



ORIGINAL

## Persistencia, internalización y translocación de *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 y O105ab en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)



Rosa L. Ocaña de Jesús<sup>a</sup>, Ana T. Gutiérrez Ibáñez<sup>a,\*</sup>, Jesús R. Sánchez Pale<sup>a</sup>,  
María D. Mariezcurrena Berasain<sup>a</sup>, Carlos A. Eslava Campos<sup>b</sup> y Antonio Laguna Cerda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez / División de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM), Ciudad de México, México

Recibido el 2 de mayo de 2017; aceptado el 9 de diciembre de 2017

Disponible en Internet el 27 de abril de 2018

### PALABRAS CLAVE

Patógeno;  
Bacteria;  
*Escherichia coli*;  
Calidad

**Resumen** La presencia de bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, afecta la calidad e inocuidad de las hortalizas que se consumen en fresco y se relaciona con graves problemas de salud. El objetivo de este trabajo fue determinar si 3 cepas diferentes de *E. coli* tienen la capacidad de penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate. Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad «Cid») en condiciones de invernadero y se evaluaron 3 tratamientos, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (*E. coli* de cultivo de tomate [EcT] O157:H16), T3 (*E. coli* de cultivo de espinaca [EcH] EcH O105ab) y un testigo T4, con 100 plantas cada uno y 4 formas de inoculación: en el sustrato, en el tallo, en el peciolo y en el pedúnculo. Se realizaron muestreos en etapa vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica para cuantificar en placa las UFC/g y saber si las bacterias lograban moverse y recuperarse en la raíz, el tallo, la flor y el fruto. Los grupos filogenéticos a los que correspondieron las bacterias recuperadas fueron confirmados mediante pruebas bioquímicas, serotipificación y PCR. A los 120 días la recuperación de bacterias en la planta fue del 23% (*E. coli* O157:H7), 28% (EcT O157:H16) y 55% (EcH O105ab) con la inoculación al sustrato, mientras que con la inoculación por punción la recuperación fue (en igual orden) del 5%, 3% y 4% a los 30 días; del 37%, 35% y 30% a los 90 días; y del 42%, 39% y 13% a los 65 días. Las cepas utilizadas mostraron la capacidad de entrar en la planta de tomate y de permanecer en ella y transportarse hasta llegar al fruto, sin producir síntomas que indiquen su presencia. © 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [atarini@uaemex.mx](mailto:atarini@uaemex.mx) (A.T. Gutiérrez Ibáñez).

**KEYWORDS**

Pathogen;  
Bacterium;  
*Escherichia coli*;  
Quality

**Persistence, internalization and translocation of *Escherichia coli* O157:H7, O157:H16 and O105ab in plants and tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.)**

**Abstract** The presence of pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* affects the quality and safety of vegetables that are consumed fresh and is associated with serious health problems. The objective of this study was to determine if three different strains of *E. coli* can penetrate and remain in plants and tomato fruits. A completely randomized experimental design was followed for which a tomato crop ("Cid" variety) was established under greenhouse conditions and three treatments were evaluated, T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (*E. coli* from tomato cultivation [EcT] O157:H16), T3 (*E. coli* from spinach cultivation [EcH] O105ab) and a T4 control, with 100 plants each and four forms of inoculation: in the substrate, stem, petiole and the peduncle. Samples were carried out in vegetative stage, flowering, fruiting and physiological maturity to quantify in petri dish CFU/g and know if the bacteria managed to move around and recover in root, stem, flower and fruit. The phylogenetic groups that corresponded to the bacteria recovered were confirmed by biochemical tests, serotyping and PCR. At 120 days the recovery of bacteria in the plant was 23% (*E. coli* O157:H7), 28% (EcT O157:H16) and 55% (EcH O105ab) whit inoculation to the substrate while the inoculation by puncture the recovery was (in the same order) of 5%, 3%, and 4% at 30 days; 37%, 35% and 30% at 90 days; and 42%, 39% and 13% at 65 days. The strains submit the ability to enter the tomato plant and to stay in it and transported to the fruit, without producing that indicate their presence.

© 2018 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial por su alto aporte nutricional y versatilidad; es rico en vitaminas A y C y en flavonoides. Son muy reconocidas sus propiedades antioxidantes y contiene licopeno, responsable del color rojo característico del fruto. Algunos de estos compuestos se relacionan con la prevención de enfermedades como el cáncer, la inflamación del colon y el síndrome de degeneración macular, principal causa de ceguera en gente mayor de 65 años<sup>23</sup>.

Por consumirse en fresco, el tomate ha pasado a ser una fuente importante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)<sup>13</sup>. Se han documentado brotes relacionados con el consumo de productos en fresco, como es el caso de la espinaca, la lechuga, el tomate, los germinados y los rábanos, contaminados con *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Newport<sup>17</sup>. La contaminación se puede dar a lo largo de la cadena de producción; se reportan como principales fuentes el uso de agua de riego contaminada<sup>47</sup>, los abonos a base de estiércol no tratado adecuadamente<sup>15</sup>, el empleo de semillas contaminadas y los diferentes vectores, como animales, insectos y seres humanos<sup>34</sup>.

