad y madurez del fruto (41). Para averiguar si estos parámetros influían en el estudio de las dinámicas de supervivencia de los serotipos de interés de este estudio, medimos el pH y los grados Brix de los tomates utilizados en la investigación durante algunos de los tiempos evaluados (0 h, 8 h, 24 h, 32 h, 3 d, 6 d y 12 d) (Fig. 8). El pH y los grados Brix promedio obtenidos en los tiempos evaluados fueron de 4.2 y 7, respectivamente, sin observar una variación significativa durante el tiempo del muestreo. Al respecto, se ha estimado que aunque los tomates tienen un pH ácido, éste no es limitante para el desarrollo de *Salmonella* en el interior y exterior del fruto (6, 59). Al respecto, James y colaboradores (2010) reportaron la recuperación de *Salmonella* Montevideo en el puré de tomates incubados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 14 h cuando el pH era de 4.4 y 4.9; en contraste cuando el pH era ajustado a 3.4 o 3.9 la recuperación bacteriana era infructuosa (41). Los investigadores proponen que *S.* Montevideo logró sobrevivir en el puré debido a que la bacteria induce una respuesta de tolerancia al ácido que les permite sobrevivir bajo ambientes ácidos (104).

Con respecto a las características físicas del tomate observadas durante los días del muestreo, se registró una disminución de la firmeza del fruto, atribuida al intercambio gaseoso que provoca la pérdida de agua y la consecuente disminución del peso. También se observó que la apariencia y elasticidad del fruto es dependiente del tiempo transcurrido, ya que se observó la pérdida de la turgencia y densidad del fruto a lo largo de los tiempos evaluados (71) (Fig. 8).

Tiempos	0 h	8 h	24 h	32 h	3 d	6 d	12 d
pH ± SE	4.1 ± 0.03	4.1 ± 0.03	4.1 ± 0.03	4.2 ± 0.04	4.2 ± 0.04	4.3 ± 0.03	4.3 ± 0.03
°Brix ± SE	7.4 ± 0.02	6.9 ± 0.03	6.6 ± 0.03	7.3 ± 0.03	6.8 ± 0.03	7 ± 0.02	7.1 ± 0.03
Imagen							

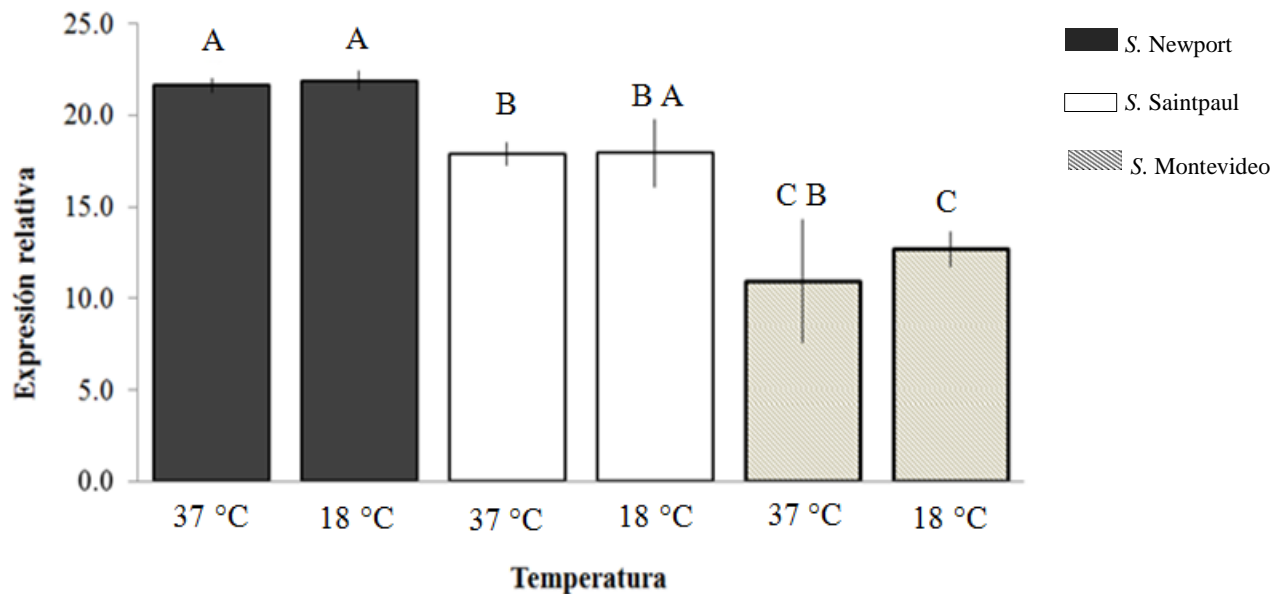
**Fig. 8 Promedios de pH y °Brix ± error estándar de los tomates cherry utilizados durante los experimentos.**

### 7.8 Cuantificación de la expresión relativa del gen *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo.

Humphrey (2004) propone que la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en la cadena alimentaria se debe, en parte, a su capacidad de responder eficazmente a los cambios ambientales (35). Al respecto se ha reportado que RpoS es necesaria para la supervivencia de las bacterias bajo condiciones de hambruna y estrés (36), y que el gen *rpoS* se induce por estrés osmótico o temperatura. McMeechan y col. (2007) reportaron que *rpoS* se reprime con la adición de 6 % de cloruro de sodio al caldo LB (56). Por su parte, Yang y col. (2014) observaron una regulación por temperatura, reprimiéndose el gen a 37 ó 42 °C e induciéndose a 10 ó 25 °C (103).

Debido a que los tomates utilizados en este estudio son incubados a 25 °C previamente a su análisis de recuperación bacteriana, nos preguntamos si *rpoS* de las cepas de *S. Newport*, Saintpaul o Montevideo utilizadas en este estudio (Cuadro 2) experimentaban una regulación por temperatura. Para este propósito se cultivaron las cepas en caldo LB a dos temperaturas que se han reportado que reprimen e inducen la transcripción de *rpoS*, 37 y 18 °C respectivamente (104), para posteriormente evaluar mediante la técnica de qRT-PCR la transcripción relativa de *rpoS* (FAM) utilizando como gen de referencia a RNAr 16S (VIC). Nuestros resultados mostraron que la expresión del gen *rpoS* en los tres serotipos evaluados no se regulaban por la temperatura a 37 y 18 °C ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9). No obstante, al comparar los datos de expresión relativa de *rpoS* entre cepas observamos que la abundancia del transcrito era estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ); a excepción de los resultados

