



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de serotipos patógenos de *Salmonella* y
E. coli por medio de aislamiento bacteriológico, PCR
multiplex y en tiempo real en carne y queso fresco de
bovino**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ESTELA HERNÁNDEZ PÉREZ



MÉXICO D. F., 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

VOCAL: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

SECRETARIO: JESÚS VASQUEZ NAVARRETE

1er. SUPLENTE: MARTHA GILES GOMEZ

2° SUPLENTE: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA EN EL CENID-MICROBIOLOGÍA;
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN FORESTAL AGRARIO Y PECUARIO.

ASESOR DEL TEMA: JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE

SUSTENTANTE: ESTELA HERNÁNDEZ PÉREZ

Agradecimientos

AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA EN EL CENID-MICROBIOLOGÍA; INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN FORESTAL AGARIO Y PECUARIO. Por permitirme desarrollar la metodología de este trabajo bajo el proyecto: **Detección molecular de cinco patógenos bacterianos en carne y queso fresco de bovinos para consumo. No. 260232M**

Al Dr Jesús Vázquez Navarrete por la asesoría recibida durante la elaboración del proyecto de mi tesis

A la FACULTAD DE QUÍMICA por brindarme la formación académica precisa

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLÓGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA por asistirme en la lectura de las tiras API 20E

Agradezco al QFB Juan José Polanco Polanco por apoyarme durante el desarrollo experimental de mi tesis.

Dedicatoria

Primeramente a Dios por haberme sido refugio de generación en generación

A mis padres Humberto Hernández y Petra Pérez, que en todo momento me brindaron apoyo incondicional; por su gran amor, paciencia y comprensión.

A mis hermanos Samuel y Laura, por su cariño y orientación

A mis primos Elizabeth, David, Esther, Abel, Adriana, Clementina; por su afecto y sabios consejos

A mis amigos de toda la vida, en especial al grupo de 10 por todos y cada uno de los momentos compartidos en la universidad y por el compañerismo.

A Juan José Polanco Polanco por su atención, disponibilidad y afecto.

“Aplica tu corazón a la enseñanza, y tus oídos a las palabras de sabiduría.”

Proverbios 23:12

Índice

Resumen.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 <i>Salmonella</i>	11
Características	11
Taxonomía.....	13
Fisiología.....	14
Reservorios.....	15
Toxinas.....	15
1.1.1 Salmonellosis	17
Gastroenteritidis por <i>Salmonella</i> (<i>S. Enterica</i>).....	18
Epidemiología.....	18
Patogénesis.....	19
Fiebre entérica o intestinal (Tifoidea).....	20
Patogénesis.....	20
1.2 <i>Escherichia coli</i>	22
Características y taxonomía.....	22
Características serológicas.....	23
Factores de virulencia.....	24
Reservorio.....	26
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica(ECEH).....	27
Reservorios.....	28
Patogenicidad.....	28
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ECET).....	29
Patogenicidad.....	29
Inmunidad.....	30
Toxina e/t AB.....	30

1.3	Enfermedades de transmisión por alimentos ETA.....	32
1.4	Panorama mundial y nacional de ETA.....	32
1.5	Fuentes de microorganismos en alimentos	33
	Carne.....	34
	Origen de microflora de la carne de bovino.....	34
	Queso.....	35
	El queso como medio de crecimiento bacteriano.....	35
1.6	Detección de patógenos	36
	Métodos convencionales.....	36
	Sistemas específicos de identificación (API 20E).....	37
	Reacciones de aglutinación.....	37
	Métodos moleculares.....	38
	PCR múltiplex	38
	PCR tiempo real.....	39
2.	OBJETIVOS.....	40
	2.1 Objetivo general.....	40
	2.2 Objetivos específicos	40
3.	JUSTIFICACIÓN	41
4.	HIPÓTESIS.....	42
5.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	43
	5.1 Material de laboratorio	
	Equipo.....	43
	Cepas de referencia y oligonucleótidos	44
	5.2 Obtención de las muestras.....	44
	5.3 Obtención de enterobacterias procedentes de carne y queso fresco.....	44

5.4 Aislamiento diferencial en medios selectivos, diferenciales y específicos.....	44
5.5 Observación macroscópica y microscópica de las colonias en medios selectivos y diferenciales.....	45
5.6 Confirmación bioquímica de las colonias sospechas.....	45
5.7 Extracción de DNA de las cepas aisladas de carne y queso fresco.....	46
5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiplex en punto final.....	46
5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.....	48
5.10 Pruebas serológicas	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1 Estudio en muestras de carne.....	50
6.1.1 Desarrollo en medios selectivos y diferenciales	50
6.1.2 Confirmación de las cepas de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en muestras de carne por API 20E.....	51
6.1.3 PCR multiplex en punto final para determinar <i>Salmonella</i> en muestras de carne	53
6.1.4 Serotipificación de los aislamientos de <i>Salmonella</i>	56
6.1.5 PCR multiplex en punto final para determinar <i>E. coli</i> en muestras de carne	58
6.1.6 Serotipificación de los aislamientos de <i>E. coli</i>	59
6.2 Estudio en muestras de queso fresco.....	62
Aislamiento bacteriológico	62
6.2.1 Desarrollo en medios selectivos y diferenciales	62
6.2.2 Confirmación de las cepas de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> en muestras de queso fresco por API 20E.....	63
6.2.3 PCR multiplex en punto final para determinar <i>Salmonella</i> en muestras de queso fresco	65

6.2.4 Serotipificación de los aislamientos de <i>Salmonella</i>	66
6.2.5 PCR multiplex en punto final para determinar <i>E. coli</i> en muestras de queso fresco	68
6.2.6 Serotipificación de los aislamientos de <i>E. coli</i>	70
6.3 Estudio molecular en muestras de carne y queso fresco.....	73
6.3.1 Amplificación de los genes <i>tyv</i> , <i>invA</i> y subunidad 16S ribosomal en <i>Salmonella</i>	73
6.3.2 Amplificación de los genes <i>fliC</i> y <i>elt AB</i> en <i>E. coli</i>	74
6.3.3 Amplificación de los genes <i>tyv</i> , <i>invA</i> , <i>fliC</i> y <i>elt AB</i> en <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> por un PCR tiempo real.....	75
7. DISCUSIÓN.....	79
8. CONCLUSIÓN.....	84
9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	85
10. REFERENCIAS.....	86
11. ANEXOS.....	90

Resumen

La carne y el queso fresco deben ser alimentos inocuos, sin embargo debido a falta de buenas prácticas de producción, manejo y distribución de estos productos pecuarios la presencia microorganismos patógenos que causan enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son un problema de salud pública cada vez más importante. Desde este punto de vista, la OMS estima que las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y por el agua provocan la muerte de 2.2 millones de personas al año en el mundo. Bacterias como *Salmonella* y *E. coli*, dos géneros reconocidos como principales responsables de ETA; pueden infectar al humano y a una gran variedad de animales domésticos. Estas bacterias poseen genes que codifican para determinados factores de virulencia, considerados marcadores moleculares tales como: la endotoxina LPS, adhesinas, proteínas de membrana externa y endotoxinas de la familia TL y TE.

El serotipo *E. coli* O157:H7 pertenece a la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) presenta genes como *fliC* y *elt AB* ; por otro lado, *E. coli* entetoxigénica (ECET) posee una toxina termolábil (TL) que tiene una actividad similar a la toxina colérica de *Vibrio cholerae*. El género *Salmonella*, tiene más de 2400 serotipos reconocidos y algunos específicos del hospedero como *Salmonella entérica serovar Typhi* (*S. Typhi*) que tiene genes como *tyv* que codifica para una enzima importante en la biosíntesis del lipopolisacárido; ocasiona la fiebre tifoidea, diarrea e incluso muerte. El serotipo *S. Enteritidis* posee marcadores moleculares importantes: la subunidad 16S ribosomal y genes que codifican para invasión *invA*.

Por tales motivos, la inocuidad alimentaria es un proceso que asegura la calidad en la producción, y elaboración de los productos de consumo para el humano que garantice la salud, evitando pérdidas económicas.

El objetivo del trabajo fue: detectar cepas patógenas de *Salmonella* spp, *Salmonella Typhi*, *E. coli* Enterohemorrágica y *E. coli* Enterotoxigénica; a partir de muestras de carne y queso fresco obtenidas de mercados y tianguis municipales en 6 estados de la república Mexicana y el Distrito Federal; mediante métodos de biología molecular (PCR multiplex y PCR tiempo real);

aunado a los métodos microbiológicos tradicionales que ayudan al preenriquecimiento, enriquecimiento y aislamiento de la muestra, así como, a la pureza de la cepa aislada. Llegando a resultados fiables y eficaces.

Los resultados fueron los siguientes: De 65 muestras de carne analizadas el 69.23% estaban contaminadas con algún tipo de enterobacteria; de este porcentaje se aislaron 20 cepas de *Salmonella* equivalente al 44.44% y 13 cepas de *E. coli* equivalente al 28.88%; el análisis de PCR en este alineamiento consiguió identificar 4 cepas de *Salmonella* Typhi, 3 de *Salmonella* Enteritidis y 1 de *Salmonella* Typhimurium junto con las pruebas serológicas.

De las 64 muestras de queso fresco el 56.25% estaban contaminadas por bacilos gram negativos de los cuales 16 muestras (44.44%) se trataban de *Salmonella* y 15 (41.66%) de *E. coli*; con respecto a los serototipos, se hallaron 5 cepas de *Salmonella* Typhi, 4 de *Salmonella* Enteritidis y 2 de *Salmonella* Typhimurium; todos mediante muestreos realizados en 6 estados de la República Mexicana y el D.F., lo cual deja ver la alta incidencia de contaminantes de estas bacterias en carne y queso habiendo mayor probabilidad de contraer una enfermedad gastrointestinal.

Los resultados de este estudio indicaron que en todos los mercados de la zona muestreada se hallaron microorganismos lo cual puede significar que hay un mal control de la carne y el queso que se distribuye en los rastros del centro de la República Mexicana.

1. Introducción

1.1 *Salmonella*

A principios del siglo XIX, los patólogos clínicos documentaron por primera vez en Francia la asociación de la ulceración intestinal humana con un agente contagioso que más tarde fue identificado como el causante de la fiebre tifoidea. Las investigaciones posteriores de autores europeos condujeron al aislamiento y caracterización del bacilo tifoideo y a ideación de una prueba serodiagnóstica para la detección de este agente de la enfermedad humana grave. Los rasgos diferenciales clínicos y serológicos fueron utilizados posteriormente para identificar los organismos paratifoideos íntimamente emparentados. El primer cuarto del siglo XX fue testigo de procesos importantes en la detección serológica de los antígenos somáticos (**O**) y flagelares (**H**) en el grupo *Salmonella*, término genérico acuñado por Lignières en 1990. *White* propuso por primera vez un esquema antigénico para la clasificación de *Salmonella* que posteriormente fue ampliado por *Kauffmann* en el esquema de *Kauffmann-White* que, en 1994, admitió más de 2300 serovariedades^{7,13}.

Características de *Salmonella*

El género *Salmonella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, consta de un grupo bien definido de bacilos gram-negativos, Además se comporta como patógeno intracelular facultativo. En cierta época existían cerca de 2000 nombres para diversos miembros de este género, que solían reflejar los aspectos coloridos del sitio o las circunstancias del aislamiento original; hoy en día estudios de DNA/DNA por medio de técnicas de hibridación y métodos serológicos señalaron que el género *Salmonella* está integrado por 2 especies: *Salmonella* *Enterica* y *Salmonella* *bongori*; a su vez *Salmonella* *enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella* *enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella* *enterica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella* *enterica* subespecie *houtenae*, *Salmonella* *enterica* subespecie *indica*, *Salmonella* *enterica* subespecie *enterica* y *Salmonella* *enterica* subespecie *salamae* (Tabla 1.2)

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres deben escribirse en letra tipo romano y no en itálica, de la siguiente manera *Salmonella enterica* del serotipo Typhi (*S. Typhi*)^{2,3}.

Otro aspecto distintivo de los serotipos de *Salmonella* es el grupo de huéspedes a los que afecta. Algunos de los serotipos están altamente adaptados a mamíferos o anfibios particulares y otros afectan a gran variedad de huéspedes. Tienen interés para la microbiología médica los que afectan a los seres humanos y otros animales, y los estrictamente adaptados al hombre y a los primates superiores. *Salmonella enterica* del serotipo Typhi (*S. Typhi*) por ejemplo infecta solo al hombre produciendo fiebre intestinal, mejor conocida como tifoidea².

Las Salmonelas poseen múltiples tipos de pili, uno de ellos morfológica y funcionalmente similar a los pili del tipo 1 de *E. coli*, que se fijan a los receptores de D-manosa sobre diversos tipos de células eucariotas. La mayoría de las células son móviles gracias a la acción de sus flagelos².