Uno de los principales microorganismos reportados causantes de enfermedades transmitidas por alimentos es *Escherichia coli*<sup>14</sup>, que forma parte de la microbiota intestinal de seres humanos, animales de sangre caliente y aves. Se distinguen 2 grupos según el tipo de infección que provocan: uno está constituido por cepas responsables de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis); el segundo grupo está compuesto por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales. Dichas infecciones pueden manifestarse

con distinto nivel de gravedad, desde una diarrea leve hasta una sintomatología similar a la del cólera, que puede desencadenar complicaciones como el síndrome urémico hemolítico<sup>12,16</sup>. El consumo de tomate, al igual que el de otras hortalizas, ha presentado diferentes alertas por la presencia de *E. coli* O157:H7<sup>22</sup>. Esa cepa ha mostrado capacidad de mantenerse por tiempo prolongado fuera de su hábitat natural, adaptándose a condiciones adversas. Algunas investigaciones demuestran que estos microorganismos tienen la capacidad de internalizarse en el producto, protegiéndose de los sanitizantes<sup>17</sup>. Existe un limitado conocimiento sobre el mecanismo por el cual las bacterias patógenas de humanos colonizan y sobreviven en estos productos<sup>7</sup>. El conocimiento de las vías de contaminación y la asociación entre patógenos transmitidos por alimentos y tejidos vegetales es importante para intervenir y garantizar la seguridad de los productos que se consumen en fresco. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad de 3 cepas diferentes de *Escherichia coli* para penetrar y permanecer en plantas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en el ciclo agrícola de mayo a septiembre de 2015, en condiciones de invernadero, en el municipio de Toluca de Lerdo, cuyas coordenadas geográficas corresponden a 19°17'32" Norte, 99°39'14" Oeste, con una altitud entre de 2.600 y 2.625 m s.n.m.<sup>20,21</sup>.

Los análisis fueron procesados en el Laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Laboratorio de

Serotipificación, Unidad de Investigación, Facultad de Medicina (UNAM).

## Material vegetal y cepas bacterianas

Se utilizaron plántulas variedad «Cid» tomate tipo saladette, que se obtuvieron en bandejas de germinación; estas fueron trasplantadas en macetas de 35 × 35 cm. Para la siembra se utilizó una mezcla de sustrato (40% suelo de campo, 40% lombricomposta y 20% tepojal), esterilizada previamente por medio de un método químico<sup>38</sup>. El riego se realizó diariamente con agua de pozo. Las plantas se conservaron en condiciones de invernadero durante todo el ciclo de producción. Antes de comenzar los ensayos se realizaron análisis microbiológicos de las plántulas, la mezcla de sustrato y el agua de riego (con evaluación periódica durante el desarrollo del cultivo) para descartar la presencia de organismos coliformes termotolerantes y de *E. coli*.

De las 3 cepas utilizadas 2 de ellas fueron de serogrupos desconocidos y se obtuvieron de cultivos de tomate de la región de Texcaltitlán<sup>33</sup> y de espinaca de la zona de Calimaya (ECh); la tercera fue una cepa del serogrupo O157:H7 (STEC) donada por el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las cepas fueron almacenadas en una solución agua-glicerol (50:50) a -20 °C. La elección de la cepa del serotipo O157:H7 obedeció a que dicha cepa estuvo relacionada con diferentes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos mínimamente procesados y logra crecer en ambientes no propicios. Las otras 2 cepas se eligieron por haberse recuperado con anterioridad de cultivo de tomate y hortalizas, dando así continuidad a un trabajo previo<sup>33</sup>.

## Caracterización fenogenotípica

Antes del establecimiento del experimento en invernadero las bacterias se reactivaron en caldo soya tripticaseína, se hicieron crecer en medios selectivos agar MacConkey (DIBICO), eosina azul de metileno (DIBICO) y agar cromogénico *E. coli* O157:H7 (DIBICO).

Para la confirmación de la identidad de las cepas bacterianas se realizó una serotipificación y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la serotipificación se siguió el método propuesto por Orskov et al.<sup>36</sup> y recientemente actualizado por Scheutz et al.<sup>41</sup>. Se usaron 181 antisueros somáticos y 56 anti-flagelares, que corresponden al esquema antigénico de *E. coli*<sup>24,46</sup>. Para la determinación del grupo filogenético se realizó la PCR descrita por Clermont et al.<sup>11</sup>, en función de la combinación de 3 marcadores de ADN (*chuA*, *yjaA* y el fragmento de ADN TspE.4C2), que clasifica a los aislados de *E. coli* dentro de uno de los 4 grupos filogenéticos establecidos: A, B1, B2 y D.

Para determinar la presencia de genes relacionados con cepas diarreogénicas (*E. coli* enterotoxigénica: *lt* y *st*; *E. coli* enterohemorrágica: *stx1* y *stx2*; *E. coli* enteropatogénica: *bfpA* y *eaeA*) se realizó la PCR múltiple descrita por López et al.<sup>25</sup>.

## Inoculación

Para la inoculación en el sustrato se emplearon 100 macetas por tratamiento con un volumen de 300 ml de suspensión bacteriana para cada cepa, con un promedio de  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml en agua peptonada bufferada (BPA) 0,1%. La solución se infiltró en el sustrato sin salpicar la planta. Este tratamiento (INC1) se realizó a los 7 días después del trasplante, con el objetivo de observar si las 3 cepas podían entrar y transportarse a las diferentes partes de la planta. A partir de esta inoculación se monitorizó durante los 120 días que duró el cultivo, incluyendo la etapa vegetativa, la floración, la fructificación y la madurez fisiológica.