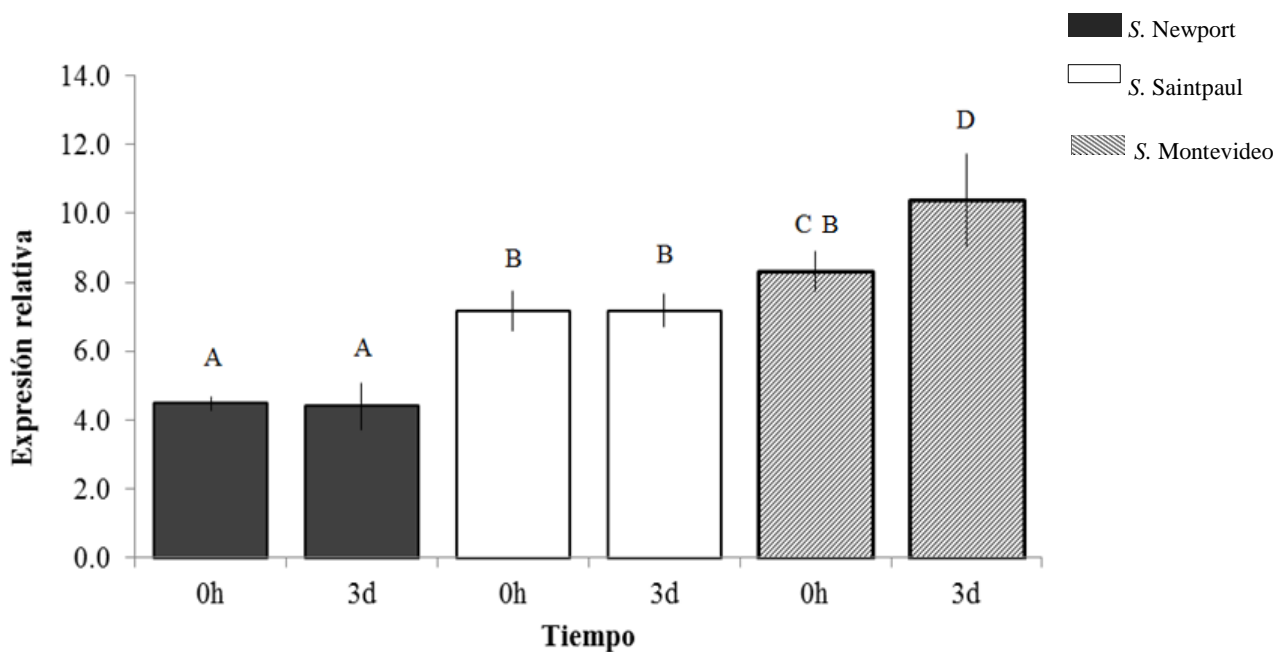
obtenidos entre Newport y Saintpaul a 18 °C y, Saintpaul y Montevideo a 37 °C donde no se observó una diferencia estadística de la transcripción del gen ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9). La carencia en la regulación de la transcripción de *rpoS* por temperatura en los serotipos estudiados, puede ser atribuída a la correlación existente entre la regulación del gen, el serotipo y la fuente de aislamiento; no obstante, la identidad que guarda *rpoS* en todos los serotipos secuenciados ( $\approx 90\%$ ) (44, 47).



**Fig. 9** Expresión relativa en LB de *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo. Las barras negras representan a Newport, barras blancas Saintpaul y barras rayadas a Montevideo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes por duplicado cada uno. Letras iguales indican  $p > 0.05$  y letras diferentes indican  $p < 0.05$ . Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

De manera similar, para determinar si el interior del tomate representa una condición de estrés osmótico o de temperatura para *Salmonella*, se evaluó mediante la técnica de qRT-PCR múltiple la transcripción de *rpoS* de *S. Newport*, Saintpaul o Montevideo de las células internalizadas en tomates a los tiempos de 0 h y 3 d, escogiendo el tiempo 0 h por tener una referencia inicial del comportamiento de internalización de la bacteria y el tiempo de 3 d por considerarse al tomate en el límite del estado fresco (71).

Los resultados de estos experimentos muestran que *Salmonella* Newport y Saintpaul no tuvieron una diferencia en la expresión relativa de *rpoS* en el interior del fruto a las 0 h y los 3 d ( $p > 0.05$ ). En contraste, *S. Montevideo* si mostró una diferencia en la expresión relativa del gen en los tiempos evaluados ( $p < 0.05$ ) (Fig. 10). Esto puede explicarse por la diferencia de aproximadamente 2 log que existe entre lo recuperado en el tiempo 0 (3 UFC Log/50 mL) y los 3d (1.3 UFC Log/50mL). Así mismo, también puede atribuirse a que la bacteria en condiciones de estrés, entró en un estado viable no cultivable y es por ello que no se pudo cuantificar la población bacteriana en un medio de cultivo convencional (48).

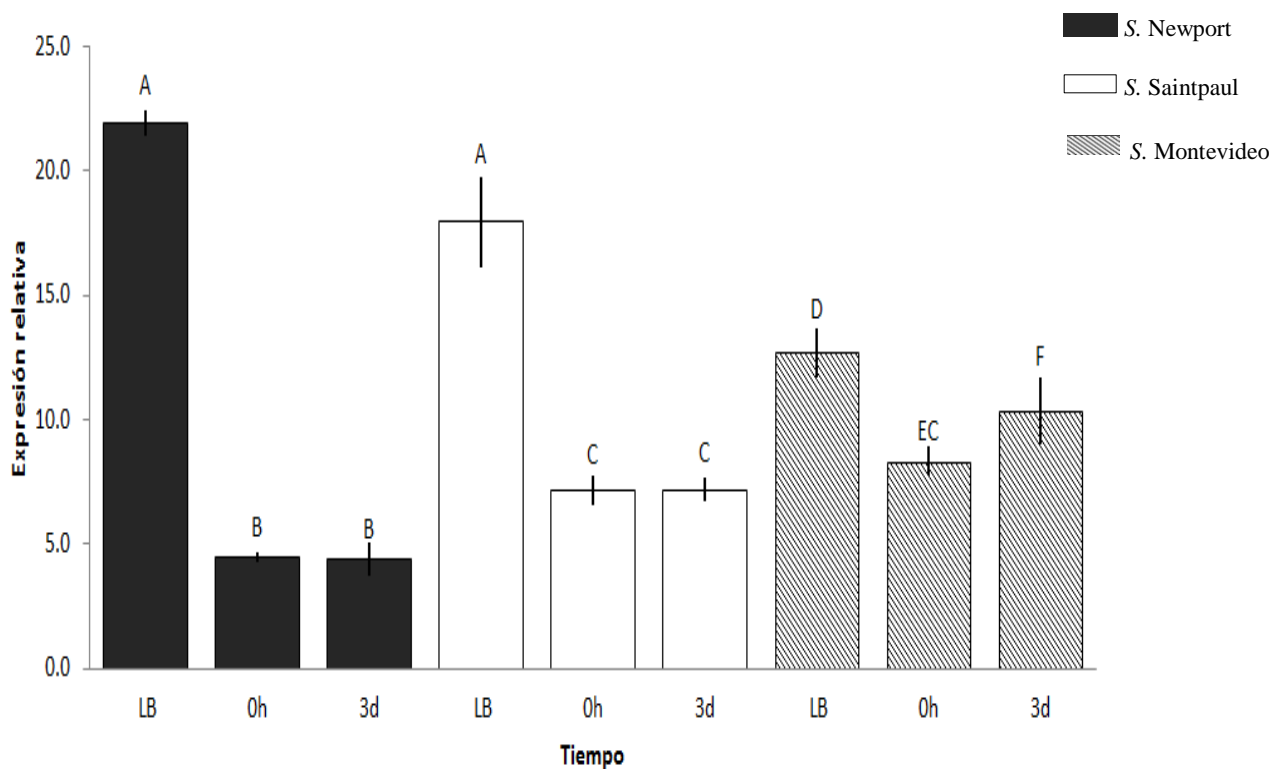


**Fig. 10** Expresión relativa de *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo internalizadas en tomate cherry. Las barras negras representan a Newport, barras blancas a Saintpaul y barras rayadas a Montevideo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos replicas técnicas cada uno. Letras iguales indican  $p > 0.05$  y letras diferentes indican  $p < 0.05$ . Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.