Tabla 1.2 Especies del género *Salmonella*

Especies	No. de serovariedades
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Paratyphi</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>S. Typhimurium</i>)	1405
subesp. <i>salamae</i>	471
subesp. <i>arizonae</i>	94
subesp. <i>diarizonae</i>	311
subesp. <i>houtenae</i>	65
subesp. <i>indica</i>	10
<i>Salmonella bongori</i>	19
Total	2375

Taxonomía

Las Salmonelas son quimioorganotróficas, con la capacidad para metabolizar nutrientes por las vías metabólicas respiratoria y fermentativa. Los microorganismos crecen óptimamente a 37°C y catabolizan la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas. Las Salmonelas son oxidasa-negativas y catalasa-positivas, casi nunca fermentan lactosa o sacarosa, crecen en citrato como única fuente de carbono, generalmente producen sulfuro de hidrógeno, descarboxilan la lisina y la ornitina, y no hidrolizan la urea¹³.

La identificación bioquímica de los aislamientos transmitidos por alimentos y de los aislamientos clínicos de *Salmonella* spp generalmente va unida a la confirmación serológica, una técnica compleja que implica la aglutinación de los antígenos bacterianos de superficie con anticuerpos específicos de *Salmonella*, estos incluyen lipopolisacáridos (**LPS**) o de la superficie exterior

de la membrana bacteriana, antígenos **H** asociados con los flagelos periféricos, y el antígeno capsular **Vi**, que existe solamente en *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en *S. Dublin*.¹⁴

Los antígenos **O** termoestables se clasifican como antígenos principales o secundarios. La primera clase consta de antígenos como los factores somáticos **O:4** y **O:3**, que son determinantes específicos de los grupos somáticos B y E, respectivamente. En contraposición, componentes antigénicos somáticos secundarios como **O:12** no son discriminadores, según se demostró por su presencia en grupos somáticos diferentes. Las variantes lisas son cepas con antígenos de **LPS** serotípicos bien desarrollados que aglutinan fácilmente con anticuerpos específicos, mientras que las variantes rugosas exhiben antígenos de **LPS** incompletos dando como resultado una aglutinación débil o negativa con anticuerpos somáticos de *Salmonella*. Los antígenos **H** son proteínas termolábiles; las distintas cepas de *Salmonella* pueden producir un antígeno **H** (monofásicas) o dos (difásicas). Estos antígenos homólogos de superficie son codificados cromosómicamente por los genes **H₁** y **H₂** transcritos bajo el control del locus **vh2**. Los antígenos capsulares encontrados frecuentemente en representantes de la familia *Enterobacteriaceae* se limitan al antígeno **Vi** en el género *Salmonella*. La solubilización térmica del antígeno **Vi** es necesaria para la identificación inmunológica del **LPS** serotípico subyacente¹³.

Fisiología

Crecimiento

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones externas del medio. Las Salmonelas crecen activamente en un amplio intervalo de temperaturas (< 54°C) y también exhiben propiedades psicotróficas, según se refleja en la capacidad para crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4°C. La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella* spp se demuestra por su capacidad para multiplicarse a valores de pH que varía desde 4.5 hasta 9.5 con un pH óptimo para el crecimiento de 6.5 hasta 7.5. De los muchos ácidos orgánicos formados por los cultivos iniciadores en la

carne, en los alimentos lácteos y otros alimentos fermentados, y de los diversos ácidos orgánicos que se utilizan en la acidificación de productos, los ácidos propiónico y acético son los más bactericidas, sin embargo el crecimiento y/o la supervivencia aumentados de este patógeno bacteriano humano durante el proceso fermentativo, daría como resultado un producto contaminado. Incluso se tiene registro de un informe reciente sobre la supervivencia aumentada de *Salmonella* spp adaptada al ácido en leche fermentada y durante el almacenamiento (5°C) de los quesos. Además la presencia de Salmonelas ácido-tolerantes en estos alimentos aumenta más el nivel del peligro de la salud pública porque este rasgo fisiológico adquirido podría reducir al mínimo la actividad antimicrobiana de la acidez gástrica y favorecer la supervivencia de las salmonelas en el citoplasma ácido de los fagocitos mononucleares y polinucleares del hospedador humano^{7,13}.

Reservorios

De los diversos sectores en la industria cárnica, los productos avícolas siguen siendo los reservorios principales de *Salmonella* en muchos países, superando a otros productos cárnicos como la carne de cerdo y la de res como posibles vehículos de infección. La persistencia de *Salmonella* en las industrias de la carne porcina, bovina y ovina tiene su origen tanto en la exposición del ganado a fuentes de contaminación ambientales como a la infección por transmisión paterna¹³.

TOXINAS

Enterotoxinas: Ocasionalmente, la infección por *salmonella* produce diarrea abundante, similar a la del cólera y se ha descrito también la existencia de una enterotoxina termolábil parecida a la toxina del cólera y a la TL de *E. coli*. Durante la gastroenteritis por *Salmonella*, se producen cambios citopáticos, atribuibles probablemente a la citotoxina asociada con la fracción de membrana externa bacteriana. El papel de estas enterotoxinas puede variar con los microorganismos infectantes, pero se ha comprobado que en general estas elevan intracelularmente el AMPc e inducen la secreción de fluidos.

Lipopolisacárido (LPS): Es un componente esencial en la membrana externa y el determinante de virulencia de *Salmonella* caracterizado con más precisión. El lípido **A**, puede activar los macrófagos, lo que origina fiebre, leucocitosis e hipertensión (shock), contribuye a la resistencia de muerte mediada por el complemento, induce coagulación intravascular diseminada (CID), daño muscular, colapso circulatorio, shock, además de la producción del factor de necrosis tumoral (FNT). No hay duda de que el cuadro general de la infección sistémica por *Salmonella* es atribuible fundamentalmente a la porción tóxica del **LPS**.

Citotoxinas: Probablemente las citotoxinas son las responsables del daño de las células epiteliales ya que un estudio demostró la inhibición de proteínas en las células Vero, lo que podría contribuir a la invasión y destrucción de los enterocitos.

Adhesión y movilidad: La localización de *Salmonella* en el íleon terminal sugiere a que estos organismos se adhieran al epitelio intestinal. *Salmonella* sintetiza fimbrias normales del tipo 1 sensibles a manosa, pero el papel de estas estructuras en la virulencia parece ser mínimo. Debido a la relación entre las fimbrias de salmonella y su habilidad para aglutinar ciertas especies de eritrocitos, así como la morfología de las mismas ayudó a clasificarlas en nueve clases.

Invasividad: La invasión de la mucosa gastrointestinal es un paso esencial en la patógena de *S. Enteritidis*. En los modelos de cultivos celulares, la invasión y la penetración a través de las células epiteliales polarizadas (transcitosis) implica a unas proteínas específicas de la superficie bacteriana (factores de invasión), que se sintetizan en respuesta a la interacción con el borde en cepillo de las células epiteliales. De los genes asociados a la invasión, el más estudiado es el gen *invE*, necesario para que salmonella provoque cambios intracelulares³.

invA: codifica a una proteína de la membrana interna, involucrada en la formación de un canal, su porción amino-terminal es hidrofóbica, con ocho

dominios transmembranales, de por lo menos 20 aminoácidos, mientras que su porción carboxi-terminal hidrofílica, localizada en el citoplasma puede interactuar con otros componentes del sistema^{3,4}.

1.1.1 Salmonelosis

Las infecciones por *Salmonella* afectan a hombres y animales. En el hombre produce manifestaciones clínicas diversas, agrupables en cuatro grandes síndromes:

1. Gastroenteritis aguda
2. Fiebre tifoidea o fiebre entérica
3. Septicemia o bacteremia
4. Infecciones focales

En la población general existe un número variable de portadores de *salmonella*, los cuales pueden ser asintomáticos agudos (convalecientes) o portadores crónicos¹³ (tabla 1.3)

Tabla 1.3. Enfermedades causadas por *Salmonella*

	Enfermedades entéricas	Septicemias	Enterocolitis
Periodo de incubación	7 a 20 días	variable	8 a 48 horas
Inicio	Insidioso	Súbito	Súbito
Fiebre	Gradual, después de una meseta elevada	Elevación rápida, después temperatura "séptica en picos"	Generalmente baja
Duración de la enfermedad	Varias semanas	Variable	2 a 5 días
Síntomas gastrointestinales	Estreñimiento inicial, diarrea sanguinolenta	Ninguno	Náuseas, vómito, diarrea al inicio
Hemocultivo	Positivo en la primera a segunda semanas	Positivo durante la fiebre elevada	Positivo poco después del inicio

Gastroenteritis por *Salmonella* (*S. Enterica*)

Epidemiología

La gastroenteritis por *S. Enterica* es, de manera predominante, una enfermedad de las sociedades industrializadas y producida por manejo inapropiado de los alimentos, que propicia la transmisión del reservorio animal al ser humano. Se requiere la ingestión de 1000 o más salmonellas para producir enfermedad^{6,7}.

El número de casos de infección por salmonella varía según la estación del año; sin embargo, las incidencias máximas ocurren en verano y otoño. Las tasas más elevadas de infección se producen en niños menores de 5 años de edad, individuos de 20 a 30 años de edad y personas mayores de 70. Si se infectara un miembro del hogar, la probabilidad de que contagie a otro se

aproxima a 60% y hasta un 5% de los pacientes que se recuperan de una crisis de gastroenteritis sigue expulsando microorganismos 20 semanas después. Los portadores crónicos que manejan alimentos son reservorios importantes para la transmisión de la enfermedad^{7,14}.

Patogénesis por *S. Enterica*

Las células de la especie *Salmonella Enterica* infectan diferentes porciones del aparato digestivo, y según la localización producen manifestaciones clínicas distintas. Cuando afecta el intestino delgado alto causa gastroenteritis como náuseas, vómitos y diarreas acuosas de gran volumen. El compromiso del íleon conlleva la aparición de heces pastosas o semilíquidas, en general sin náuseas ni vómitos. Finalmente la localización colónica, en particular, en su porción izquierda, se traduce por heces disenteriformes, con moco, sangre y pus^{14,15}.

Las salmonelas no resisten el efecto citolítico de la acidez gástrica, por lo cual ésta constituye una eficiente barrera natural. Las bacterias sortean este obstáculo, situadas en la intimidad de los alimentos y viajan por la capa de moco intestinal; llegan, por último, a los enterocitos y las células M de los intestinos delgado y grueso. Es probable que la adherencia sea mediada por pilis, pero en el momento del contacto de las bacterias con las células M la estimulación de las “ondulaciones” membranosas altera directamente la estructura normal en tan solo unos minutos. Estas “ondulaciones” son sitios especializados de la membrana plasmática del mamífero de redistribución citoesquelética de la actina filamentosa incluidos en condiciones normales por moléculas con actividad fisiológica, como los factores de crecimiento⁷.

Las “ondulaciones” parecen fagocitar al microorganismo y colocarlo dentro de una vacuola endocítica, y le permiten efectuar transcitosis desde la superficie apical de las células hasta la membrana basolateral. Una vez que han atravesado la célula, los microorganismos entran en la lámina propia, donde inducen una reacción inflamatoria intensa. Cuando los ingieren los macrófagos son capaces de persistir gracias a que inducen la apoptosis del fagocito^{7,18}.

Aunque se han descrito algunas enterotoxinas en *Salmonella*, no está clara su función en la producción de diarrea. La mejor estimación señala que basta para explicar la invasión y transcitosis de los eritrocitos y el aumento de la permeabilidad vascular y la reacción inflamatoria acompañantes. La descarga de prostaglandinas y factores quimiotácticos puede desencadenar inflamación y cambios bioquímicos en los enterocitos. Aunque la mayor parte de las cepas de *S. Enterica* el proceso se limita a la mucosa y la submucosa, algunas invaden a mayor profundidad y llegan a la sangre y a los órganos distantes^{7,19,20}.

Fiebre entérica o intestinal (Tifoidea)

La tifoidea es una enfermedad estrictamente humana. Los reservorios primarios son los portadores crónicos del serotipo Typhi. Algunos pacientes se vuelven portadores crónicos durante años como consecuencia de la infección crónica de la vesícula y las vías biliares cuando hay cálculos. Todos los casos deben rastrearse hasta encontrar su origen humano. Si un paciente con tifoidea no ha viajado por una región endémica, el origen de la enfermedad debe de ser un visitante o alguien que preparó alimentos. El agente patógeno puede transportarse en el agua municipal de las regiones endémicas en desarrollo o en las ocasiones en que los defectos de cualquier sistema permiten que los desechos de los portadores contaminen el agua supuestamente potable, la transmisión ocurre por la vía fecal-bucal^{15,16}.

La fiebre tifoidea sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo²⁰.