En otros grupos de plantas se realizó la inoculación por medio de una punción en la etapa vegetativa en el tallo (INC2) o en la floración, en el pecíolo (INC3) o en la fructificación en el pedúnculo (INC4). Eso se hizo con la finalidad de determinar la capacidad de las 3 cepas de *E. coli* de perdurar en los tejidos internos del tomate, tras su ingreso a través de algún tipo de herida. Para realizar las punciones los cultivos se hicieron crecer en agar MacConkey (DIBICO), y con palillos previamente esterilizados se tomó aproximadamente  $1,8 \times 10^3$  UFC de masa bacteriana (dicho valor se obtuvo mediante recuento en placa).

## Toma de muestra

Se colectaron muestras de raíz (R), tallo (T) flor (Fl) y fruto (Fr) a los 30, 55, 90 y 120 días después del trasplante (ddt). Todo el material fue colectado y transportado de acuerdo con lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994<sup>31</sup>.

Para la preparación de las muestras se utilizó el método microbiológico indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994<sup>32</sup>. A 10 g de tejido se le adicionaron 90 ml de BPA 0,1% y se homogeneizó en una licuadora marca Osterizer. De la suspensión obtenida se tomó 1 ml para hacer siembra directa por duplicado en placas con agar bilis rojo violeta (BIOXON), las cuales se incubaron a una temperatura de  $45 \pm 2$  °C. Después de 24 h de incubación se realizó el recuento de colonias lactosa positivas, las cuales se estiraron en agar MacConkey (BIOXON), agar cromogénico O157:H7 (DIBICO) y agar de eosina y azul de metileno (BIOXON). Estas placas se incubaron a 35 °C por  $24 \pm 2$  h. Para confirmar la presencia de *E. coli* se tomó como referencia el crecimiento característico para cada medio selectivo y diferencial empleado<sup>28,49</sup>, así como los resultados de las pruebas IMViC (producción de indol, movilidad, prueba de rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons), complementadas con producción de ureasa y de ácido sulfhídrico y con descarboxilación de ornitina<sup>48</sup>. Dichos análisis se realizaron en las cepas antes de la inoculación y a las colonias recuperadas durante el experimento.

## Diseño experimental

Se siguió un diseño experimental completamente al azar, para lo cual se estableció un cultivo de tomate (variedad «Cid») en condiciones de invernadero, en el que se establecieron 3 tratamientos: T1 (*E. coli* O157:H7), T2 (EcT O157:H16), T3 (ECh O105ab), más el testigo T4, con

100 plantas por tratamiento. Se emplearon 4 diferentes formas de inoculación: al sustrato, al tallo, al peciolo y al pedúnculo. El muestreo implicó la colecta de 20 plantas en cada etapa fenológica para cuantificar en placa las UFC/g, y así para saber si las bacterias lograban moverse hacia la raíz, el tallo, la flor y el fruto.

Los resultados fueron evaluados por un ANDEVA bifactorial ( $p < 0,05$ ) para recuento en la raíz, el tallo, la flor y el fruto por cepa, forma de inoculación e interacción entre estas variables. Frente al hallazgo de diferencias significativas se aplicó una prueba de Tukey al 5% para identificar la cepa, la vía de inoculación y la interacción que llevaron a los mayores recuentos. Para ello se empleó el programa estadístico SAS (SAS, 2002)<sup>39</sup>.

## Resultados

### Caracterización bioquímica, serotipificación y PCR

Las pruebas bioquímicas confirmaron la recuperación de las cepas bacterianas inoculadas durante todas las etapas fenológicas (anexo 1 en material suplementario).

La serotipificación agrupó a las cepas bacterianas en O157:H7, O157:H16 (EcT) y O105ab (EcH), todas flagelares.

Las reacciones de PCR para identificar los grupos filogenéticos amplificaron bandas de 279, 211 y 152 pb, lo que clasificó a las cepas O157:H7 y EcT (O157:H16) en el grupo filogenético D, perteneciente a las cepas diarregénicas, mientras que la cepa EcH (O105ab) se ubicó en el grupo A, de las no diarregénicas. Con la PCR múltiple se observaron bandas de 150 pb (*stx1*), 255 pb (*stx2*) y 384 pb (*eaeA*), de acuerdo con lo esperado para las cepas O157:H7.

Estos análisis fenogenotípicos tuvieron la finalidad de confirmar que las bacterias recuperadas eran las mismas que las inoculadas.

No se encontraron microorganismos coliformes termotolerantes ni *E. coli* en las plántulas de tomate ni en el sustrato antes del experimento, tampoco en el agua de riego durante todo el desarrollo del cultivo.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para todas las variables analizadas: cepa, método de inoculación e interacción. Por eso se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias, de acuerdo con el criterio de Tukey.

De las 4 formas de inoculación evaluadas la que llevó a la mayor tasa de recuperación fue la realizada en el sustrato, donde los valores más elevados se registraron en R y T. Para las punciones, en cambio, las tasas de recuperación más altas se observaron cuando el inóculo se aplicó en el peciolo y en el pedúnculo (tabla 1).