Al comparar la expresión relativa de *rpoS* observada en el cultivo de LB con la obtenida en el tomate, observamos una reducción de 5x de la expresión relativa del gen en Newport, 2.5x en Saintpaul y de aproximadamente 1.3x en Montevideo ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11). La reducción de la expresión relativa de *rpoS* en el fruto podría sugerir que el interior del tomate no representa un ambiente de estrés para *Salmonella*. Al respecto Yang y col. (2014) reportaron que la exposición a

largo plazo de *S. Enteritidis* a condiciones ácidas en fosfato trisódico a 37 °C/18 h no aumenta la expresión de RpoS y suponen que la inducción de RpoS sólo ocurre cuando el cambio de la composición lipídica de la membrana no puede proporcionar una protección suficiente contra las condiciones estresantes a las que son sometidas las bacterias (103).

Otra alternativa para explicar nuestros resultados podría ser que la bacteria entra en un estado viable no cultivable, tal y como suponemos que ocurre en el tiempo de 4 h y 6 d para *S. Newport*. Al respecto se ha reportado que RpoS influye en el tiempo de entrada en el estado viable no cultivable en *Salmonella* spp. donde las cepas de *Salmonella* con altos niveles de RpoS intracelular retrasan su entrada al estado viable no cultivable, mientras que las cepas de  $\Delta rpoS$  entran rápidamente en el estado viable no cultivable (48).



**Fig. 11 Expresión relativa de *rpoS* de *Salmonella* Newport, Saintpaul o Montevideo cultivadas en medio LB a 18 °C o internalizadas en tomate.** Las barras negras representan a Newport, barras blancas a Saintpaul y barras rayadas a Montevideo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos replicas técnicas cada uno. Letras iguales indican  $p > 0.05$  y letras diferentes indican  $p < 0.05$ . Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.



## 8. Conclusiones

Después de evaluar las dinámicas de internalización de *Salmonella* Newport, Saintpaul y Montevideo en tomates cherry durante 12 días, se demostró la capacidad de los serotipos evaluados para sobrevivir en el interior del fruto.

El tratamiento con 288 ppm de hipoclorito de sodio evitó la recuperación de las células viables cultivables en placa a partir del interior del tomate cherry.

Con base al análisis estadístico se observa que la transcripción del gen *rpoS in vitro* es constante en los aislamientos de en los tres serotipos evaluados y no se observa una regulación dependiente de la temperatura (37 y 18 °C).

Con base al análisis estadístico la transcripción de *rpoS* de las células recuperadas del interior del tomate cherry, muestra un comportamiento constante en *S.* Newport y *S.* Saintpaul pero variable en *S.* Montevideo en los tiempos evaluados (0 h y 3 d).

La transcripción de *rpoS* fue mayor *in vitro* (LB a 18 °C) que las células recuperadas del interior del tomate cherry en los tres serotipos evaluados.

## 9. Literatura citada

1. Alvarez, Ordóñez A, Broussolle Véronique, Colin Pierre, Nguyen Christophe, Prieto Miguel.2015. The adaptive response of bacterial food borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 213:99–109.
2. Andargie, Mebeaselassie, Jianxiong Li. 2016. *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant–pathogen interaction using rice false smut isolates of *Ustilaginoidea virens*. *Frontiers in Plant Science* 7:1–11.
3. Bartz, Jerry A, Hyun gyun Yuk, Michael J Mahovic, Benjamin R Warren, Aswathy Sreedharan, Keith R Schneider.2015. Internalization of *Salmonella enterica* by tomato fruit. *Food Control* 55:141–50.
4. Bennett, Barbara B.1998. Gastroenteritis. Medical update for psychiatrists 7579
5. Bennett, S D, K W Littrell, T A Hill, M Mahovic, C Barton Behraves. 2015. Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990 – 2010 : A recurring public health problem. *Epidemiology and Infection* 1352–59.
6. Beuchat, Larry R, David a Mann. 2008. Survival and growth of acid adapted and unadapted *Salmonella* in and on raw tomatoes as affected by variety, stage of ripeness, and storage temperature. *Journal of Food Protection* 71:1572–79,
7. Bilek, Seda Ersus, Fulya Turantá, 2013. Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology* 166:155–62.
8. Brilhante, São José, Jackline Freitas, Maria Cristina Dantas Vanetti. 2012. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control* 24:95–99.
9. Cabrera, Diaz Elisa, Barbosa Cárdenas Claudia M, Pérez Montan Julia A, González Aguilar Delia, Pacheco Gallardo Carlos, Barba Jeannette. Occurrence, serotype diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco state. *Journal of Food Protection* 76: 2004–10.

10. Carvajal, Molina Yasna. 2015. Evaluación de la expresión del gen *rpos* en *Piscirickettsia salmonis* en individuos susceptibles infectados experimentalmente. Tesis licenciatura. Santiago de Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias escuela de Ciencias Veterinarias.
11. *Codex Alimentarius*. 2013. Código de Prácticas de Higiene para las frutas y hortalizas frescas. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP> Fecha de consulta 15 Junio 2017.
12. Cox, J.M., A. Pavic. 2014. *Salmonella* Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology* 3:322–31.
13. Dawoud, Turki M, Zhaohao Shi, Young Min Kwon, Steven C Ricke. 2017. Chapter 7 Overview of salmonellosis and food-borne *Salmonella*: Historical and current perspectives, producing safe eggs. Elsevier Inc.
14. Dong, Tao, Charlie Joyce, and Herb E Schellhorn. 2008. The role of RpoS in bacterial adaptation. In *Bacterial Physiology*. Ed. by Walid, El sharoud, bacterial. Canada: Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 313–37.
15. Dodd, C. E R, and Timothy G. Aldsworth. 2002. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 74:189–94.
16. De Santos, Paulo Eduardo, Monte, Adelaide S. 2012. *Salmonella*: Classification, genetics and disease outbreaks. Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com.wdg.biblio.udg.mx:2048/ehost/detail/detail?vid=1&sid=dda5d45e-ff9b-4585-9b9268c28ade8353%40sessionmgr102&bdata=JnNpdGU9ZWwhvc3QtbGl2ZQ%3D%3D#AN=541076&db=e000xww>. Fecha de consulta 13 de Mayo 2017.
17. Dong, Tao, Herb E Schellhorn. 2010. Minireview role of RpoS in virulence of pathogens. 78:887–97.
18. Evangelopoulou, Grammato, Spyridon Kritas, Alexander Govaris, Angeliki R Burriel. 2013. Animal salmonellosis: A brief review of host adaptation and host specificity of *Salmonella* Spp. 6:703–9.