Patogénesis de la fiebre tifoidea

El periodo de incubación se acorta con un mayor cantidad de gérmenes, pudiendo ser sólo tres días con un gran inóculo y hasta 60 días, con los menores. Lo común es encontrar periodos de incubación de entre 7 y 14 días. Una vez que ingresa el microorganismo, atraviesa la mucosa gástrica y

viaja hacia el intestino delgado donde invade a través de la mucosa y se introduce con rapidez a las células mononucleares de los ganglios linfáticos regionales, posterior a lo cual una bacteremia inicial los transporta hacia el hígado y el bazo. Esta diseminación sistémica es clínicamente silenciosa y de corta duración. Luego se produce un periodo de multiplicación en los macrófagos del hígado, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos. Los bacilos tifoideos no son destruidos y se multiplican en forma estable dentro de los macrófagos, a diferencia del resto de las salmonelas. Cuando el número de microorganismos intracelulares llega a un umbral son liberados hacia el torrente circulatorio, iniciando un periodo de bacteremia continua, lo que señala el comienzo de la enfermedad clínica^{2,7,15}.

Las manifestaciones sistémicas de la fiebre tifoidea incluyen la infección purulenta y no purulenta de varios sistemas orgánicos. Las complicaciones más frecuentes son la hemorragia y la perforación intestinal, habitualmente del íleon. La mejoría clínica de los enfermos no tratados comienza por lo general a la tercera semana tras la infección, lo que conduce en el desarrollo de la inmunidad humoral y, especialmente, de la inmunidad celular. La fiebre tifoidea es una enfermedad grave. Cuando evoluciona sin tratamiento, se manifiesta con un periodo de unos 30 días sin fiebre, durante el que muere alrededor de un 20 % de los enfermos; otro 10% adicional sufre una recaída de fiebre o de hemorragia intestinal o peritonitis¹⁵.

1.1 *Escherichia coli*

Características y taxonomía

Escherichia coli (*E. coli*) es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años y su biología general esta bien estudiada. También ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de evolución experimental y genética de poblaciones para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y a largo plazo¹.

E. coli es una bacteria Gram negativa típica de la familia Enterobacteriaceae. El análisis de 16rRNA muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ , se encuentra relacionada a las otras proteobacterias (α , β , δ) y a las cianobacterias. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente: anaeróbicamente en el interior del intestino y aeróbicamente en el ambiente exterior. Gracias a esta capacidad muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros tantos son principalmente comensales de animales invertebrados o vertebrados o son patógenos de otras plantas^{1,2}.

En particular, *E. coli* prefiere utilizar azúcares sencillos como la glucosa, produce ácido y gas a partir de lactosa y como *E. coli* no es una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio. Para asegurar su identificación se destacan cuatro características importantes como son la producción de indol a partir del catabolismo del triptofano, la producción de ácidos por la vía de la fermentación de ácido mixta sin la necesidad de producir acetilmetilcarbonil, además de que este microorganismo no emplea al citrato como única fuente de carbono³.

Características serológicas

Los aislamientos de *E. coli* se diferencian en base a sus tres antígenos de superficie principales que permiten el serotipado: los antígenos **O** (somáticos), **H** (flagelos) y **K** (cápsula). La mayoría de los organismos de las cepas de *E. coli* son comensales inofensivos; sin embargo, algunas cepas son patógenas provocando varias consecuencias graves y de alto riesgo¹³.

Las cepas de *E. coli* que provocan enfermedades se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos **O:H** diferentes. Estas cepas incluyen cepas de *E. coli* enteropatógenas (ECEP), enterotoxigénicas (ECET), enteroinvasivas (ECEI), Uropatógenas (ECUP), enteroagregantes (EAggEC) y enterohemorrágicas (EHEC)⁷. Tabla 1.1

Tabla 1.1 Características de *E. coli*¹³

<i>Escherichia coli</i>	Factores de virulencia		TRANSMISION	ENFERMEDAD
	EXOTOXINA(S)	LESIONES PATÓGENAS		
Ordinaria	Hemolisina alfa	Inflamación	Flora adyacente	Oportunista
Uropatógena (ECUP)	Hemolisina alfa	Inflamación	Flora fecal, ascendente	Vías urinarias
Enterotoxigénica (ECET)	TL, TE	Hipersecreción	Fecal-bucal	Diarrea acuosa
Enteropatógena (ECEP)		F/B, intestino delgado	Fecal-bucal	Diarrea acuosa
Enteroinvasora (ECEI)		Invasión, inflamación, úlceras	Fecal-bucal	Disentería
Enterohemorrágica (ECEH)	Toxina Shiga	F/B, colon, hemorragia	Fecal-bucal, bovino	Diarrea sanguinolenta, SHU
Enteroagregadora (ECEAgg)		Biopelícula adherente		Diarrea acuosa mucoide

Factores de virulencia

PILI

Los pili son frecuentes en la superficie de las cepas de *E. coli*. Las investigaciones han demostrado que algunas de estas estructuras influyen en la virulencia como mediadoras de la fijación bacteriana a las superficies epiteliales humanas. Los pili manifiestan tropismo notable por los distintos tipos de células epiteliales, el cual depende de la disponibilidad del receptor específico sobre la superficie de la célula huésped. La mayoría de las especies de *E. coli* expresa pili de tipo 1 (ordinarios). Estos pili se fijan a los residuos de D-manosa que suelen encontrarse sobre la superficie de la célula endotelial y median, de esta manera, la adherencia a gran variedad de tipos de células².

Ciertas subpoblaciones de *E. coli* poseen pili más especializados. Los pili P (llamados también Pap o gal-gal) se unen a mitades de digalactósido (gal-gal) que se encuentran sobre ciertas células de mamíferos, como las uroteliales y los eritrocitos del grupo sanguíneo P. Otros pili se fijan a las células intestinales y cuentan con su propio grupo de especificidades. Los que se fijan a los eritrocitos humanos se denominan antígenos de factor de colonización (AFC) o pili formadores de heces (PFH) según el tipo de *E. coli* patógena participante y, posiblemente, el tipo de célula del tubo digestivo.¹

TOXINAS

E. coli puede producir todas las clases de toxinas que elaboran las enterobacterias, como una citotoxina formadora de poros, toxinas inhibidoras de la síntesis de proteínas y otras diversas que alteran las vías mensajeras de las células huéspedes^{2,7}.

La *hemolisina alfa* es una citotoxina formadora de poros que se inserta en la membrana plasmática de gran variedad de células huéspedes de manera semejante a como lo hacen la estreptolisina **O** y la toxina alfa de

Staphylococcus aureus. La toxina produce fuga del contenido citoplásmico y, finalmente, muerte celular.

La toxina *de Shiga* recibe su nombre en honor del microbiólogo que descubrió a *Shigella dysenteriae*; esta toxina se consideró inicialmente limitada a esta especie. En la actualidad se reconoce que existe en dos formas moleculares liberadas, por lo menos, por múltiples cepas de *E. coli* y *Shigella* cuando experimentan lisis. En los años que siguieron al descubrimiento de esta toxina, el término *toxina de Shiga* se reservó a la toxina original, mientras que otras se denominaron *del tipo de shiga*. Las toxinas del tipo Shiga son del tipo **AB**. La unidad **B** dirige la fijación a un receptor glucolípido específico (**Gb₃**) que se encuentra sobre las células eucariotas y entra en ellas dentro de una vacuola endocítica. Dentro de la célula, la subunidad **A** cruza la membrana vacuolar en la redcilla trans de Golgi, sale al citoplasma y modifica de manera enzimática el RNA ribosómico 28S de la subunidad ribosómica 60s mediante remoción de una base de adenina. Esto evita, mediante bloqueo de las síntesis de proteínas, la fijación al ribosoma del aminoacil tRNA dependiente del factor 1 de alargamiento, lo que tiene como consecuencia muerte celular.

La **toxina termolábil (TL)** es también una toxina **AB**. Su nombre se relaciona con la propiedad física de termolabilidad, que fue importante en su descubrimiento, y contrasta con la toxina termoestable. La subunidad **B** se fija a la membrana celular, y la subunidad **A** cataliza la ribosilación del ADP de una proteína **G** reguladora localizada en la membrana de la célula epitelial intestinal. Esta inactivación de parte de la proteína **G** produce activación permanente del sistema de adenilciclasa relacionada con la membrana y de una cascada de sucesos, cuyo efecto neto depende de la función biológica de la célula estimulada. Si la célula es un enterocito, el resultado es estimulación de la secreción de cloruro hacia el exterior de la célula y el bloqueo de la absorción de NaCl por ésta. El efecto neto es acumulación de agua y electrolitos en la luz intestinal. La estructura y el efecto biológico de la **TL** son muy semejantes a los de la toxina del cólera².

La **toxina termoestable (TE)** es un péptido pequeño (17 a 18 aminoácidos) que se fijan a un receptor de glucoproteína y da por resultado activación de una guanilciclase fija en la membrana. El incremento subsecuente de la concentración de **GMP** cíclico produce una secreción neta de líquidos y electrólitos hacia la luz intestinal semejante a la que origina la **TL**^{2,4,6}.

Reservorios

Generalmente se considera que el habitat “normal” de *E. coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos), ya que se pueden localizar estas bacterias en el medio externo, tradicionalmente se consideraba que su presencia representaba contaminación fecal, debido a que se sospechaba que no se podía reproducir en el medio exterior. Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso. Existen otras *E. coli* que viven en el tracto digestivo, como las *E. coli* patógenas que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital. También se ha demostrado que las poblaciones ambientales pueden incrementar de densidad poblacional en el tiempo, indicando que crecen y sobreviven en estos ambientes externos. Además existen datos que sugieren que existen cepas de *E. coli* que sobreviven y se reproducen en el suelo¹³.

E. coli es una de las especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto y de las heces de su madre. Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados. Usualmente hay una cepa dominante de *E. coli* por hospedero, sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión, hace que esta dominancia sea solo temporal y que la dinámica esté dictada por procesos tanto aleatorios como adaptativos.⁴

1.1.1 Características de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

EHEC es causante de gastroenteritis, diarrea sanguinolenta, y colitis hemorrágica; así como responsable de serias enfermedades asociadas principalmente con la contaminación de los alimentos; 10% de los casos evolucionan a complicaciones severas, incluyendo al síndrome urémico hemolítico (SUH) con un 5% de casos fatales. El primer aislamiento confirmado de *E. coli* del serotipo O157:H7 fue en 1975 en una mujer de California con diarrea sanguinolenta. La bacteria fue identificada por primera vez como patógeno humano en 1982, cuando fue relacionada con dos brotes de colitis hemorrágica producidos por alimentos^{3,8}.

En la actualidad se estima que hay 200 millones de casos de diarrea y 380 mil muertes al año en el mundo¹¹. A diferencia de la mayoría de los patógenos, *E. coli* O157:H7 es singularmente tolerante a los medios. Los estudios de inoculación han revelado que el serotipo O157:H7 puede sobrevivir a la fermentación, a la desecación, y al almacenamiento; durante un tiempo de hasta 2 meses a 4°C y con un pH de 3.6 a 3.9. Estas cepas producen una verotoxina, llamada así a causa de su actividad en las células vero, además de una toxina similar a la toxina Shiga (proteínas stx-1 y stx-2); además de que el serotipo O157:H7 es determinado por los genes *rfbE* y *fliC* que codifican respectivamente para la biosíntesis del lipopolisacárido O157 y la falgelina, lo que a su vez determina respectivamente los antígenos O y H, la patogenidad se debe a la expresión de varios genes que codifican para factores de virulencia. La aparición de ECEH se relaciona con su virulencia, su dosis infecciosa baja, su reservorio y los cambios en la industria moderna de la elaboración de los alimentos que provee al consumidor carne fresca. Es de importancia particular la dosis infecciosa baja, que se estima en 100 a 200 microorganismos por ingesta^{13,7}.

Reservorios de *E. coli* O157:H7

ECEH ha sido aislada de diferentes animales domésticos y silvestres como cerdos, cabras, ovejas y ciervos. Sin embargo, el ganado bovino se considera el principal reservorio de ECEH; tan solo el primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 descrito en el ganado vacuno fue en un ternero de menos de 3 semanas de edad con cocobacilosis en Argentina en 1977. Poco después un estudio del ganado vacuno en rebaños relacionados con dos casos de infección humana por *E. coli* O157:H7 reveló que el 2.3% de los terneros y el 3.0% de las novillas, eliminaban *E. coli* O157:H7. En consecuencia, con base a los brotes e infecciones esporádicas indican que el consumo de carne es la fuente más importante de infección de ECEH transmitidas por los alimentos^{8,11,31}.

Patogénesis

El aspecto distintivo de ECEH es la producción tanto de toxinas tipo Shiga como de las lesiones fijación y borradura (F/B) descritas para ECEP. ECEH ataca primordialmente al colon y la interacción con los enterocitos es muy parecida a la que tiene con ellos ECEP, salvo que las cepas de la primera no forman microvellosidades sobre la mucosa. La proteína de la membrana exterior llamada intimina media la adherencia, lo que produce alteraciones en el citoesqueleto del huésped².

Los aspectos de la lesión por (F/B) también son suficientes para producir diarrea no sanguinolenta. La toxina de Shiga elaborada produce trombosis capilar e inflamación de la mucosa del colon, cuya consecuencia es colitis hemorrágica. La toxina de shiga circulante se fija al tejido renal, en el que abunda de manera particular su glicoproteína receptora, y produce tumefacción glomerular y depósito de fibrina y plaquetas en microvasculatura³.