Las 3 cepas de *E. coli* inoculadas se recuperaron durante todo el ciclo, con diferencias según el órgano de la planta inoculado (tabla 2). Para el grupo testigo en todos los casos no existió presencia de bacterias.

### Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación en el sustrato

La inoculación de *E. coli* O157:H7 en el sustrato permitió la recuperación de dicha cepa de R, T, Fl y Fr y la respuesta fue similar en cada etapa fenológica (vegetativa, floración, fructificación y madurez fisiológica). Se observó

**Tabla 1** Recuento de *Escherichia coli* en distintas etapas del cultivo de tomate

	Etapa vegetativa (30 ddt)			
	Raíz (UFC/g)		Tallo (UFC/g)	
INC1	639,30a		197,51a	
INC2	15,95b		156,61b	
	Etapa floración (55 ddt)			
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	
INC1	1183,48a	483,86a	49,90b	
INC2	41,66b	56,13c	29,63c	
INC3	12,06c	81,01b	123,40a	
	Etapa fructificación (90 ddt)			
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	Fruto (UFC/g)
INC1	888,51a	184,13a	42,91b	14,53b
INC2	30,31b	56,61b	22,58c	18,31a
INC3	24,31c	52,23c	87,35a	11,90c
INC4	13,36d	23,16d	3,55d	6,65d
	Etapa madurez fisiológica (120 ddt)			
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	Fruto (UFC/g)
INC1	700,01a	146,83a	35,66b	10,60b
INC2	31,63b	43,95c	18,416c	10,166b
INC3	9,567c	105,25b	60,15a	20,90a
INC4	9,28c	15,31d	4,81d	2,01c

Medias seguidas de las mismas letras señalan ausencia de diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

INC1: inoculación al sustrato; INC2: inoculación por punción al tallo; INC3: inoculación por punción al peciolo; INC4: inoculación por punción al pedúnculo; ddt: días después del trasplante.

una disminución de las UFC recuperadas con respecto a la cantidad inoculada en el sustrato. Las bacterias permanecieron detectables y cultivables sin necesitar enriquecimiento hasta el último muestreo. *E. coli* O157:H7 logró permanecer en los diferentes tejidos de la planta hasta 120 días, con una disminución de la densidad a lo largo del ciclo.

La cepa EcT (*E. coli* de cultivo de tomate) se recuperó de R y T a los 30 ddt; sin embargo, a los 55 ddt se observó un notorio incremento y se recuperó de R, T y Fl, a ello siguió un decremento hacia los 90 ddt. En las determinaciones subsiguientes se recuperaron de Fl y Fr; a los 120 ddt existió recuperación de Fr, lo que demuestra que la bacteria inoculada al sustrato logró internalizar y permanecer en la planta y en el fruto.

La cepa EcH (*E. coli* de cultivo de espinaca), aparentemente, se movilizó y mostró un incremento a los 55 ddt. Por otro lado, a los 90 ddt se registró un decremento de la población bacteriana.

### Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación por punción en el tallo

Con las 3 cepas de *E. coli* inoculadas al tallo se observó en la parte aérea de la planta mayor población en la etapa

**Tabla 2** Recuento de 3 cepas de *Escherichia coli* en distintas etapas del cultivo de tomate. Datos por cepa

Etapa vegetativa (30 ddt)				
	Raíz (UFC/g)		Tallo (UFC/g)	
C1	303,07a		152,98 a	
C2	103,95b		57,575b	
C3	84,41c		55,03c	
Etapa floración (55 ddt)				
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	
C1	270,35b	149,11b	32,06b	
C2	257,56c	197,37a	95,17a	
C3	400,00a	119,27c	24,96c	
Etapa fructificación (90 ddt)				
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	Fruto (UFC/g)
C1	213,85b	62,28c	38,60b	17,35a
C2	187,85c	75,01b	63,11a	15,12b
C3	315,68a	99,81a	15,58c	6,07c
Etapa madurez fisiológica (120 ddt)				
	Raíz (UFC/g)	Tallo (UFC/g)	Flor (UFC/g)	Fruto (UFC/g)
C1	136,225b	61,6750c	40,3625a	19,7750a
C2	136,963b	84,6375b	39,3625a	8,5250b
C3	289,688a	87,20a	9,5625b	4,4625c

Medias seguidas de las mismas letras señalan ausencia de diferencias significativas por test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

C1: *E. coli* O157:H7; C2: *E. coli* O157:H16; C3: *E. coli* O105ab; ddt: días después del trasplante.

vegetativa y menor en cosecha. De forma contraria, en la R hubo mayor carga bacteriana en cosecha. Cuando las cepas fueron inoculadas durante la etapa vegetativa permanecieron en mayor cantidad en el tejido inoculado, y por las UFC recuperadas se puede observar que el movimiento fue basípeto y acrópeto, con una sobrevivencia de 90 días.

### Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de la inoculación por punción en el peciolo

Se detectó incremento en el número de *E. coli* O157:H7 en Fl y Fr, no así en T y R. Asimismo, existió mayor recuperación de EcT en las flores. La población bacteriana se redujo en Fr y T, mientras que en R y Fl los valores fueron diversos.