19. Figueroa, Ochoa, Inda Marcela, Antonio Verdugo Rodríguez.2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* Sp. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 47:25–42.
20. Fu, Jiaqi, Linlu Qi, Mo Hu, Yanhua Liu, Kaiwen Yu, Qian Liu. 2017. *Salmonella* proteomics under oxidative stress reveals coordinated regulation of antioxidant defense with iron metabolism and bacterial virulence. *Journal of Proteomics* 157:52–58.
21. Garcia, Ana victoria; Charrier, Amélie; Schikora, Adam; Bigeard Jean; Pateyron, Stephanie; de Tauiza -Moreau, Ludivine-Marie; Evrard, Alexandre; Mithofer Axel; Martin, Magniette Marie Laure; Vitlogeux, Payant Isabelle, Hirt, Heribert. 2014. *Salmonella enterica* flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-Triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 7:657–74.
22. Gautam, Dhiraj, Shefali Dobhal, Mark E. Payton, Jacqueline Fletcher y Li Maria Ma.2014. Surface survival and internalization of *Salmonella* through natural cracks on developing cantaloupe fruits alone or in the presence of the melon wilt pathogen *Erwinia Tracheiphila*. *PLoS One* 9.
23. Gomba, Annancietar, Lizyben Chidamba, Lise Korsten. 2016. Prevalence and serovar diversity of *Salmonella* spp. in primary horticultural fruit production environments. *Food Control*, 69:13–19.
24. Graziani, C, C Losasso, I Luzzi, A Ricci, G Scavia, P Pasquali. 2017. Chapter 5 - *Salmonella*, foodborne diseases, Third Edition. Elsevier Inc.
25. Gu, Ganyu, Cevallos Cevallos Juan M., H C van Bruggen Ariena.2013. Ingress of *Salmonella enterica* Typhimurium into tomato leaves through hydathodes. *PLoS One* 8.
26. Gu, Ganyu, Hu Jiahuai, Cevallos Cevallos Juan M., Richardson Susanna M., Bartz Jerry A., Van Bruggen Ariena H C.2011. Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS One* 6.
27. Guo, Xuan, Marc W Van Iersel, Jinru Chen, E Robert, Larry R Beuchat, Robert E Brackett.2002. Evidence of association of Salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3639–3643.

28. Ha, Ji-Hyoung, Ha Sang-Do.2010. Synergistic effects of ethanol and UV radiation to reduce levels of selected foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 73:556–61.
29. Han, Sanghyun, Shirley A. Micallef. 2016. Environmental metabolomics of the tomato plant surface provides insights on *Salmonella enterica* colonization. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 3131–42.
30. Han, Sanghyun, Shirley A. Micallef. 2014. *Salmonella* Newport and Typhimurium colonization of fruit differs from leaves in various tomato cultivars. *Journal of Food Protection* 77:1844–50.
31. Hernández, Reyes, Casandra, Schikora Adam. 2013. *Salmonella*, a cross-kingdom pathogen infecting humans and plants. *FEMS Microbiology Letters* 343:1–7.
32. Hengge, Aronis, Regine.2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 66: 373–95.
33. Hirsch, Matthew, and Thomas Elliott. 2005. Fis regulates transcriptional induction of RpoS in *Salmonella enterica*. 187:1568–80.
34. Hulya, Olmez. 2016. Foodborne pathogenic bacteria in fresh cut vegetables and fruits in sources and routes of pathogen contamination in fresh cut produce. *Elsevier* pp. 151–66.
35. Humphrey, T.2004. *Salmonella*, stress responses and food safety *Nature Reviews Microbiology* 2:504–9.
36. Ibanez, Ruiz, M, V Robbe-Saule, D Hermant, S Labrude, F Norel.2000. Identification of RpoS (sS)-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 182:5749–56.
37. Ijabadeniyi, Oluwatosin A, Amanda Minnaar, Elna M Buys.2011. Effect of attachment time followed by chlorine washing on the survival of inoculated *Listeria*. *Journal of Food Quality* 34:133–42.
38. Issenhuth, Jeanjean Sylvie, Roggentin Peter, Mikoleit Matthew, Guibourdenche Martine, De Pinna Elizabeth, Nair Satheesh , Fields Patricia I., Weill François-Xavier. 2014. Supplement 2008 e 2010 to the white e kauffmann e le minor. *Research in Microbiology*, 165 (2014), 526–30.

39. Iturriaga, Montserrat H., Eduardo F. Escartín.2010. Changes in the effectiveness of chlorine treatments during colonization of *Salmonella* Montevideo on tomatoes. *Journal of Food Safety* 30:300–306.
40. Ivey, Melanie L Lewis, Xiulan Xu, Sally A Miller.2014. Leveraging management strategies for seedborne plant diseases to reduce *Salmonella enterica* serovar Typhimurium incidence on tomato seed and seedlings. *Journal of Food Protection* 77:359–64.
41. James, D.L., J. Jaczynski, K.E. Matak.2010. Electron beam irradiation on nalidixic acid resistant *Salmonella* Montevideo in cooked tomato puree of various pH values. *Journal of Food Safety* 1.
42. Jiang, Yunbin, Xuetong Fan, Xihong Li, Joshua B. Gurtler, Sudarsan Mukhopadhyay, Tony Jin.2017. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium and quality preservation of cherry tomatoes by in-package aerosolization of antimicrobials. *Food Control* 73:411– 20.
43. Jin, T., J. B. Gurtler.2012. Inactivation of *Salmonella* on tomato stem scars by edible chitosan and organic acid coatings. *Journal of Food Protection*75:1368–72.
44. Jones, Amy M., Adam Goodwill, Thomas Elliott.2006. Limited role for the DsrA and RprA regulatory RNAs in *rpoS* regulation in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 188:5077–88.
45. Kaspar, CW , Tamplin ML.1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2425–29.
46. Klontz, Karl C, Joshua C Klontz, Rajal K Mody, Robert M Hoekstra.2010. Analysis of tomato and jalapeño and serrano pepper imports into the United States from Mexico before and during a national outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections in 2008. *Journal of Food Protection* 73:1967–74.
47. Kusumoto, Akiko, Hiroshi Asakura, Keiko Kawamoto.2012. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiology and Immunology* 56:228–37.

48. Kusumoto, Akiko, Masayuki Miyashita, Keiko Kawamoto.2013. Deletion in the C terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella enterica* into a viable but non culturable state *Research in Microbiology* 164:335–41.
49. Lee, Jen Jie, Ying Chen Wu, Chih Jung Kuo, Shih Ling Hsuan, Ter Hsin Chen. 2016. TolC is important for bacterial survival and oxidative stress response in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis in an acidic environment. *Veterinary Microbiology* 193: 42–48.
50. Lévi-Meyrueis, Corinne, Véronique Monteil, Odile Sismeiro, Marie Agnès Dillies, Marc Monot, Bernd Jagla. 2014. Expanding the RpoS/  $\sigma^S$ -network by RNA sequencing and identification of *rpoS* controlled small RNAs in *Salmonella*. *PLoS One*, 9:1–12.
51. Li, Jie, Christopher C. Overall, Rudd C. Johnson, Marcus B. Jones, Jason E. McDermott, Fred Heffron. 2015. ChIP-Seq analysis of the  $\sigma^E$  regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals new genes implicated in heat shock and oxidative stress response. *PLoS One* 10: 1–15.
52. Li, Laam, Nilmini Mendis, Hana Trigui, James D Oliver, P Sebastien. 2014. The importance of the viable but non culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology* 5:1–20.
53. Litrup, Eva, Mia Torpdahl, Burkhard Malorny, Stephan Huehn, Morten Helms, Henrik Christensen.2010. DNA microarray analysis of *Salmonella* serotype Typhimurium strains causing different symptoms of disease. *BMC Microbiology* 10:96.
54. Lu, Yingjian, Changqing Wu.2010. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. *Journal of Food Protection* 73:2270–75.
55. Marvasi, Massimiliano, Jason T. Noel, Andrée S. George, Marcelo A. Farias, Keith T. Jenkins, George Hochmuth.2014. Ethylene signalling affects susceptibility of tomatoes to *Salmonella*. *Microbial Biotechnology* 7:545–55.
56. McMeechan, Alisdair, Mark Roberts, Tristan A. Cogan, Frieda Jørgensen, Andrew Stevenson, Claire Lewis.2007. Role of the alternative sigma factors  $\sigma^E$  and  $\sigma^S$  in survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock. *Microbiology* 153:263–69.