1.1.2 Características de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)

Las cepas de ECET son las causantes más importantes de diarrea del viajero en quienes visitan los países en desarrollo. Estas cepas también producen diarrea en los lactantes nativos de esos países, en los que son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad durante los dos primeros años de vida. Los brotes repetidos de diarrea debidos a ECET y otros agentes infecciosos son causas importantes de retraso del crecimiento, malnutrición y falta del desarrollo en países del tercer mundo en los que estas cepas son endémicas. La enfermedad por ECET es rara en las naciones industrializadas^{7,10}.

La transmisión se efectúa al consumir alimentos y agua contaminados por casos humanos o portadores. El peor riesgo de contagio está en los alimentos. Es rara la transmisión persona a persona, porque la dosis infectante tiene que ser elevada. Los animales no se ven afectados por ECET^{2,12}.

Patogénesis

La diarrea por ECET es producida por cepas de *E. coli* que elaboran enterotoxinas que se diferencian por su termoestabilidad: la enterotoxina termoestable (**TE**) y enterotoxina termolábil (**TL**). Las cepas que elaboran ambas enterotoxinas producen enfermedad más grave. La adherencia a las microvellosidades de la superficie por pili de la clase del factor de colonización es esencial para la descarga eficiente de la toxina de los enterocitos atacados. Los genes para la producción de **TE**, **TL** y para los factores de colonización suelen ser de origen plasmático y se adquieren por transferencia genética horizontal. **TE** se une a un receptor glicoprotéico que está acoplado a la guanilato ciclasa sobre la superficie de las células del epitelio intestinal. La activación de la guanilato ciclasa estimula la producción de monofosfato de guanosina cíclico (**cGMP**), lo que causa la secreción de electrólitos y de agua hacia la luz del intestino delgado, que se manifiesta en forma de una diarrea acuosa característica de la infección por ECET. **TL** se une a los gangliósidos específicos sobre las células epiteliales y activa la

adenilato ciclasa unida a la membrana, lo que produce un aumento de la producción de monofosfato de adenosina cíclico (**cAMP**), por el mismo mecanismo que utiliza la toxina del cólera. De nuevo, el resultado es la hipersecreción de electrolitos y agua en la luz intestinal^{2,3}.

Inmunidad

Aunque puede haber más de una crisis de diarrea, las infecciones por ECET pueden estimular la inmunidad. Los viajeros de naciones industrializadas sufren una tasa de ataque mucho más elevada que los adultos que viven en la región endémica. Esta inmunidad natural al parecer es mediada por **IgA** específica de las **TL**. Los **TE** pequeños no son inmunogénos. La enfermedad tiene una incidencia muy baja en los lactantes alimentados al pecho, lo que pone de relieve el efecto protector del anticuerpo materno y la importancia de la transmisión por alimentos y agua contaminados⁴.

Toxina AB (e/lt AB)

Las toxinas **AB** son enterotoxinas termolábiles que están formadas por una unidad enzimática (**A**) responsable de los efectos tóxicos una vez en el interior de la célula y una subunidad de unión (**B**). Las subunidades **A** aisladas son activas enzimáticamente por la **ADP** ribosilación de la proteína reguladora adenilato ciclasa, Gs; pero carecen de la capacidad de unirse y entrar en la célula, mientras que las subunidades **B** aisladas se unen a la célula diana pero no son tóxicas y son biológicamente inactivas. La subunidad **B** interacciona con el receptor ganglósido **GM1** sobre la células epiteliales intestinales ya que es la subunidad **B** es la determinante del daño celular. Existen dos mecanismos de transporte de endotoxinas **AB**, el primero se da cuando la subunidad **B** de la toxina dimerica **AB** se une al receptor específico de membrana de la célula para después darse un cambio conformacional creándose un poro a través del cual la subunidad **A** cruza membrana y entra en el citosol, quedando libre de nuevo en el sitio de unión. El segundo mecanismo es mediante la endocitosis mediada por el receptor que se comprende por la unión de la exotoxina dimerica a un complejo receptor ligando. Una vez dentro de la célula, la subunidad **A** se activa y

actúa como adenosin-ribosil-transferasa ocasionado la activación del adenilato ciclasa y aumento de los niveles de **cAMP** lo que provoca una elevada fosforilación de canales de cloro en la membrana de las células originando un incremento en la secreción de iones cloruro e inhibición en la absorción de iones sodio. El aumento de ambos iones en la luz del intestino causa la evacuación de agua por efectos osmicos, ocasionando diarrea secretora⁴.

1.3 Enfermedades de transmisión por alimentos (ETA)

Los alimentos pueden transmitir diversos microorganismos o metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre. En ocasiones, estos microorganismos se encuentran en los alimentos como consecuencia de su presencia en los tejidos de los animales vivos o bien, llegan con mayor frecuencia a los alimentos durante su elaboración, manejo u obtención. La contaminación de los alimentos tiene implicaciones graves desde un punto de vista de salud pública y es considerable con el con pérdidas millonarias para el sector público y privado. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se definen como enfermedades, infecciosas o tóxicas en la naturaleza, causadas por agentes que entran en el cuerpo a través de la ingestión de alimentos; aproximadamente un 75% de las nuevas enfermedades infecciosas humanas aparecidas en los últimos 10 años fueron causadas por bacterias, virus y otros patógenos que surgieron en animales y productos animales^{31,32,33}.

Todas las personas están en riesgo de contraer ETA; puesto que, los alimentos pueden contaminarse en cualquier eslabón de la cadena que va desde la producción hasta el consumo; por ello, todos los participantes en la cadena de suministro deben tomar medidas para mantener la inocuidad de los alimentos, desde el productor hasta el consumidor, pasando por el procesador y el vendedor ya que muchas de esas enfermedades humanas están relacionadas con la manipulación de animales domésticos y salvajes durante la producción de alimentos en los mercados y mataderos^{31,32,33,34,35}.

1.4 Panorama mundial y nacional de ETA

Las enfermedades transmitidas por los alimentos suponen una importante carga para la salud; millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. En el decenio pasado hubo brotes graves de enfermedades transmitidas por los alimentos en todos los continentes, y en muchos países la frecuencia de esas enfermedades está aumentando de forma significativa. La incidencia mundial es difícil de estimar, pero se informó que alrededor del mundo en el 2005 solamente 1.8 millones de personas

murieron a causa de estas enfermedades gastrointestinales. Se ha reportado que en países industrializados el porcentaje de la población que sufre de ETA ha llegado hasta un 30% cada año. En los Estados Unidos de América (EE.UU.), por ejemplo, existe un promedio de 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, dando como resultado alrededor de 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes anuales. En México, como en otros países de desarrollo, a la par con la economía del Estado existe una economía informal, entre cuyas actividades se encuentra la venta de alimentos en vía pública. Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede ser de alto riesgo sanitario, ya que, las condiciones en las que se expenden no son apropiadas porque favorecen la contaminación microbiológica. Por esta razón resulta de particular importancia tratar de determinar el impacto que la venta de alimentos en la vía pública tiene en la presentación de estas enfermedades; por desgracia en México no existen registros en cuanto a la notificación de casos de enfermedades gastrointestinales y su relación con el consumo de alimentos insalubres^{31,35,36}.

Los Estados Miembros, seriamente preocupados, adoptaron en el año 2000 una resolución en la cual se reconoce el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la salud pública^{34,35,36,37}.

1.5 Fuentes de microorganismos en los alimentos

Las fuentes naturales de los alimentos de origen animal incluyen piel, pelaje, plumas, tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio, además del conducto mamario. La microflora natural mantiene un equilibrio ecológico con sus huéspedes, y varían sus tipos y niveles ampliamente de acuerdo con el tipo de plantas y animales, y también de acuerdo con su ubicación geográfica y sus condiciones ambientales. Además de los microorganismos naturales, un alimento puede contaminarse con diferentes tipos de microorganismos que provienen de fuentes externas, como aire, suelo, agua, forraje, seres humanos, ingredientes de la comida, equipo, empaque e insectos.

Los alimentos perecederos y los que requieren mucha manipulación, son los más frecuentemente involucrados, entre ellos destacan los productos cárnicos y derivados de lácteos³⁸.

CARNES

La carne de los animales constituye la base de la alimentación humana, y su industria es una de las más importantes en el ámbito de la alimentación, ya que se trata de un alimento excelente por su alto valor nutritivo, debido a la riqueza proteica de su constitución. En un sentido distinto, la carne es uno de los alimentos más perecederos. Debido a sus características de composición, pH y actividad de agua, constituye un medio muy favorable para la mayor parte de las contaminaciones microbianas¹².

Origen de la microflora en la carne de bovino

La actividad del agua en tejido muscular magro de las carnes de mamíferos es de 0.99 con un contenido de agua del 74 al 80%. El contenido de proteína varía entre 15 y 22%. Las carnes intactas de mamífero poseen 2.5 a 37% de lípidos y su contenido de carbohidratos varía de 0 a 1.2 %.

El tejido muscular fresco es un ambiente muy favorable para el desarrollo microbiano y consecuentemente se altera relativamente rápido, salvo que se modifique o que se almacene en un medio ideado para retrasar la actividad y reproducción bacterianas. El contenido de agua muscular disponible es grande, lo mismo que el glucógeno muscular, péptidos, aminoácidos, iones metálicos y fósforo soluble; todo lo cual lo convierte en un sustrato muy conveniente para el desarrollo microbiano.

La actividad del agua se disminuye por deshidratación o de la adición de solutos como sal y azúcar, por lo que a medida que desciende la actividad del agua el crecimiento de algunos microorganismos alterantes cesa y se altera la microflora típica. Si bien se ha debatido sobre la esterilidad del tejido muscular, la facilidad relativa con que puede conseguirse en condiciones estériles sugiere que las poblaciones bacterianas de los músculos de los

animales sanos, si es que están presentes, son muy bajas. Hay cargas bacterianas en la piel, pelos, pezuñas de los rumiantes, así como en el tracto gastrointestinal. Ya que se admite que la mayoría de las bacterias de la carne de las canales proceden de la piel, pues inicialmente el tejido subcutáneo está libre de bacterias sin embargo, al exponerse al aire puede contaminarse con las procedentes de actividades propias de la carnización y del ambiente. Durante el desuello, las bacterias pasan de la piel al tejido subyacente con la primera incisión. La transferencia de bacterias a la carne acarea a partir de los aerosoles y polvo generados durante la separación de la piel así como por contacto con las manos de los operarios y por otros contactos de la piel y pelo de la superficie tisular expuesta al aire¹².

QUESOS

Se entiende por queso al producto fresco o maduro; sólido o semisólido, obtenido por separación del suero, después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada parcial o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados con o sin hidrólisis previa de la lactosa; y que den un producto final que posea las mismas características del producto definido y siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior al de la leche.²³

El queso como medio de crecimiento bacteriano

Al ser un alimento muy perecedero y nutritivo, el queso ha sido sometido a diversos tratamientos de conservación para así evitar la contaminación por microorganismos, que llevan a la alteración del producto manifestándose con olores extraños y cambios de textura y aspecto; además, con frecuencia se fabrican con leche cruda y de aquí que puedan contener cualquiera de los patógenos que existen en la leche como: *E. coli*, *Salmonella*, *Brucella* y *L. monocitogenes*. Como quiera que la maduración normal de estos quesos implica una alcalinización secundaria, existe un riesgo de que todos los patógenos presentes se puedan multiplicar hasta niveles peligrosos, tal como se ha comprobado mediante informes clínicos. Por consiguiente, la protección de los consumidores contra los riesgos bacteriológicos intrínsecos

de los quesos frescos se tiene que basar principalmente en la observación estricta de los métodos de fabricación segura, uso de leche pasteurizada y de agua de calidad potable, así como almacenamiento y distribución del producto comercializado a temperaturas aproximadamente de 5 °C¹².

1.6 Detección de patógenos

En el caso de la industria alimentaria, los alimentos son sometidos a una serie de controles microbiológicos para asegurar la ausencia o presencia de microorganismos que resulten en enfermedades y/o descartar la presencia de toxinas capaces de inducir intoxicaciones alimentarias. Por ello es importante conocer los métodos en los cuales se basa la identificación microbiana, ya que, no todos los microorganismos se identifican por las mismas técnicas, procurando utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles. En la mayoría de los casos la identificación no se realiza con base a un solo método, sino a la combinación de más de uno. Los métodos microbiológicos para investigar la presencia de bacterias patógenas en alimentos suelen ser metodologías rápidas basadas en técnicas tradicionales, métodos inmunológicos y métodos moleculares²⁸.