Se notó una menor recuperación de EcH (*E. coli* O105ab) en Fl, R y T. De las 3 cepas existió mayor recuperación de colonias en Fl, mientras que para Fr los valores fueron similares entre etapas fenológicas.

### Persistencia y recuento de *E. coli* a partir de inoculación por punción en el pedúnculo

De la etapa de fructificación a la cosecha los recuentos de *E. coli* O157:H7 se incrementaron en Fl y Fr, mientras que en R y T disminuyeron. La mayor recuperación de UFC se obtuvo del T. La recuperación de EcT de una etapa a otra

disminuyó en R, T y Fr. Únicamente en la Fl existió poco incremento, mientras que la mayor recuperación se obtuvo del T. En relación con las plantas inoculadas con EcH se notó una disminución en la recuperación de la bacteria en R, T y Fr; solo en la Fl se mantuvo la cantidad de UFC recuperadas.

### Respuesta de cepas por método de inoculación

En la etapa vegetativa del tomate fue la inoculación al sustrato con la cepa O157:H7 la que llevó a la mayor recuperación de UFC, mientras que fue la inoculación por medio de punción en el tallo con las cepas de los serotipos O105ab y O157:H7 las que llevaron a los recuentos más altos en R y T, respectivamente (tabla 3).

Para el muestreo realizado en la etapa de floración la cepa que se recuperó en mayor número con la inoculación al sustrato y por punción en el tallo fue la O105ab y de la R, mientras que del T y la Fl fue la cepa O157:H16. Con la inoculación por punción en el peciolo el serotipo con mayor recuperación en la R fue el O157:H7, y en el T y la Fl fue el O157:H16 (tabla 3).

Hacia el muestreo realizado a los 90 días, con la inoculación al sustrato la mayor recuperación de UFC a partir de R y T se obtuvo con la cepa O105ab, en Fl con la cepa O157:H16 y en Fr con la cepa O157:H7. Por otra parte, tras la inoculación por punción al tallo la cepa O105ab fue la que se recuperó en mayor número en la R, mientras que la O157:H16 arrojó los recuentos más altos en las demás partes de la planta. La cepa que se asoció con recuentos más altos en R, T y Fr en la inoculación al peciolo fue la O157:H7, mientras que, en la Fl, el valor más alto fue para la cepa O105ab. Cuando la inoculación se hizo por punción en el pedúnculo la cepa O157:H7 tuvo mayor recuperación en R, Fl y Fr, y en el T tuvo mayor recuperación la O105ab (tabla 3).

Hacia los 120 días los recuentos más altos en R y T correspondieron a la cepa O105ab, mientras que los más altos en Fl y Fr fueron los de la O157:H7. Tras la inoculación al tallo, en R el valor de UFC más marcado lo mostró la cepa O105ab, pero en T, Fl y Fr la O157:H16. Con la inoculación al peciolo la cepa que arrojó recuentos mayores fue la O157:H7. Con la inoculación al pedúnculo, la cepa hallada en mayor número en R fue la O157:H16, en T fue la O105ab y en Fl y Fr fue la O157:H7 (tabla 3).

### Discusión

La recuperación de las 3 cepas de *E. coli* indica la capacidad de estas para ingresar, permanecer y moverse a través de los órganos de la planta y sobrevivir a lo largo de las etapas fenológicas del cultivo. Como factible punto de entrada de esta bacteria en las plantas se identifica a la raíz, que es la principal vía de absorción de alimentos y agua<sup>29</sup>. Existen reportes que señalan que en las raíces las bacterias enteropatógenas pueden tener mayor acceso a los nutrientes que en otros sitios, puesto que las uniones de la raíz son sitios que liberan exudados y absorben nutrientes, lo que las convierte en puertas de entrada para que las bacterias inicien el proceso de internalización<sup>26</sup>. Otros trabajos señalan que el ingreso de estas bacterias a la planta puede obedecer a la presencia de heridas<sup>18</sup> o a procesos de endobiosis<sup>5,10,45</sup>.

**Tabla 3** ANDEVA multifactorial ( $X \pm SD$ ) de los recuentos de *Escherichia coli* en diferentes estados fenológicos y distintas partes de la planta (cepa  $\times$  método de inoculación)