57. Meng, Fanhong, Craig Altier, and Gregory B. Martin.2013. *Salmonella* colonization activates the plant immune system and benefits from association with plant pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 15:2418–30.
58. Michanie, Silvia.2015. *Salmonella* en alimentos cambio de paradigma. Alimentación latinoamericana, Buenos Aires. 319:1–17.
59. Miles, Jacquelyn M, Susan S Sumner, Renee R Boyer, Robert C Williams, Joyce G Latimer, Julie M McKinney. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* serovar Montevideo into greenhouse tomato plants through contaminated irrigation water or seed stock. *Journal of Food Protection* 72:849–52.
60. Moorhead, Robert.2002.William budd and typhoid fever. *Journal of the royal society of medicine* 95:561–64.
61. Mukhopadhyay, S., D. Ukuku, X. Fan,V. K. Juneja.2013. Efficacy of integrated treatment of UV light and low dose gamma irradiation on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on grape tomatoes. *Journal of Food Science* 78.
62. Mukhopadhyay, Sudarsan,Raghupathy Ramaswamy.2012. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A Review. *Food Research International* 45:666–77.
63. Noel, Jason T., Nabil Arrach, Ali Alagely, Michael McClelland, and Max Teplitski.2010. Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology. *PLoS One* 5.
64. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Capítulo 2.9.9. in Manual de la OIE sobre snimales terrestres. pp. 1–18.
65. Ojito, Ramos, Katia, and Orelvis Portal. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología Vegetal* 10:3–19.
66. Orozco R., L, Montserrat H Iturriaga, Mark L Tamplin, Pina M Fratamico, Jeffrey E Call, John B Luchansky. 2008. Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. *Journal of Food Protection* 71:676–83.



67. Ottesen, Andrea R., Gonzalez Antonio, Bell Rebecca, Arce Caroline, Rideout Steven, Allard Marc.2013. Coenriching microflora associated with culture based methods to detect *Salmonella* from tomato phyllosphere. *PLoS One* 8.
68. Panutdaporn, N., K. Kawamoto, H. Asakura, S. I. Makino. 2006. Resuscitation of the viable but non culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. *International Journal of Food Microbiology* 106:241–47.
69. Parker, Thomas A, Kailiang Jia. 2017. Chapter 15 intestinal autophagy defends against *Salmonella* infection. Elsevier Inc. 11:291–302.
70. Percival, Steven L, David W Williams.2014. Chapter ten *Salmonella*. Elsevier Ltd. 209– 22.
71. Pereira, García Annia, Hernández Gómez Antihus, Yelene García Taín.2008. Establecimiento del período óptimo de almacenamiento para guayaba, mandarina y tomate guardados a temperatura ambiente. Establishing of the optimal storage periods for guava, mandarin and tomato stored at room temperature. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 17:77–81.
72. Pieterse, Corné M J, Antonio Leon-reyes, Sjoerd Van Der Ent, Saskia C M Van Wees.2009. Networking by small molecule hormones in plant immunity. 5:308–16.
73. QUIAGEN. 2014. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and cell culture supernatants pp.7.
74. Ritter, Ana Carolina, Donatella Bacciu, Lucélia Santi, Walter Orlando Beys da Silva, Marilene Henning Vainstein, Salvatore Rubino.2012. Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in southern Brazil. *Journal of Food Protection* 75:437–42.
75. Rodríguez García Ofelia Ma., Márquez González Mayra y Hernández Mireles Corina. *Salmonella*. En riesgos asociados al consumo de alimentos, ed. by Anguiano Gómez María de la Luz y Vázquez Paulino Olga Deli Torres Vitela Refugio Ma., Orozco Hernández Laura Ofelia, Primera ed (Guadalajara Jal.: 2013, 2013), pp. 51–71.

76. Rowan, Neil J. 2004. Viable but non culturable forms of food and waterborne bacteria: *Quo Vadis. Trends in Food Science and Technology* 15:462–67.
77. Rulli, Samuel. 2012. QUIAGEN. Introduction to real time quantitative PCR (qPCR). Disponible en: <http://sabiosciences.com/manuals/IntrotoqPCR.pdf>. Fecha de consulta 20 de junio 2017.
78. Ryan, Michael P, Jean O Dwyer, and Catherine C Adley.2017. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *Hindawi BioMed research international* 2017.
79. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Monografía del jitomate. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>. Fecha de consulta 14 de Julio, 2017.
80. Salazar, Joelle K., Kaiping Deng, Mary Lou Tortorello, Maria T. Brandl, Hui Wang, Wei Zhang. 2013. Genes *ycfR*, *sirA* and *yigG* contribute to the surface attachment of *Salmonella enterica* Typhimurium and Saintpaul to fresh produce. *PLoS One*, 8.
81. Sánchez, Jiménez Margot Miryan, Castro Nora María Cardona.2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología* 7 1:22–29.
82. Sánchez, Porras Héctor Rodrigo. 2015. Evaluación de la transcripción y traducción de factores de patogenicidad de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en tomates (*Solanum Lycopersicum*) durante su almacenamiento en el transporte para su exportación. Tesis de maestría. Ocotlán Jal. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de la Ciénega.
83. Saroj, Sunil, R. Shashidhar, Jayant Bandekar.2009. Gamma radiation used as hygienization technique for foods does not induce viable but non culturable state (VBNC) in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Current Microbiology* 59:420–24.

84. Schikora, Adam, Alessandro Carreri, Emmanuelle Charpentier, Heribert Hirt. 2008. The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic Lifestyle. *PLoS One* 3.
85. SSA. Secretaria de Salud. Boletín epidemiológico. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>. Fecha de consulta 22 de Marzo 2017.
86. SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Buenas Prácticas Agrícolas Para frutas y hortalizas frescas. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/>. Fecha de consulta 11 de Julio 2017.
87. Shen, Shu, Ferric C. Fang. 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 152:75–81.
88. Shi, X., Z. Wu, A. Namvar, M. Kostrzynska, K. Dunfield, and K. Warriner. 2009. Microbial population profiles of the microflora associated with pre and postharvest tomatoes contaminated with *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Montevideo. *Journal of Applied Microbiology* 107:329–38.
89. Shirron, Natali, and Sima Yaron. 2011. Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One* 6.
90. Spector, Michael P., and William J. Kenyon. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* 45:455–81.
91. Steenackers, Hans, Kim Hermans, Jos Vanderleyden, Sigrid C J De Keersmaecker. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International* 45:502–31.
92. Swart, A Leoni, Michael Hensel. 2012. Interactions of *Salmonella enterica* with dendritic cells. 3:660–67.
93. Tamagnini, Lucía M, María G Paraje. 2015. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? *Revista facultad de ciencias exactas, físicas y naturales* 2:2013–16.