Métodos convencionales

Primeramente la morfología de las colonias de un microorganismo en medios selectivos proporciona un primer indicio en la identificación de bacterias; sin embargo, en el caso de la diferenciación de la familia *Enterobacteriaceae* se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético de los cromosomas bacterianos. Estas enzimas dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de una de las diversas vías que pueden detectarse con medios especiales usados en técnicas de cultivo *in Vitro*. Los sustratos con los cuales reaccionan estas enzimas se incorporan al medio de cultivo, junto con un indicador que detecta la utilización del sustrato la presencia de productos metabólicos específicos. Eligiendo una serie de medios que evalúan diferentes características

metabólicas de los microorganismos, es posible establecer un perfil Bioquímico para hacer la identificación de especie³⁰.

Sistemas específicos de identificación (API 20E)

El sistema de identificación API 20E es el método de referencia con el cual se compara la exactitud de otros sistemas. Las 21 características que pueden determinarse con el sistema API 20E están entre los grupos de pruebas más amplios de los sistemas instrumentales. El sistema identifica un alto porcentaje de bacterias en 24 horas sin necesidad de determinar características fisiológicas adicionales. Así, se maximiza la exactitud de la identificación de miembros de la familia Enterobacteriaceae. Castillo y Bruckner hallaron que el sistema API 20E identificó correctamente un 97,7% de 339 aislamientos clínicos y de stock⁶.

Reacciones de aglutinación

Los métodos serológicos, implican la utilización de preparación de inmunoglobulinas específicas provenientes del suero o de un reactivo, y que pueden ser de gran utilidad en la identificación microbiana. En términos generales el fundamento de esta prueba se basa en la reacción de un antígeno presente en el agente microbiano con su anticuerpo correspondiente manifestándose a simple vista como una aglutinación definida como la agregación inmunoquímica específica de partículas cubiertas con antígeno o anticuerpo y los antígenos están unidos a la superficie de las partículas mediante fuerzas eléctricas intramoleculares o por uniones químicas covalentes. El método de aglutinación en placa es práctico en las reacciones donde la aglutinación es visible pudiendo observarse en uno o dos minutos²⁸.

Métodos moleculares

Las técnicas moleculares también se utilizan cada vez más en la identificación, y son sin duda una excelente herramienta para detectar la presencia de un único patógeno específico o bien, identificar los patógenos de crecimiento lento o no cultivables. Técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la identificación de agentes etiológicos y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con más sensibilidad y rapidez³⁰.

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas; la primera consiste en la extracción y la purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante la PCR. Finalmente en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los segmentos amplificados de la PCR por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio^{27, 28}.

PCR Multiplex

La PCR multiplex es un método simple y muy versátil y tiene uso en todas las áreas donde se realice biología molecular. Lo que se persigue con esta técnica es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas: a) escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen oligómeros; b) que tengan temperaturas de anillamiento similares; c) que cada pareja amplifique una

única secuencia diana, y d) que generen fragmentos de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de ADN molde, por supuesto debemos intentar partir de la concentración menor posible y con ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra clínica de partida^{25,27}.

PCR en tiempo real

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas, como veremos más adelante, de manera especial.^{25,29}

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Detección de cepas patógenas de *Salmonella* spp, *Salmonella* Typhi, *E. coli* Enterohemorrágica y *E. coli* Enterotoxigénica; a partir de muestras de carne y queso fresco obtenidas de mercados y tianguis municipales en 7 estados de la república Mexicana

2.2 Objetivos específicos

- a) Aislamiento e identificación del género *Salmonella* y *E. coli* obtenidas en muestras de carne y queso de los diferentes muestreos a nivel nacional empleando medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento
- b) Identificación del género *Salmonella* y *E. coli* mediante el uso de pruebas bioquímicas (Batería API 20E).
- c) Identificación los serotipos aislados del género *Salmonella* y *E. coli* por el uso de antisueros específicos para cada género bacteriano.
- d) Determinación de la presencia de los genes *tyv*, *invA* y la subunidad 16S ribosomal en cepas de *Salmonella* spp y *Salmonella* Typhi aisladas, por: PCR multiplex y PCR tiempo real
- e) Determinación de la presencia de los genes *fliC* en cepas de ECEH y *e/t AB* en ECEH aisladas; por: PCR multiplex y PCR tiempo real

3. Justificación del proyecto

Debido a que alrededor del mundo mueren anualmente 2.2 millones de personas, de las cuales 1.8 millones son niños a causa de las ETA; y en México la secretaría de salud reportó en el 2010 un promedio de 128,000 casos de salmonelosis y 4,000³⁹ casos de fiebre tifoidea por el consumo de alimentos contaminados con *Salmonella* y *E. coli*; es preciso realizar estudios en este ámbito con base en métodos microbiológicos tradicionales y herramientas modernas tales como PCR multiplex y PCR en tiempo real, que estas últimas permiten reducir el tiempo de identificación de patógenos y que en combinación con los métodos tradicionales se pueden obtener resultados más confiables y eficaces.

Es de fundamental importancia realizar este estudio en carne bovina y quesos frescos debido a que la mayoría de los brotes en humanos por *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhi confirmados han sido relacionados con el consumo de carne cocida insuficientemente y, productos elaborados con leche no pasteurizada; de aquí que el ganado vacuno haya sido el objeto de muchos estudios para determinar su implicación para transmitir el patógeno³¹.

4. Hipótesis

La colonización del ganado bovino por enterobacterias, la falta de higiene y de buenas prácticas de manufactura en la producción de alimentos; así como los posibles orígenes de contaminación por contacto con heces; favorecen el desarrollo de microorganismos patógenos, por tal motivo, se podrá aislar *E. coli* y *Salmonella* en muestras de carne y queso fresco.

5.1 Materiales y metodología

Equipo

Balanza analítica Lab-Tech	Fuente de poder EC250-90
Centrifuga 5410 eppendorf	Termociclador convencional AXYGEN MAXYGENE
Autoclave Felisa de Reavel	Impresora UVP Mitsubishi
Parrilla eléctrica Cimarec	Lámpara U.V. UVP Epi Chemi II Darkroom
Vortex labinco L46	Termociclador SmartCycler by Cepheid
Cámara de electroforesis Horizon 11.14 by Biometra	

Cepas de Referencia y primers

Cepa de referencia para *Salmonella*: *Salmonella* Typhi ATCC 19430

Cepa de referencia para *E. coli*: *E. coli* O157:H7 ATCC 25922

Tabla 5.1 Secuencias y tamaño del primer para *Salmonella* Typhi, *Salmonella* spp, ECET y *E. coli* O157:H7

Especie	Gen	Tamaño (pb)	Secuencia
<i>Salmonella</i> Typhi	<i>tyv</i>	370	5'gcgcggaattcgccgtactgcctcaagtaaatttaaagttc3' 5'gcgcggaattcgccgtactgcctcaagtaaatttaaagttc3'
<i>Salmonella</i> spp	<i>invA</i>	500	5'tgttacggctatttgacca3' 5'-ctgactgctaccttgctgatg-3'
<i>Salmonella</i> spp	16S	500	5'agtttgatcatggctcag3' 5'ttaccgaggctggca3'
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>fliC</i>	175	5'gcgcggaattcgttggtcgttcgagaaccagcactggtagt3' 5'gcgcggaattcgccgactatacagtctcttacagcgt3'
<i>E. coli</i>	<i>elt</i> A	350	5'ttacggcgttactatcctctcta3' 5'ggtctcggtcagatatgtgattc3'

5.2 Obtención de las muestras

Se llevaron a cabo muestreos de queso fresco tipo ranchero y carne de bovino en mercados y tianguis ubicados en 6 estados de la República Mexicana: Estado de México, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Oaxaca, Puebla; y el Distrito Federal. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico estériles y rotuladas con en lugar de procedencia. El almacenamiento y el transporte se efectuó dentro de una hielera con refrigerantes y posteriormente se guardaron en refrigeración a 4° C.

5.3 Obtención de enterobacterias procedentes de carne y queso fresco

Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo

El primer paso consistió en cortar aproximadamente 5 gramos de la muestra. Para la carne se obtuvo una porción tanto de la profundidad del músculo como de la parte superficial; mientras que para el queso se cortó por mitad procurando extraer parte del interior; posteriormente, la muestra fue colocada en un tubo Falcom con 50 mL de caldo peptonado estéril y se incubó a 37° C por 18 h con agitación constante^{12,40,41}.

Enriquecimiento en medios líquidos selectivos

Tras dejar pasar el tiempo de preenriquecimiento se tomó una alícuota de 5 mL y se inoculó un nuevo tubo Falcom con 30 mL de caldo tetrionato y se incubó a 37° C por 18h con agitación constante.

5.4 Aislamiento diferencial en medios selectivos, diferenciales y específicos

A partir del cultivo obtenido en el medio líquido selectivo, se tomó una alícuota y se procedió a sembrar en medio agar Verde Brillante incubando a 37°C durante 18 - 24 h. Al término del tiempo, se examinaron las cajas en busca de colonias típicas de *Salmonella* y de *E. coli* con respecto a su capacidad para utilizar la lactosa; así como, de las características de las colonias que desarrollaron.

Las cepas de *Salmonella* obtenidas en el medio agar Verde Brillante se sembraron en agar salmonella y se incubaron a 37°C por 24 horas, se llevaron a un medio Salmonella Shigella y se incubaron a 37°C por 24 h; finalmente se inocularon en medio Rappaport a 37°C por 24 h.

Las cepas de *E. coli* desarrolladas en medio agar Verde Brillante se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron a 37° C por 18-24 h, de las colonias obtenidas se inoculó una caja con medio EC que se incubó a 45°C por 18 h^{12,40,41}.

De todas las colonias desarrolladas en cada uno de los medios se realizaron tinciones Gram para corroborar características macroscópicas y microscópicas.

5.5 Observación macroscópica y microscópica de las colonias en medios selectivos y diferenciales

Transcurridas las 18 a 24 h de incubación, en cada uno de los medios sólidos selectivos, se observaron las características morfológicas de las colonias desarrolladas, la evaluación de las características macroscópicas se llevó a cabo por medio de la inspección visual del crecimiento en la superficie de las placas de agar. Durante el examen las placas se inclinaron en diversas direcciones, con una iluminación directa brillante de modo que la luz se refleje en varios ángulos.

Una vez bien aisladas las colonias de interés, éstas se sembraron en agar nutritivo corroborando su pureza con una tinción de Gram.

5.6 Confirmación Bioquímica de las colonias sospechosas

Para la realización de esta prueba se emplearon cultivos jóvenes de 18 a 24 h provenientes de agar nutritivo, la escala de Mac Farland a 0.5% y el Kit API 20 E, que se trata de un sistema compuesto de 20 cúpulas conteniendo sustratos deshidratados, interpretados por la reacciones producidas durante el periodo de incubación.

La identificación Bioquímica se realizó inoculando la galería bajo las instrucciones del inserto y revelando los resultados mediante el software *apiweb*.

5.7 Extracción de DNA de las cepas aisladas de carne y queso fresco

Para la realización de esta prueba se emplearon cultivos jóvenes de 18 a 24 h y el Kit Instagene Matrix by Biorad.

En un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril se agregaron 50 μ L de Instagene y se resuspendieron 3 colonias jóvenes, la mezcla se homogenizó con ayuda de un vortex durante 30 segundos, después; los tubos se incubaron en baño de agua a 56°C por 30 minutos; pasado el tiempo, la mezcla se agitó nuevamente durante 15 segundos y a continuación los tubos fueron sometidos a un baño de agua en punto de ebullición durante 10 minutos; al término de ese tiempo, se homogenizó una vez más por al menos 10 segundos, posteriormente se procedió a centrifugar a 15000 rpm por 5 minutos. Finalmente se obtuvo el sobrenadante, donde se encontró el DNA.

5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex en punto final

En el desarrollo de esta metodología se utilizó DNA joven de 18 a 24 h a partir de su extracción para buscar los genes de interés que confirmarían el género bacteriano y los posibles serotipos en una reacción simultánea para hallar *Salmonella* y *E. coli* en una misma reacción. Se desarrolló un PCR multiplex en punto final para la detección de *Salmonella* y para la identificación de serotipos Enteritidis y Typhi con los genes subunidad 16S ribosomal, *invA* y *tyv*; así como también para el serotipo ECEH de *E. coli* con el gen *fliC*. Con ello se procedió a averiguar la presencia de estos genes en todas las cepas obtenidas de muestras de carne y queso fresco aisladas por medios selectivos y diferenciales e identificadas por API 20E.

Se realizó por separado una segunda reacción de PCR en punto final para detectar la presencia de ECET en las cepas de *E. coli* aisladas de las muestras de carne y queso por la amplificación del gen *elt AB*; la razón por la cual se elaboró aparte, es debido a que tiene una Tm distinta a los 4 genes estudiados.

Para ambas reacciones de PCR se preparó la premezcla con: 12.5 µL de Master mix taq pol1 (contiene: BaCl, buffer de PCR, dNTPs y la taq polimerasa 1), 6.9 µL de agua grado molecular y 0.6 µL 10µM de cada uno de los oligonucleotidos a amplificar. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como lo muestra la tabla 5.1.