Etapa vegetativa (30 ddt)					
Inoculación	Cepa	Raíz		Tallo	
		$(X \pm SD)$		$(X \pm SD)$	
I1	C1	1200,30 $\pm$ 74,26		512,35 $\pm$ 17,88	
I1	C2	400,40 $\pm$ 30,41		50,30 $\pm$ 5,91	
I1	C3	317,20 $\pm$ 5,58		29,90 $\pm$ 4,36	
I2	C1	12 $\pm$ 1,97		99,60 $\pm$ 6,62	
I2	C2	15,40 $\pm$ 2,32		180 $\pm$ 4,29	
I2	C3	20,45 $\pm$ 2,21		190,25 $\pm$ 2,63	
Etapa floración (55 ddt)					
Inoculación	Cepa	Raíz (UFC)	Tallo	Flor	
		$(X \pm SD)$	$(X \pm SD)$	$(X \pm SD)$	
I1	C1	1050,35 $\pm$ 34,66	450,45 $\pm$ 24,09	30,40 $\pm$ 5,11	
I1	C2	1000,2 $\pm$ 12,28	600,25 $\pm$ 14,28	100,45 $\pm$ 6,77	
I1	C3	1499,90 $\pm$ 21,49	400,9 $\pm$ 6,80	18,85 $\pm$ 1,98	
I2	C1	15,00 $\pm$ 2,63	48 $\pm$ 4,11	19,95 $\pm$ 2,16	
I2	C2	19,9 $\pm$ 5,05	90,25 $\pm$ 3,89	49,95 $\pm$ 2,99	
I2	C3	90,10 $\pm$ 3,80	30,15 $\pm$ 3,13	19 $\pm$ 1,89	
I3	C1	16,05 $\pm$ 2,28	98 $\pm$ 4,38	77,90 $\pm$ 3,58	
I3	C2	10,15 $\pm$ 1,95	99 $\pm$ 4,06	230,30 $\pm$ 3,70	
I3	C3	10 $\pm$ 2,51	46,05 $\pm$ 2,66	62 $\pm$ 2,97	
Madurez fisiológica (120 ddt)					
Inoculación	Cepa	Raíz (UFC)	Tallo	Flor	Fruto
		$(X \pm SD)$	$(X \pm SD)$	$(X \pm SD)$	$(X \pm SD)$
I1	C1	500,05 $\pm$ 56,50	50,45 $\pm$ 5,37	21,95 $\pm$ 4,26	14,95 $\pm$ 2,58
I1	C2	500 $\pm$ 43,92	120,05 $\pm$ 6,93	75,05 $\pm$ 7,04	11,85 $\pm$ 2,39
I1	C3	1100 $\pm$ 46,83	270 $\pm$ 13,21	10 $\pm$ 3,56	5,0 $\pm$ 1,97
I2	C1	21,8 $\pm$ 4,50	17,1 $\pm$ 2,42	7,30 $\pm$ 1,30	10 $\pm$ 2,22
I2	C2	30,05 $\pm$ 3,39	74,55 $\pm$ 3,83	34,95 $\pm$ 3,39	12 $\pm$ 2,29
I2	C3	43,05 $\pm$ 4,11	40,20 $\pm$ 4,66	13 $\pm$ 1,80	8,50 $\pm$ 2,16
I3	C1	13 $\pm$ 3,19	167,15 $\pm$ 9,68	122 $\pm$ 3,85	50,10 $\pm$ 3,91
I3	C2	7,70 $\pm$ 1,92	129,90 $\pm$ 5,56	45,15 $\pm$ 3,52	10,25 $\pm$ 2,84
I3	C3	8 $\pm$ 1,97	18,70 $\pm$ 2,57	13,30 $\pm$ 2,53	2,35 $\pm$ 2,27
I4	C1	10,05 $\pm$ 2,52	12 $\pm$ 2,73	10,20 $\pm$ 2,37	4,05 $\pm$ 2,43
I4	C2	10,10 $\pm$ 3,21	14,05 $\pm$ 3,03	2,30 $\pm$ 1,38	0
I4	C3	7,70 $\pm$ 2,81	19,90 $\pm$ 3,74	1,95 $\pm$ 1,27	2 $\pm$ 1,45

I1: inoculación al sustrato; I2, I3 e I4: punción al tallo, al peciolo y al pedúnculo, respectivamente; ddt: días después del trasplante.

Los resultados del presente estudio muestran que *E. coli* logró sobrevivir en el sustrato y entrar a la planta. A través del interior de esta y en las diferentes etapas fenológicas pudo transportarse hasta llegar al fruto. Se ha informado que la transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ocurrir por suelo contaminado con estiércol (fertilizante) y a través del agua de irrigación en plantas de lechuga<sup>44</sup>. Además, algunos autores resaltan que la carga microbiana presente en un vegetal depende de la probabilidad de que el producto esté en contacto con la fuente de contaminación durante el cultivo: suelo, fertilizantes orgánicos y agua de irrigación<sup>3,17</sup>.

Uno de los factores que puede afectar la persistencia en el suelo de bacterias enteropatógenas, como es

el caso de *E. coli* O157:H7, es la presencia de carbono, es decir, al existir baja concentración de este y presencia de microbiota natural la bacteria puede presentar alta mortalidad<sup>48</sup>.

Las bacterias presentaron similar comportamiento al ser inoculadas por punción en el vegetal o agregadas al sustrato: en ambos casos se movieron en el interior de la planta. La cepa de *E. coli* que se recuperó en más alto número fue la aislada de cultivo de tomate (EcT), que corresponde al serotipo O157:H16. Esto se relaciona con la adaptación al tomate que pudo haber desarrollado con anterioridad, al estar ya presente en este cultivo<sup>27,33</sup>. Estos resultados muestran que *E. coli* tiene la capacidad de persistir en el tejido interno de las plantas de tomate, donde la mayor

recuperación se obtuvo en la inoculación realizada en la etapa vegetativa y en la floración. Esto nos indica que en las primeras etapas fenológicas del cultivo existe mayor posibilidad de contaminación. Este resultado coincide con lo reportado en hojas de espinaca de 3 semanas, que fueron más susceptibles de ser colonizadas por *E. coli* O157:H7 en comparación con las hojas de 5 semanas<sup>37</sup>. En contraste, también se han informado similares tamaños de población de bacterias patógenas en tejido joven de lechuga y en tejidos ya cortados<sup>4</sup>. Esto resalta que la supervivencia de la bacteria depende de la condición fisiológica en cada etapa fenológica, así como del órgano de la planta donde persiste.