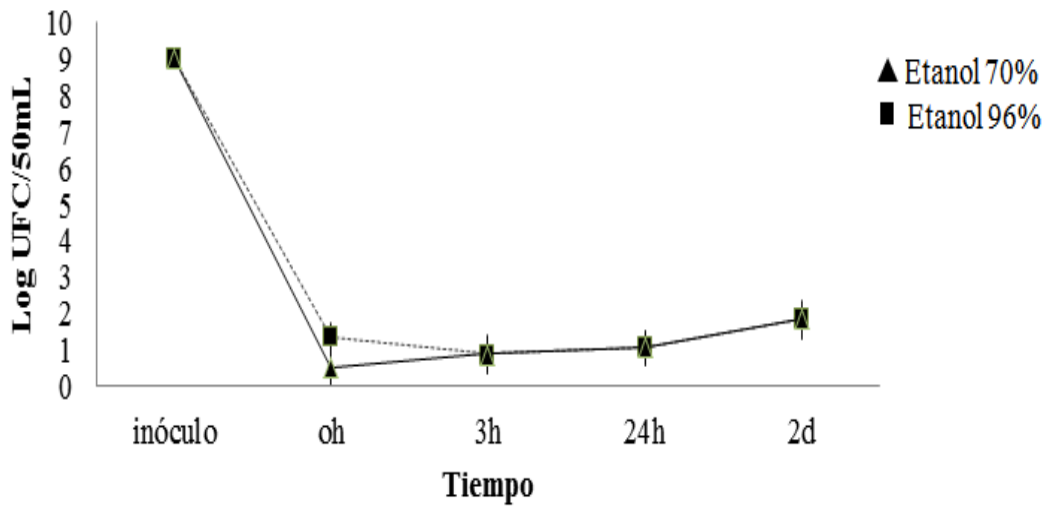
94. Torres, Armendáriz Vera, Manjarrez, Domínguez Carlos Baudel.2015. Interactions between *Escherichia coli* O157: H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms? *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:64–84.
95. Urooj Fatima, Muthappa Senthil-Kumar.2015. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science* 6:750.
96. Wade, W. N., L. R. Beuchat. 2003. Metabiosis of proteolytic moulds and *Salmonella* in raw, ripe tomatoes. *Journal of Applied Microbiology*. 95:437–50.
97. Wang, Haiqiang, Elliot T Ryser. 2014. Efficacy of various sanitizers against *Salmonella* during simulated commercial packing of tomatoes. *Journal of Food Protection* 77:1868–75.
98. Wang, Hua, Vikas S. Gill, Kari A. Irvin, Mindi Byrd, Cathryn M. Bolger, Jie Zheng. 2012. Recovery of *Salmonella* from internally and externally contaminated whole tomatoes using several different sample preparation procedures. *Journal of AOAC International* 95:1452–56.
99. Web, Estructura antigénica de *Salmonella*. Disponible en: [https://www.google.com.mx/search?q=estructura+antig%C3%A9nica+de+salmonella+sp+p.&client=Firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjTsbKXprfVAhXKfCYKHZCrAKA\\_Q\\_AUICigB&biw=1366&bih=635#imgrc=m7iUqJYXk\\_kL\\_M](https://www.google.com.mx/search?q=estructura+antig%C3%A9nica+de+salmonella+sp+p.&client=Firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjTsbKXprfVAhXKfCYKHZCrAKA_Q_AUICigB&biw=1366&bih=635#imgrc=m7iUqJYXk_kL_M): Fecha de consulta 10 Julio 2017.
100. Wiedemann, Agnés, Isabelle Virlogeux-Payant, Anne Marie Chaussé, Adam Schikora, Philippe Velge.2015. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in Microbiology* 6:1–19.
101. Xia, Xiaodong, Yaguang Luo, Yang Yang, Bryan Vinyard, Keith Schneider.2012. Effects of tomato variety, temperature differential, and post–stem removal time on internalization of *Salmonella enterica* serovar Thompson in tomatoes. *Journal of Food Protection* 75:297–303.
102. Xiao, Xing-long, Cong Tian, Yi-gang Yu, Hui Wu.2013. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. *Canadian Journal of Microbiology* 59:157–63.

103. Yang, Yishan, Mellissa Irlianti Kadim, Wei Jie Khoo, Qianwang Zheng, Magdiel Ingrid Setyawati, Yu Jin Shin. 2014. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella* Enteritidis cells adapted to lactic acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *International Journal of Food Microbiology* 191:24–31.
104. Yang, Yishan, Wei Jie Khoo, Qianwang Zheng, Hyun Jung Chung, Hyun Gyun Yuk. 2014. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *International Journal of Food Microbiology* 172:102–9.
105. Yaron, Sima, Ute Römling. 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology* 7:496–516.
106. Yonairo, B, R Leonel. 2015. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. Salmonelose, zoonose dos pássaros e uma patogênese muito particular. *Revista electronica de veterinaria* 16:1.
107. Yun, Juan, Xuotong Fan, Xihong Li, Tony Z. Jin, Xiaoyu Jia, James P. Mattheis. 2015. Natural surface coating to inactivate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and maintain quality of cherry tomatoes. *International Journal of Food Microbiology* 193:59–67.
108. Zeng, Bin, Guozhong Zhao, Xiaohong Cao, Zhen Yang, Chunling Wang, Lihua Hou. 2013. Formation and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella* Typhi. *BioMed Research International* 2013.
109. Zheng, Jie, Sarah Allard, Sara Reynolds, Patricia Millner, Gabriela Arce, Robert J. Blodgett. 2013. Colonization and internalization of *Salmonella* Enterica in tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79:2494–2502.
110. Zhou, B., Y. Luo, X. Nou, Y. Yang, Y. Wu, Q. Wang. 2014. Effects of postharvest handling conditions on internalization and growth of *Salmonella* Enterica in tomatoes. *Journal of Food Protection* 77:365–70.

# **ANEXOS**

## **Anexo A. Evaluación de la descontaminación de la superficie de los tomates cherry en etanol al 70 ó 96 %.**

Para asegurar que sólo se recuperaban células internalizadas del fruto se realizaron experimentos preliminares encaminados a determinar el método apropiado para la desinfección de la superficie del fruto. El procedimiento empleado consistió en sumergir el fruto en una solución de etanol al 70 o al 96 % durante 2 min, dejándolo secar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente los tomates se sumergieron en 50 mL de agua peptonada amortiguada (BPW) contenidos en una bolsa estéril para eliminar residuos de etanol y para someterlos a un baño de ultrasonido durante 1 min para desprender las células fuertemente adheridas de la superficie del tomate. De los 50 mL de BPW se tomó una alícuota de 1 mL para realizar recuentos bacterianos en placa, el mililitro se distribuyó en cajas de ASTEL-Rif, las cuales se incubaron a 37 °C/24 h y se cuantificaron las colonias de cada placa reportándose como Log UFC/50 mL. Los resultados obtenidos fueron analizadas estadísticamente por una prueba de varianza simple (ANOVA) sin observarse una diferencia estadística significativa entre las concentraciones de etanol evaluadas ( $p > 0.05$ ) (Fig. I). Ha y Ha (2010) en su investigación evaluaron diferentes concentraciones de etanol *in vitro* para reducir la carga microbiana y observaron que la concentración de etanol utilizada en la descontaminación es proporcional a la reducción de la carga microbiana (28). Por lo anterior, decidimos utilizar etanol al 96 % adicionando un tratamiento con ultrasonido para descontaminar con mayor eficacia la superficie de los tomates, ya que se ha reportado que la combinación de ultrasonido con algunos métodos de descontaminación potencializa la inactivación microbiana en la superficie de productos hortofrutícolas (7, 8, 62).