En la primera reacción de PCR se situaron los genes *tyv*, *invA*, subunidad 16S ribosomal y *fliC*; estos fueron ensayos juntos en una PCR combinada o múltiple, con la posibilidad de detectar el ADN de algunos o ambos microorganismos a partir de una reacción única. Una segunda reacción de PCR se realizó únicamente para el gen de *elt AB*.

Los productos obtenidos por PCR fueron rebelados mediante el uso de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio para observar los fragmentos amplificados en un digitalizador de imágenes.

Tabla 5.1 Muestra las condiciones del PCR múltiplex y PCR en punto final para hallar los genes de interés para *Salmonella* y *E. coli*

	Especie	Gen	Condiciones de PCR
1ª Reacción	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>tyv</i>	Desnaturalización inicial: 94° C por 3 min Desnaturalización: 94° C por 30 seg Alineación: 60° C por 1 min Elongación : 72° C por 1 min Elongación final: 72° C por 13 min ciclos: 35
	<i>Salmonella</i> spp	<i>invA</i>	
	<i>Salmonella</i> spp	Sub 16S ribosomal	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ECEH	<i>fliC</i>	
2ª Reacción	ECEH	<i>elt AB</i>	Desnaturalización inicial: 94° C por 5 min Desnaturalización: 94° C por 30 seg Alineación: 45° C por 30 seg Elongación : 72° C por 30 min Elongación final: 72° C por 10 min ciclos: 35

5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Con el DNA bacteriano recién extraído se procedió a la búsqueda de los genes *tyv*, *fliC*, *invA*, *elt A* y *B* en cepas de *Salmonella* y *E. coli*.

Para la PCR se preparó la premezcla con: master mix 12.5 μL , agua grado molecular 9.3 μL , oligonucleótido 10 μM 0.6 μL , y SBRGreen 5X 1 μL . Se tomaron 2 μL de ADN bacteriano y se sumaron a los 23 μL de la premezcla. Cada reacción de PCR se realizó por separado a las siguientes condiciones, excepto el oligonucleótido *elt AB*: desnaturalización inicial a 94°C por 180 segundos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 56°C por 60 segundos, elongación a 72°C por 60 segundos y extensión final a 72°C por 900 segundos; durante 35 ciclos.

Para el gen *elt*; la reacción se llevó a cabo con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 180 segundos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 42°C por 60 segundos, elongación a 72°C por 60 segundos y extensión final a 72°C por 900 segundos; durante 38 ciclos.

5.10 Pruebas serológicas

Con las cepas de *Salmonella* y *E. coli* previamente identificadas se realizaron las pruebas de serotipificación empleando antisueros comerciales somáticos (O) y flagelares (H) para ambos géneros bacterianos por la técnica de aglutinación en placa.

Tabla 5.1 Antisueros empleados para la serotipificación de cepas aisladas

	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
	Poli a ₁ y Vi,	anti O157:H7
Antisueros comerciales	Complejo G	
	factor m	
	Anti-z29	
	factor t	
	anti-eh	
	factor p	
	polivalente (a,b,d)	

6. Resultados

6.1 Estudio de muestras en carne

Se analizaron un total de 65 muestras de carne de bovino provenientes de mercados fijos y sobre ruedas en 6 estados de la República Mexicana: 9 del Edo. México, 9 de Hidalgo, 9 de Guanajuato, 9 de Oaxaca, 11 de Puebla, 9 de Jalisco; y 9 del Distrito Federal; en busca de bacterias patógenas del género *Salmonella* y *E. coli*.

Se aplicaron 4 metodologías para el análisis de las muestras: aislamiento bacteriológico, PCR multiplex, PCR en tiempo real y pruebas serológicas.

Aislamiento bacteriológico

6.1.1 Desarrollo en medios selectivos y diferenciales

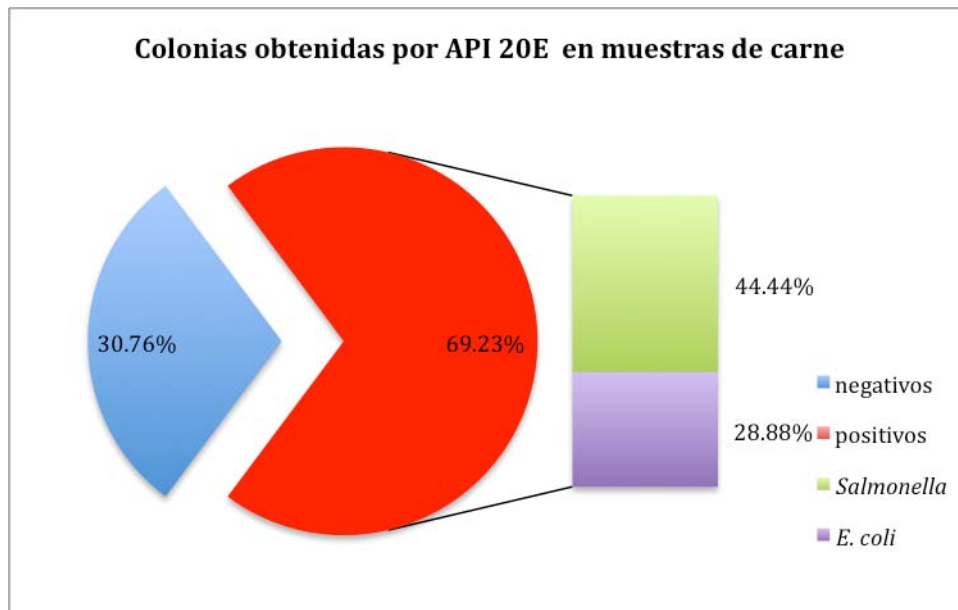
En la tabla 6.1 se observa que de las 65 muestras estudiadas, se halló que 45 de ellas presentaron desarrollo microbiano en medio agar Verde Brillante; así como en los medios Mac Conkey y Rapaport para bacterias gram negativas; donde, se obtuvieron colonias sospechosas de tratarse de *E. coli* y *Salmonella*; con base a la morfología característica que presentaron estos géneros. Las 20 muestras restantes no desarrollaron crecimiento de bacilos gram negativos en medios selectivos; por lo que, se pueden determinar como posibles inocuas. Se observa también, que los estados con mayor muestras contaminadas fueron Puebla, Guanajuato y el Distrito Federal.

Tabla 6.1. Cantidad de muestras de carne contaminadas e inocuas con respecto a su lugar de origen por medio de crecimiento en medios selectivos

Origen de la muestra	N	Número de muestras contaminadas	Número de muestras inocuas
D.F	9	7	2
Edo. México	9	5	4
Hidalgo	9	6	3
Guanajuato	9	7	2
Jalisco	9	6	3
Oaxaca	9	5	4
Puebla	11	9	2
Total	65	45	20

6.1.2 Confirmación de cepas de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de carne por API 20 E

La gráfica 6.1 indica en porcentaje la cantidad de muestras contaminadas, las inocuas; así como la relación que existe entre el número de muestras de carne y los aislamientos de enterobacterias obtenidos por medio del uso del microsistema API 20E. Del total de las 65 muestras analizadas, el 30.76% no presentó desarrollo de bacterias contaminantes mientras que el 69.23% resultó contaminada con algún tipo de enterobacteria, de ahí, en 44.44% de muestras positivas que equivale a 20 muestras la contaminación se debió a la presencia de *Salmonella* y en 28.88%, 13 muestras de carne a *E. coli*.



Gráfica 6.1. Muestra los porcentajes de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de carne en estados de la República Mexicana por batería API 20 E.

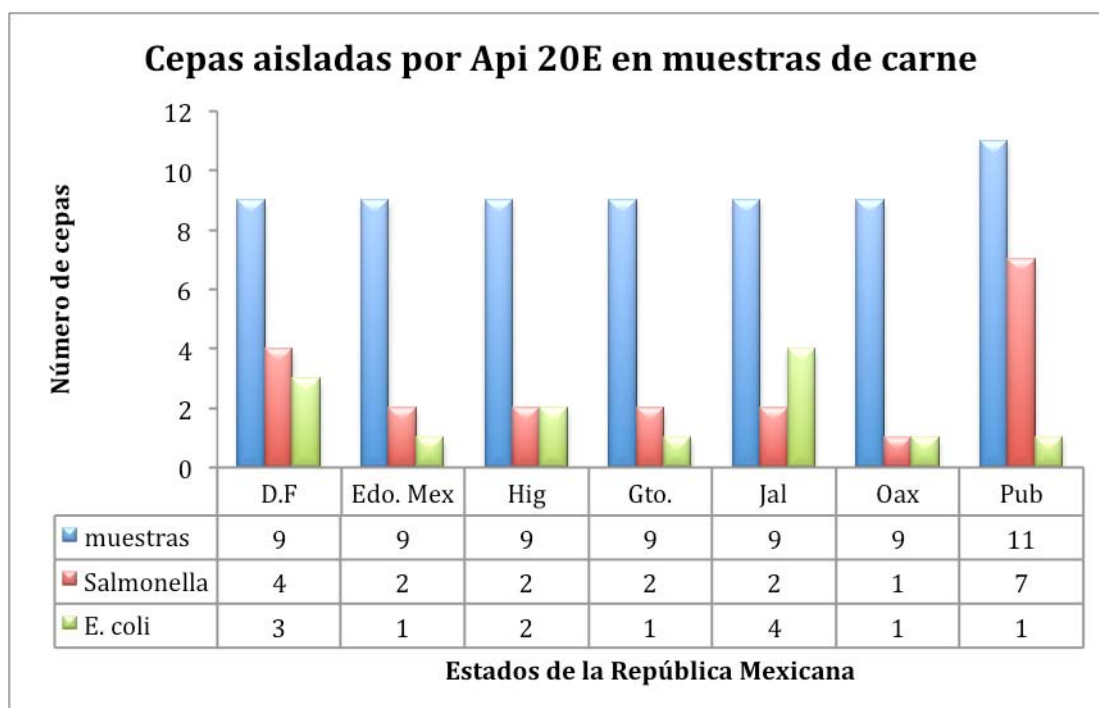
Tabla 6.2. Porcentaje de *Salmonella* y *E. coli* en 65 muestras de carne por API 20E

Muestras	Positivos			Negativos
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	Otros	
Carne 65	20	13	12	20
Porcentaje	30.76%	20.00%	18.46%	30.76%

Los resultados indican que es más probable encontrar una muestra contaminada con *Salmonella* (44.44%), *E. coli* (28.88%) o algún otro tipo de enterobacteria (26.66%) que inocua o libre de esta familia de bacterias, ya que solo el 30.76% resultó negativa, tal como lo muestra la tabla 6.2.

La identificación de las colonias que crecieron en medios selectivos para enterobacterias, se muestran en el gráfica 6.2, en donde se observa el muestreo en relación con el número de muestras contaminadas por *E. coli* y *Salmonella* en cada estado.

Gráfica 6.2. Cepas de *Salmonella* spp y *E. coli* obtenidas por Api 20E estados de la república Mexicana.

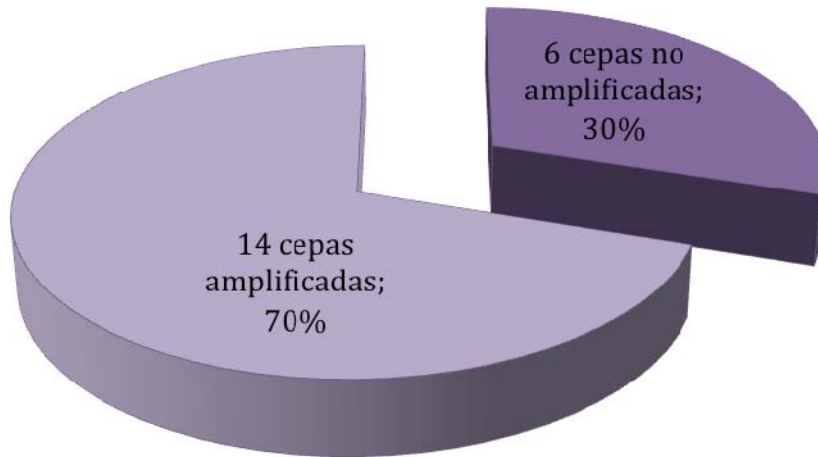


Los resultados indican que el estado de Puebla presentó 7 muestras contaminadas de 11 por *Salmonella*, siendo este el de mayor frecuencia de contaminación microbiana; seguido del D.F con 4 muestras positivas de 9 totales; mientras que para el resto de los 5 estados las muestras contaminadas oscilaron entre 1 y 2 positivas. Al analizar a *E. coli*, se observa que el estado de Jalisco presentó mayor cantidad de muestras contaminadas con 4 positivas de 9, seguido del D.F. con 3; dejando una vez más al resto de los estados con una o dos muestras representativas. Cabe mencionar que el estado con menor contaminación bacteriana en carne, fue el estado de Oaxaca al presentar tan solo una muestra positiva tanto de *Salmonella* como de *E. coli*; en contraste con el D.F. y Puebla los cuales demostraron ser los de mayor riesgo al tener 7 y 8 muestras contaminadas respectivamente.