Las 3 cepas inoculadas de diferentes formas presentaron la capacidad de moverse en toda la planta de forma ascendente por el xilema y descendente por el floema, sin mostrar ningún tipo de respuesta o síntoma. Otros autores, sin embargo, demostraron que las enterobacterias pueden activar el sistema inmunitario activando la respuesta en el tejido de plantas de *Arabidopsis thaliana*, las que presentaron clorosis y marchitez<sup>42</sup>. Asimismo, algunos estudios señalan que estas bacterias pueden inducir respuesta de defensa de la planta e incluso tienen la capacidad de suprimirla<sup>9,19</sup>. Por otra parte, en este estudio las plantas de tomate no reconocieron a la bacteria patógena para humanos O157:H7 como peligrosa para ellas y no iniciaron ninguna respuesta de defensa<sup>2</sup>.

Resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado sobre calidad y seguridad microbiológica de productos consumidos en fresco, donde encontraron que la segregación de enzimas por microorganismos endófitos como pectinasas, celulasas y proteasas favorece la disponibilidad de nutrientes y propicia el desarrollo de poblaciones microbianas<sup>40</sup>. Esto nos habla de la adaptación al medio que ha desarrollado *E. coli* por un proceso conocido como *quorum sensing*, donde la exposición a condiciones de estrés permite a las bacterias sobrevivir bajo estas condiciones, e incluso mejorar su tolerancia<sup>6</sup>. Este comportamiento es destacado en una investigación en la que se observaron diferencias entre cepas de *E. coli* recuperadas de diversos cultivos y otras de origen intestinal (de mamíferos): las primeras utilizaron en mayor grado glucosa y azúcares derivados de la planta, por lo que se asume que podrían adaptarse a las condiciones que le pueden brindar los vegetales<sup>30</sup>. Otros estudios señalan que diferentes especies de enterobacterias pueden encontrar el ambiente adecuado al estar en contacto con el fruto y así poder sobrevivir en este ambiente<sup>35,43</sup>.

Conocer el comportamiento de *E. coli* y los procesos involucrados en su internalización y supervivencia en plantas cuyas partes comestibles se consumen en fresco es de gran importancia, ya que los desinfectantes solo previenen la contaminación superficial y no tienen acceso a tejidos internos<sup>1,8,44</sup>. Esto representa un riesgo latente para el consumidor, si desde etapas tempranas el cultivo se contamina.

A través del presente estudio se aporta información relevante vinculada con la adaptación, la persistencia y la supervivencia de un importante patógeno en plantas de tomate, y queda en evidencia lo importante que es prevenir la contaminación de los cultivos por bacterias enteropatógenas.

## Conclusiones

Tres cepas de *E. coli* (O157:H7, O157:H16 y O105ab) presentaron la capacidad de penetrar en plantas y frutos de tomate y lograron permanecer durante el desarrollo del cultivo hasta 120 días. En todos los casos se pudieron transportar a las diferentes partes de la planta hasta llegar al fruto, sin mostrar ningún síntoma que pudiera advertir de su presencia. La persistencia dependió de la etapa fenológica en que se hizo la inoculación, así como del serotipo al que pertenecían las cepas. *E. coli* en contacto con plantas de tomate representa un peligro latente, ya que al presentar la capacidad de internalizar y llegar al fruto limita la acción de los métodos de desinfección utilizados normalmente.

## Financiación

Publicación financiada con recursos PFCE2017.

## Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses por parte de los autores.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a la primera autora durante sus estudios de posgrado, al financiamiento del trabajo con clave PROMEP FE057/12 y al Hospital infantil de México Federico Gómez UNAM por el apoyo para los análisis realizados.

## Anexo 1. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en: [doi:10.1016/j.ram.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.001).

## Bibliografía

1. Barak J, Schroeder B. Interrelationships of food safety and plant pathology: The life cycle of human pathogens on plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2012;50:241–66.
2. Berger C, Sodha S, Shaw R, Griffin P, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 2010;12:2385–97 (Online) doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x.
3. Brandt S, Pek Z, Barna E. Lycopene content and color of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J Sci Food Agric.* 2006;86:568–72.
4. Brandl M, Amudson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:2298–306.
5. Campbell NA, Reece JB. *Biología.* 7. ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 523–4; 550–551. Campbell NA, Reece JB. *Biología.* 7. ° ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. pp. 523–524, 550–551.
6. Carey CM, Kostrzynska M, Thompson S. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *J*