**Fig. I Evaluación de la descontaminación de la superficie del tomate cherry con etanol al 70 ó 96 %.** Los triángulos representan las células recuperadas de la higienización con etanol al 70 % y los cuadros representan las células recuperadas de la descontaminación con etanol al 96 % en la superficie del tomate. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar, h: horas y d: días.



### **Anexo B.- Reactivos para la preparación de Luria de Bertani (LB)**

Para la preparación de 1 L de caldo LB se homogenizan los reactivos del cuadro I, una vez homogenizados se ajusta el pH a 7.5. Si el pH es menor al mencionado se le agrega hidróxido de sodio 1 normal y si es mayor ácido clorhídrico 1 normal.

**Cuadro I.- Medios de cultivo para la preparación de caldo LB**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Triptona	10
Cloruro de sodio	10
Extracto de levadura	5
Agua	cbp 1 L

## **Anexo C.- Preparación de rifampicina**

Materiales para la preparación de agar soya tripticaseína con 0.1 g/L de rifampicina

- Tubo estéril de 10 mL incubado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\approx 1\text{h}$
- Rifampicina
- Metanol
- Pipeta de 2 mL estéril
- Agar soya tripticaseína estéril

Procedimiento:

Disolver 0.1 g de rifampicina por cada 5 mL de metanol en un tubo estéril, homogenizar, proteger el tubo con la dilución de la luz y almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Colocar por cada 200 mL de agar soya tripticaseína (esterilizado y listo para vaciar en placa) 1 mL de la dilución de rifampicina. Homogenizar el agar con la rifampicina y vaciar en placa.

## **Anexo D.- Preparación del inóculo con hipoclorito de sodio**

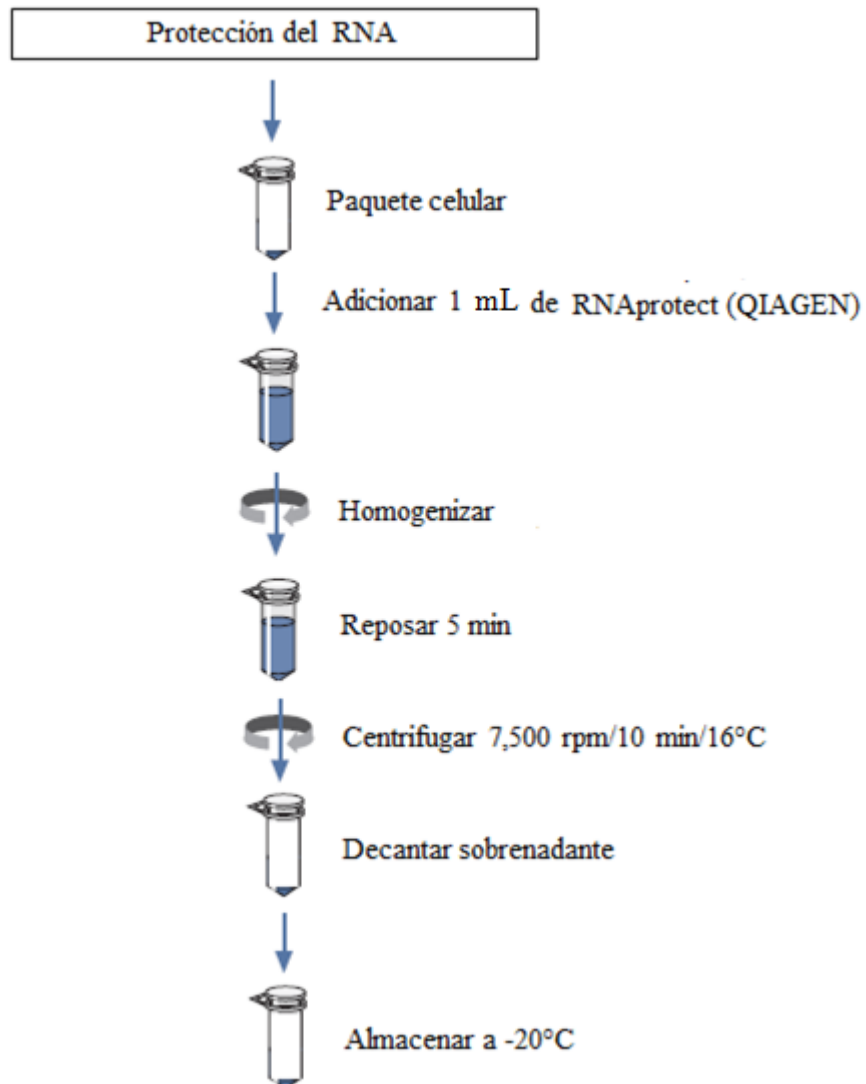
Para la inoculación de 22 tomates con 288 ppm de hipoclorito de sodio se requieren los siguientes materiales:

- Paquete celular bacteriano
- Agua destilada estéril
- Tiras para medir pH
- Tiras para medir ppm de hipoclorito de sodio
- Hipoclorito de sodio comercial (7 g de hipoclorito de sodio por cada litro)

Procedimiento:

Enjuagar dos veces el paquete celular con 35 mL de agua destilada estéril (ADE) centrifugar en cada enjuague a 6, 000 rpm/10 min/12 °C. Decantar el ADE y enjuagar el contenedor del inóculo con 200 mL de ADE, colocar el inóculo en una bolsa estéril, homogenizar el inóculo por el exterior de la bolsa manualmente. Tomar 2 mL de la suspensión bacteriana para colocarlo en un tubo estéril y reservar a 4 °C para realizar recuentos de la concentración del inóculo. Agregar al resto de la suspensión (198 mL) 1.340 mL de hipoclorito de sodio comercial, homogenizar y medir pH con tiras reactivas (Civeq), ajustar el pH a 6 con la adición de 40 µL de ácido clorhídrico (1 normal). Cuantificar las ppm de cloruro de sodio mediante tiras reactivas (Quantab<sup>®</sup>). Una vez obtenida la concentración colocar los 22 tomates dentro de la bolsa e incubar a 12 °C/ 30 min para realizar experimentos con hipoclorito de sodio.