6.1.3 PCR multiplex en punto final para determinar *Salmonella* en muestras de carne

La gráfica 6.3 indica que de las 20 muestras positivas a *Salmonella* identificadas por API 20E se realizó un PCR multiplex para la determinación de genes de patogenicidad. El ensayo llevado a cabo en una sola reacción para hallar 3 genes de *Salmonella* mostró que

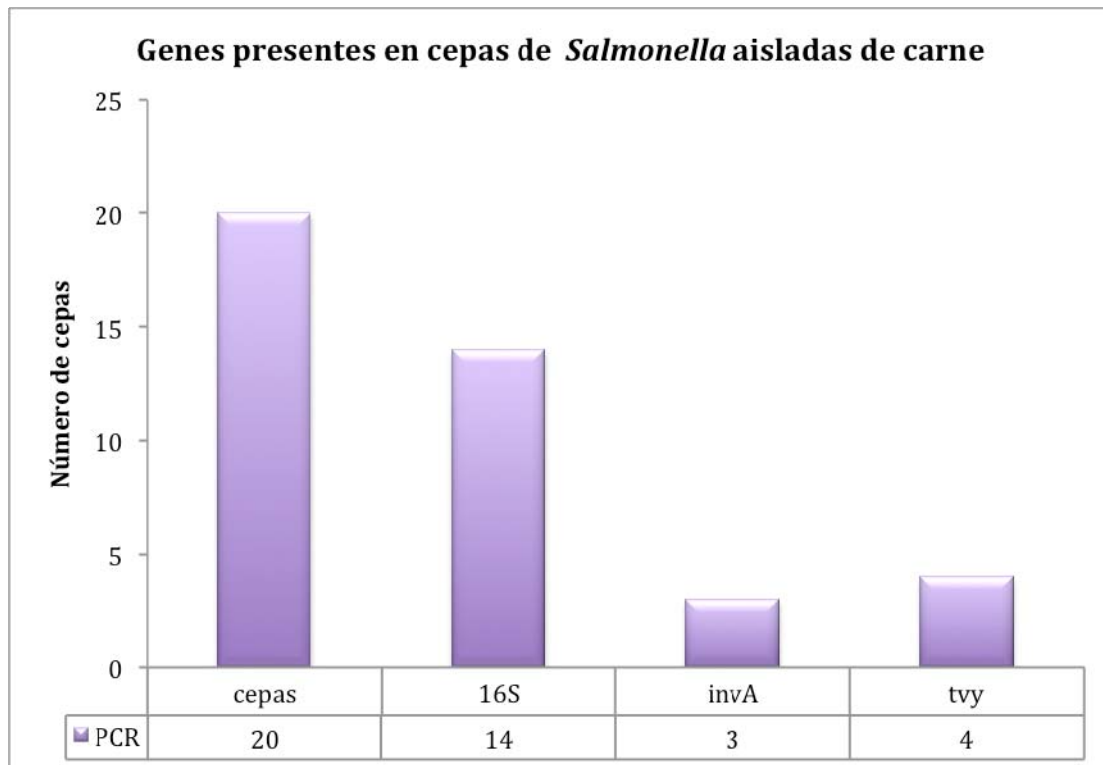
Identificación de *Salmonella* por PCR en muestras de carne



Gráfica 6.3. Muestra la cantidad de cepas de *Salmonella* que presentaron el gen 16S por PCR multiplex.

14 cepas de las 20 totales amplificaron al gen 16S ribosomal, lo que da como confirmado el género *Salmonella*. Las 6 cepas que no amplificaron con esta metodología puede decirse que no se trataba del género *Salmonella*, a pesar de ser identificadas mediante la batería bioquímica API 20 E; también, se encontró 3 cepas de estas que 14 poseían el gen *invA* para la invasión a los macrófagos, pudiendo tratarse de posibles patógenas. Para el gen *tyv* se identificó que 4 cepas expresaban este gen propio de *S. Typhi*, tal y como lo muestra la gráfica 6.4.

Grafica 6.4. Cantidad de genes presentes en cepas de *Salmonella* aisladas de muestras de carne por PCR multiplex



La especificidad y simultaneidad del PCR multiplex permitió la identificación de tres genes donde se pone de manifiesto que 16 de las 20 cepas se trataban del género *Salmonella* al presentar una amplificación del gen 16S; de esta cifra solo 3 cepas amplificaron al gen *invA* y 4 cepas presentaron el gen *tvy*. Esto reveló que una gran cantidad de muestras estaban contaminadas por *Salmonella*, sin embargo el riesgo de encontrar una *Salmonella* Typhi es relativamente bajo.

6.1.4 Serotipificación de los aislamientos de *Salmonella*

En la tabla 6.3 se observa la serología realizada a las 20 cepas de *Salmonella* confirmadas por API 20E, por PCR múltiplex y PCR en tiempo real. Esta metodología fue realizada con antisueros somáticos (O) y flagelares (H); con ello, se determinó serológicamente la presencia de factores de virulencia de *Salmonella*.

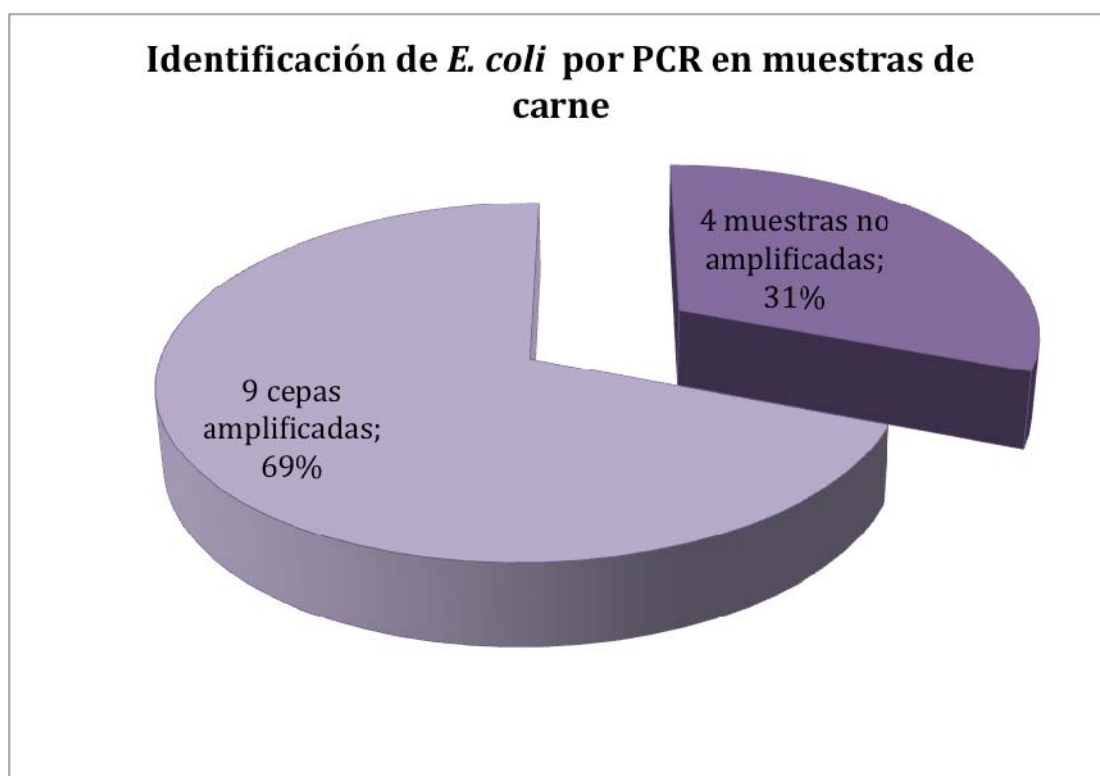
Los resultados dieron a conocer que habían 5 cepas de *Salmonella* Typhi, 4 de *Salmonella* Enteritidis y 2 de *Salmonella* Typhimurium, en las 64 muestras de carne de bovino estudiadas; los resultados de esta prueba muestran coherencia con los hallados en PCR multiplex; lo cual, conlleva a intuir que probablemente se trate de cepas patógenas; por otra parte, las cepas que no amplificaron ni aglutinaron no se descarta la posibilidad de que no sean patógenas; ya que, hace falta realizar pruebas complementarias para descartarlas.

cepa	GRUPO O			GRUPO H							Microorganismo identificado
	GRUPO D ₁	GRUPO D ₂	POLI A ₁ Y Vi	FACTOR m	FACTOR t	FACTOR s	COMPLEJ O G	Anti-eh	Anti-Z ₂₉	polivalente (a,b,d)	
Referencia	++++	++++	++++	+++			++++	++++	++++	++++	S. Typhi
Pueb. M-4C	++++	++++	+++	++			++			++	S. Typhi
Pueb. M-2C	+++					++		+++			S. Enteritidis
Pueb. M-1C					+++		+++			++	NS
Pueb. M-3C	++				++++		++++	++++		++++	S. Enteritidis
Pueb M-10C	+++		+++		+++		+++			++++	S. Thyphi
Oax. M-5C	++					++++					S. Enteritidis
Oax. M-6C	+++					++				+	S. Enteritidis
Hgo M-5C	++			+++	+++	+++				++	S. Typhimurium
D.F. M-2C	+++			+++		++	++			+	S. Typhimurium
D.F. M-6C	+++		++			+++					S. Typhi
Edo. MéxM-3C										++	NS
Edo. Méx. M-4C	+++	++	+++	+++							S. Typhi
Gto M-4C	+++			+++		++				+++	S. Typhi
Jal. M-5C			++								NS

Tabla 6.3 Identificación de serotipos de *Salmonella* spp mediante pruebas serológicas en muestras de carne.

6.1.5 PCR multiplex en punto final para determinar *E. coli* en muestras de carne

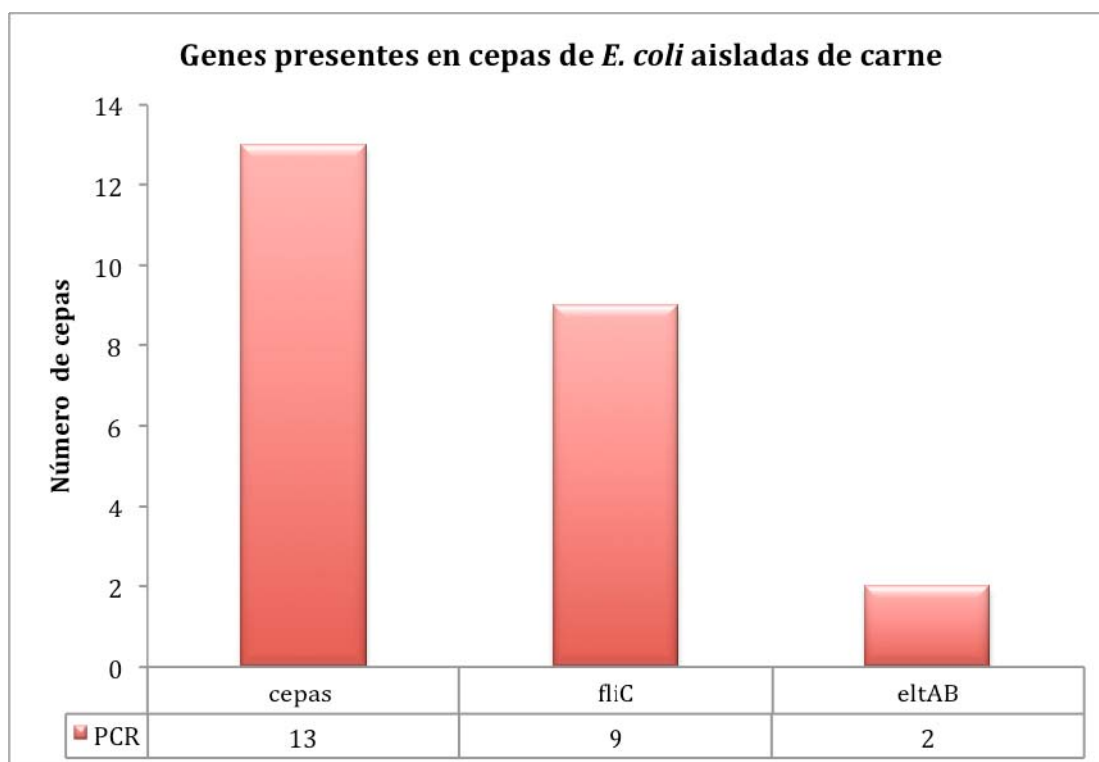
La reacción de PCR multiplex para hallar el gen *fliC* presente en *E. coli* se realizó simultáneamente con los 3 genes estudiados de *Salmonella* y se encontró que de las 13 muestras positivas a *E. coli* mediante el uso de API 20E, 9 cepas amplificaron a este gen, con probabilidad de que se trate del patotipo ECEH O157:H7.