- Microbiol Methods. 2009;77:235–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>.
7. Cedric N, Berger. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 2010; 12(9), 2385-2397.
  8. Cooley MB, Chao D, Mandrell RE. *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce; environmental investigations in the Salinas region of pre-harvest contamination. *Phytopathology.* 2007;97:S138.
  9. Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:4915–26.
  10. Curtis H, Barnes S, Schnek A, Massarini A. *Curtis Biología.* 7.ª ed. Madrid; 2011. pp. 24, 25, 480, 481, 484.
  11. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555–8.
  12. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Giono S, Escobar A, Valdespino JL, editores. *Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales.* México: Secretaría de Salud; 1994. p. 251.
  13. Food and Agriculture Organization of the United Nations (© FAO). 2015; 12 p. [consultado 10 Abr 2017]. Disponible en: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/FAO.E.Coli\\_FCC.2011.06.231.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO.E.Coli_FCC.2011.06.231.pdf).
  14. Food and Drug Administration (FDA). Foodborne illnesses: What you need to know; 2015 [consultado 14 Mar 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagovpublic/@fdagov-foods/gen/documents/webcontent/ucm187529.pdf>.
  15. Fletcher J, Leach JE, Eversole K, Tauxe R. Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology.* 2013;103:306–15, <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-09-12-0236-IA>.
  16. García S, Heredia N. Foodborne pathogens and toxins: An overview. En: Heredia N, Wesley I, García S, editores. *Microbiologically safe foods.* New Jersey, EE. UU: John Wiley & Sons, Inc; 2009. p. 15–52.
  17. Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere. *J Appl Microbiol.* 2008;104:613–26.
  18. Holden N, Pritchard L, Toth I. Colonization outwith the colon: Plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33: 689–703.
  19. Iniguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plants defenses. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005;18: 169–78.
  20. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). México; 2015 [consultado 1 May 2015]. Disponible en: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx).
  21. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). México; 2015 [consultado 2 May 2015]. Disponible en: [www.inafed.gob.mx/es/inafed/Municipales](http://www.inafed.gob.mx/es/inafed/Municipales).
  22. Iturriaga M, Tamplin M, Escartín F. Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative and storage temperature. *J Food Prot.* 2007;70:30–4.
  23. Juroszek P, Lumpkin HM, Yang RY, Ledesma DR, Ma CH. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: Comparison of organic and conventional management systems. *J Agric Food Chem.* 2009;57:1188–94.
  24. Kauffmann F, Orskov F, Ewing W. Designations for the k antigens of *Escherichia coli* serotypes. *International Bulletin.* 1956;6:63–4.
  25. López C, Cerna JF, Villegas N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Estrada T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2003;1:127–31.
  26. Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol.* 2001;39:461–90.
  27. Luna ML, Delgado A, Herrera BE, Torres AG, Avelino F, Navarro A, Parada F. Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) y suelos de invernadero. *Sci Agropecu.* 2012;161–9. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/80>.
  28. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biología de los microorganismos.* 8.ª ed Prentice Hall; 2001. p. 986.
  29. Machado DC, Maia CM, Carvalho ID, da Silva NF, Dantas MC, Andre PB. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. *Braz J Microbiol.* 2006;37: 538–44.
  30. Méric G, Kemsley EK, Falush D, Siggers EJ, Lucchini S. Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol.* 2013;15: 487–501.
  31. Norma Oficial Mexicana. NOM-109-SSA1-1994 bienes y servicios. Generalidades para la toma y recolección de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación;1994. p. 1-4.
  32. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación;1995. p. 1-5.
  33. Ocaña RL, Gutiérrez AT, Sánchez JR, Mariezcurrena MD, Velázquez G, Laguna A, Rojas I. Microbiological quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) produced under greenhouse conditions in five municipalities of the State of Mexico. *Phyton.* 2015;84:1.
  34. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol.* 2012;32:1–19.
  35. Orozco L, Rico R, Fernandez EE. Microbiological profile of greenhouses in a farm producing hydroponic tomatoes. *J Food Prot.* 2008;1:60–5.
  36. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 1977;41:667–710.
  37. Pu S, Beaulieu JC, Prinyawiwatkul W, Ge B. Effects of plant maturity and growth media bacterial and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in growing spinach leaves. *J Food Prot.* 2009;72:2313–20.
  38. SAGARPA, SEDAGRO, SENESICA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; 2010 [consultado 10 Ene 2015]. Disponible en: [www.gob.mx](http://www.gob.mx).
  39. SAS. Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Software version 9.0. Cary: N.C., EE. UU.; 2002.
  40. Sela S, Fallik F. *Microbial quality and safety of fresh produce: Postharvest handling.* Philadelphia: Editorial Elsevier; 2009. p. 356–71.
  41. Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178 O179, O180 and O181. *APMIS.* 2004;112:569–84.
  42. Schikora A, Carreri A, Charpentier E, Hirt H. The dark side of the salad: *Salmonella* Typhimurium overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows and endopathogenic lifestyle. *PLoS One.* 2008;3:e2279 (On-line) doi:10.1371/journal.pone.0002279.
  43. Schwaiger K, Helmke K, Holzel CS, Bauer J. Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from

- farms and from supermarkets in Germany. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;21:161–72.
44. Solomon EB, Yaron S, Matthews KR. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:397–400.
  45. Schwartz W, Margulis L. Symbiosis in cell evolution. Life and its environment on the early earth. 59 Tab. *J Basic Microbiol*. 1981;22:427.
  46. Serotipificación. Unidad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Formato de Instrucciones de la técnica de serotipificación: *Escherichia coli*. México; 2012.
  47. Vidovic S, Block HC, Korber DR. Effect of soil composition, temperature, indigenous microflora and environmental conditions on the survival of *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol*. 2007;57:822–9.
  48. Wright KM, Chapman S, McGeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK, Holden NJ. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. *Phytopathology*. 2013;103:333–40.
  49. Winn, Washington C, Elmer W, Koneman. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. 6.<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2008.