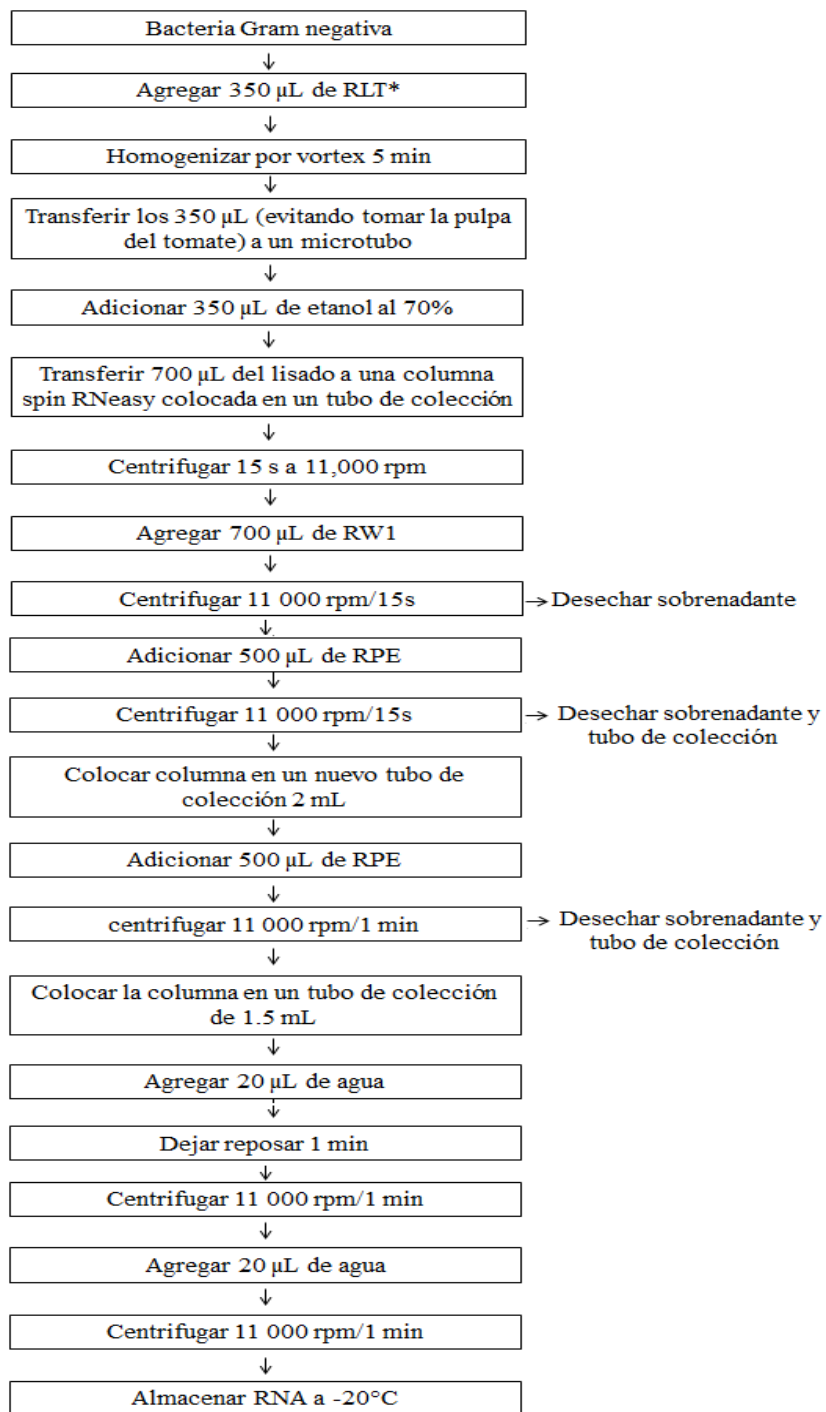
## Anexo E.- Protección del RNA del paquete celular con RNAProtect (QIAGEN)



Tomado de RNeasy® Mini Handbook (2006) (73).

## Anexo F.- Protocolo para la purificación del RNA con el kit RNeasy Mini kit (QUIAGEN)

Descontaminación previa de superficie de trabajo y pipetas con SDS al 20 %. Retirar SDS con agua destilada y etanol al 70 %



\*1mL de RLT + 10 µL de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

## **Anexo G.- Protocolo para el tratamiento de RNA**

Las cantidades y concentraciones de los reactivos para el tratamiento de RNA purificado con DNAsa RQ1 DNase (Promega) se muestran en el cuadro II. La mezcla se incuba 24 h/37 °C. Posterior al tiempo de incubación se adiciona 1 µL de solución Stop para detener la reacción. Se centrifuga 15 s/ 12 000 rpm y se incuba en un thermoblock 10 min/ 65 °C.

**Cuadro II.- Reactivos para el tratamiento de RNA purificado.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
RNA purificado	0.5 µg/µL	cbp para 0.5 µg/µL
Buffer de reacción	10X	2 µL
DNAsa RQ1	1U/µL	0.7 µL
Agua	cbp 20 µL	-

## **Anexo H.- Protocolo para PCR punto final**

Las cantidades y concentraciones de los reactivos para el PCR de punto final se realizaron con ~ 10 µg de DNA purificado de templado usando las cantidades que se muestra en el cuadro III

**Cuadro III.- Reactivos y volúmenes para un PCR punto final.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
Buffer	10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	20X	1.25 µL
dNTPs	100 mM	0.5 µL
Oligonucleótido a favor	25 µM	0.5 µL
Oligonucleótido en contra	25 µM	0.5 µL
DNA molde	10 µg	2.5 µL
DNA polimerasa	5U/µL	0.25 µL
Agua	cbp 25 µL	17 µL

## **Anexo I.- Protocolo para retrotranscripción con el Kit GoScript Reverse Transcription System (Promega)**

Descontaminación previa de superficie de trabajo y pipetas con SDS al 20 %. Retirar SDS con agua destilada y etanol al 70 %

1. En un microtubo de 1.5  $\mu\text{L}$  mezclar 0.05  $\mu\text{g}$  de RNA tratado y libre de DNA con 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Random Primers (mezcla de hibridación). Centrifugar 15s/12 000 rpm.
2. Calentar en un thermoblock 5min/70 °C
3. Enfriar en hielo 5 min
4. Centrifugar 10s/8 000 rpm
5. Almacenar en hielo hasta adicionar la mezcla de retrotranscripción.
6. Preparar la mezcla de la retrotranscripción. Mezclar los reactivos en hielo y en el orden indicado del cuadro IV
7. Mezclar los 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la retrotranscripción (Cuadro IV) con los 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de hibridación.
8. Calentar en un termociclador 5 min/25 °C (alineamiento) y 1 h/42 °C (extensión)
9. Calentar en un termociclador 15 min/ 70 °C (Inactivar retrotranscriptasa)

**Cuadro IV.- Reactivos y volúmenes para el mix de retrotranscripción**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
Buffer	5X	4 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	1.2 $\mu\text{L}$
Mezcla de nucleótidos PCR	40 mM	1 $\mu\text{L}$
Inhibidor de ribonucleasas Recombinant Rnasin	20 U/ $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$
Retrotranscriptasa	160U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Agua	cbp 15 $\mu\text{L}$	7.3 $\mu\text{L}$



## **Anexo J.- Protocolo para PCR tiempo real**

Para una reacción de PCR tiempo real se utilizaron los reactivos y volúmenes del cuadro V. Temperatura óptima para la actividad de la enzima UNG 50 °C/2 min. Temperatura de activación de la polimerasa AmpliTaq Gold® 95 °C/10 min. Temperatura de desnaturalización 95 °C/ 15 s y 60° C/1 min temperatura de alineamiento y elongación. Durante 40 ciclos.

**Cuadro V.- Reactivos y volúmenes para una PCR tiempo real.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen</b>
TaqMan Gene Expression Master Mix	2X	7.5 µL
Ensayo Custom TaqMan rpoS-Fam	20 X	0.75 µL
Oligonucleótido a favor 16 S	50 µM	0.27 µL
Oligonucleótido en contra 16 S	50 µM	0.27 µL
Sonda 16 S-Vic	10 µM	0.38 µL
cDNA	1000 ng/µL	1 µg/µL
Agua	cbp 15 µL	-