Grafica 6.5. Muestra los porcentajes y cantidades de cepas que alojaban a los genes *elt* y *fliC* en muestras de carne por PCR

Las gráficas 6.5 y 6.6 revelan que de un total de 13 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de carne, 9 de ellas presentaron el gen *fliC* correspondiente a *E. coli* O157:H7 y solo 2 amplificaron al gen *elt* AB. La reacción de PCR en punto final para encontrar cepas de ECET con el gen *elt* AB se llevó a cabo en una sola reacción, ya que las condiciones de la reacción fueron distintas al resto de los genes estudiados.

Gráfica 6.6. Cantidad de genes presentes en cepas de *E. coli* por PCR multiplex en muestras de carne



6.1.6 Serotipificación de los aislamientos de *E.coli*

En la tabla 6.3 se observa la serológica realizada a las 13 cepas de *E. coli* aisladas de carne e identificadas por API 20E, PCR multiplex y PCR en tiempo real. La prueba se realizó por aglutinación con antisuero anti-O157:H7, con esto se pudo confirmar la identificación del patotipo ECEH O157:H7. Los resultados revelan que de estas 13 cepas, 7 dieron positivas a la cepa *E. coli* O157:H7, descartando a las 5 cepas restantes de tratarse de este seropatotipo, sin embargo, no es posible descartarlas de ser algún otro patotipo

Tabla 6.4. Identificación de *E. coli* O157:H7 mediante pruebas serológicas en muestras de carne de bovino

cepa	Grupo O	
	Anti- O157:H7	Microorganismo identificado
Referencia	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
1	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
3	+++	<i>E. coli</i> O157:H7
4		NS
6		NS
8	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
9	++++	NS
10	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
11	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
12		NS
17	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
18	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
19		NS
28		NS

NS = No Serotificable

Tabla 6.5. Porcentaje de contaminación por *Salmonella* y *E. coli* en muestras de carne por medio de análisis bacteriológico y PCR en tiempo real

Origen	N	Método convencional				PCR en tiempo real			
		<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>	
		+	%	+	%	+	%	%	%
D.F	9	4	44.44	3	33.33	4	44.44	2	22.22
Edo. Mex	9	2	22.22	1	11.11	1	11.11	1	11.11
Hig	9	2	22.22	2	22.22	1	11.11	2	22.22
Gto.	9	2	22.22	1	22.22	1	11.11	1	11.11
Jal	9	2	22.22	4	44.44	2	22.22	3	33.33
Oax	9	1	11.11	1	11.11	1	11.11	1	11.11
Pub	11	7	63.63	1	9.09	6	54.54	1	9.09
total	65	20	30.76	13	20.00	16	24.61	11	17.18

Los resultados indican que el estado con mayor contaminación por *Salmonella* fue Puebla al presentar 63.63% de esta bacteria muy por encima del resto de todos los demás estados, lo que se traduce como de mayor riesgo al momento de adquirir e ingerir carne en esta zona; en comparación

con el estado de Oaxaca donde comprar carne tiene bajo riesgo, sólo el 11.11% de las muestras se encuentran contaminadas con *Salmonella*. Sin embargo, de las Salmonelas aisladas e identificadas en estas muestras de carne se encontró que algunas contenían genes que codifican para factores de virulencia lo que las hace posibles cepas patógenas, una vez más Puebla resultó ser el más el alto en contaminación por esta enterobacteria en comparación con los 6 estados restantes en una situación general y baja en contaminación, empero, eso no significa que las cepas que no presentaron estos genes no sean patógenas, se requeriría buscar si poseen otro tipo de genes para diferentes factores de virulencia no estudiados en este trabajo.

Para *E. coli*, el estado más crítico fue Jalisco al exponer un 44.44% de muestras contaminadas seguido del estado de Oaxaca con un 22.22% pero al realizar reacciones de PCR se observa una ligera disminución de muestras positivas, esto se debe a que aquí se buscaron genes de interés relacionados con la patogenicidad de las cepas de *E. coli* halladas en las muestras de estos 7. Cabe mencionar que las cepas que dieron nuevamente negativos a reacciones de PCR con estos genes se no descarten como positivos para el resto de los patotipos existentes para *E. coli*.

Todo esto deja de manifiesto que técnicas como PCR multiplex y en tiempo real facilitan el trabajo en el laboratorio al ser metodologías rápidas y sencillas con resultados confiables y conociendo los genes de virulencia, permitiendo declarar con mayor certeza si se trata de cepas patógenas, en comparación con análisis bacteriológico.

6.2 Estudio en muestras de queso

Aislamiento bacteriológico

Se estudiaron 64 muestras de queso fresco provenientes de mercados fijos y sobre ruedas en 6 estados de la República Mexicana: 9 del Edo. México, 9 de Hidalgo, 9 de Guanajuato, 9 de Oaxaca, 10 de Puebla, 9 de Jalisco y 9 del Distrito Federal. En las muestras se buscó aislar *Salmonella* y *E. coli* con ayuda primeramente de medios selectivos para enterobacterias y posteriormente con metodologías de biología molecular.

6.2.1 Desarrollo en medios selectivos y diferenciales

Los resultados indicados en la tabla 6.6 muestran que los medios selectivos y diferenciales lograron aislar 36 muestras sospechosas de tratarse de *E. coli* y/o *Salmonella*; mientras que 28 muestras se descartaron de contener contaminación microbiana. Para el caso de quesos frescos, el estado con mayor contaminación fue Jalisco, seguido del de Puebla, en contrariedad con Hidalgo, estado con menor número de muestras positivas.

Tabla 6.6. Cantidad de muestras de queso contaminadas e inocuas con respecto a su lugar de origen por medio de crecimiento en medios selectivos

Origen de la muestra	N	Número de muestras contaminadas	Número de muestras inocuas
D.F	9	4	5
Edo. México	9	7	2
Hidalgo	9	3	6
Guanajuato	9	4	5
Jalisco	9	9	0
Oaxaca	9	4	5
Puebla	10	5	5
Total	64	36	28

6.2.2 Confirmación de cepas de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de queso fresco por API 20E

Los resultados obtenidos revelaron que el 43.75% de las muestras de queso fresco resultaron negativas a contaminación bacteriana, mientras que el 56.25% mostró desarrollo de bacilos gram negativos. De ahí que 25.00% de las muestras se encontraban contaminadas con *Salmonella*, el 23.43% con *E. coli* y un 7.81% con otro tipo de enterobacteria tal y como lo muestra la gráfica 6.7.



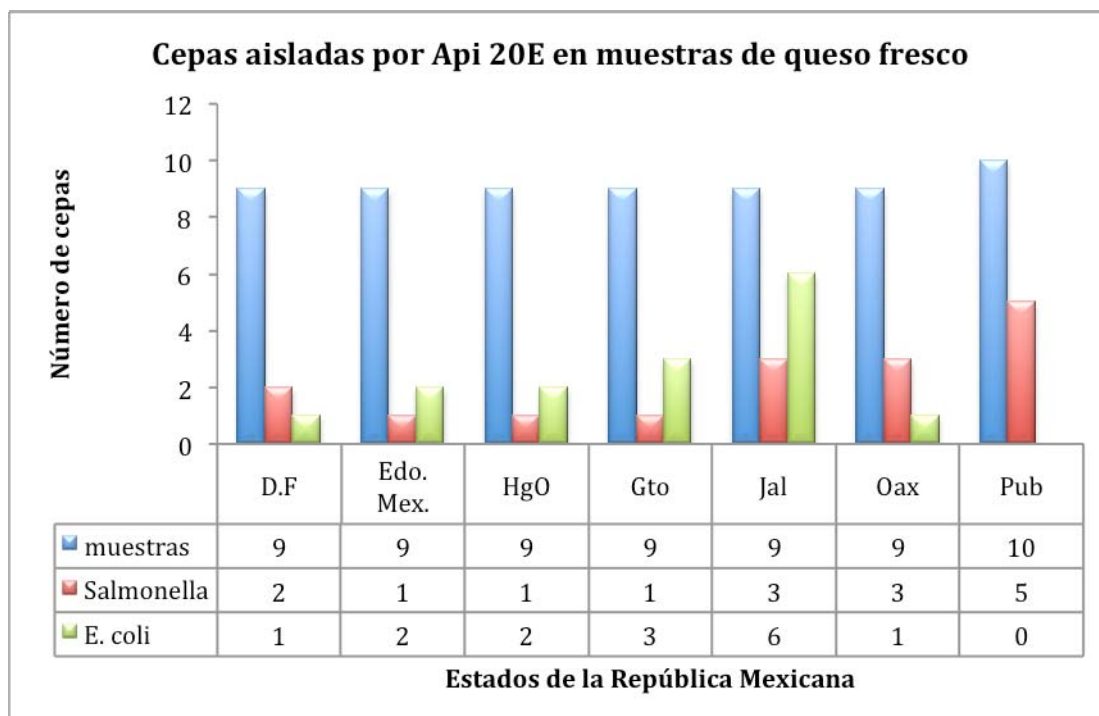
Gráfica 6.7. Muestra los porcentajes de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de queso fresco en 7 estados de la República mexicana por batería API 20 E.

Tabla 6.7 . Porcentaje de *Salmonella* y *E. coli* en 64 muestras de queso fresco por batería API20 E

Muestras	Positivos			Negativos
	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	Otros	
Carne 65	16	15	5	28
Porcentaje	25.00%	23.43%	7.81%	43.75%

Como se observa en la tabla 6.7, la contaminación por *Salmonella* y *E. coli* es considerablemente alta; más de la mitad de las muestras estudiadas se encontraron contaminadas con la familia *Enterobacteriae* lo que se traduce como un riesgo a la hora del consumo de queso fresco por sus consecuencias relacionadas con enfermedades gastrointestinales.

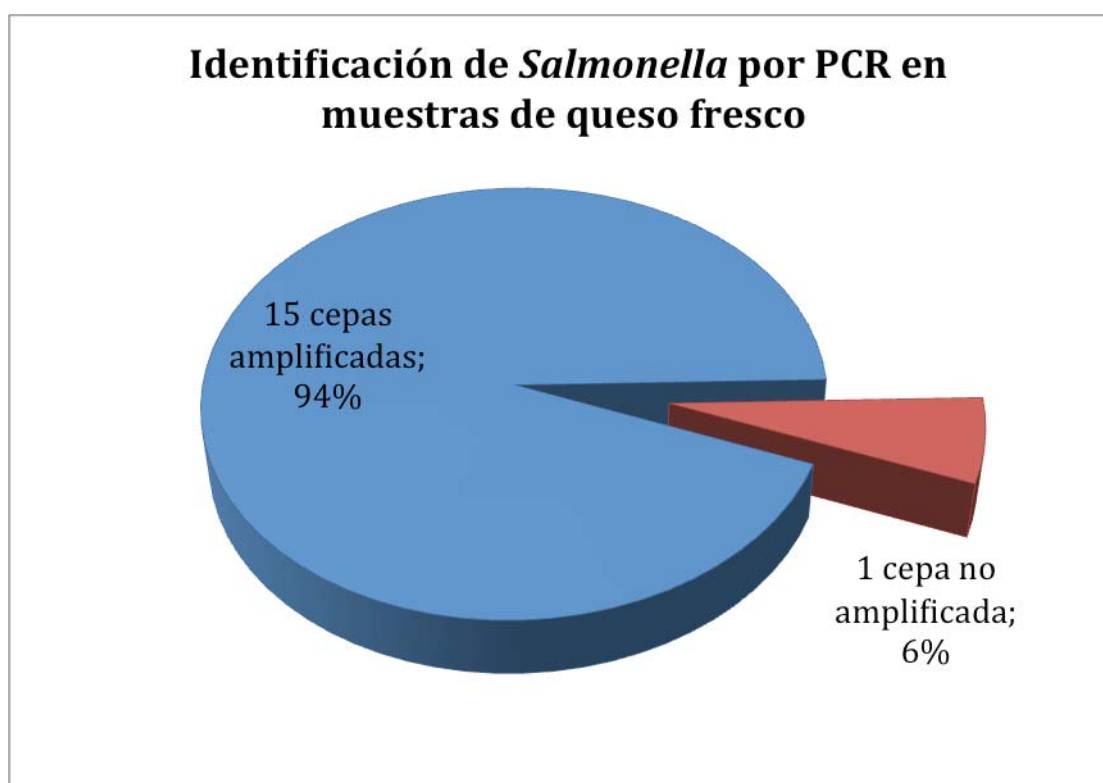
Gráfica 6.8. Cepas de *Salmonella* y *E. coli* obtenidas por Api 20E en 7 estados de la república Mexicana.



Como se aprecia, el mayor número de pruebas positivas resultaron en el estado de Puebla con 7 muestras contaminadas de *Salmonella*, en segundo término están los estados de Oaxaca y Jalisco. El resto solo presentaron una o dos muestras contaminadas. De las 9 muestras analizadas del estado de Jalisco 6 presentaron contaminación con *E. coli*, en contraste con Puebla al no reportar ninguna muestra contaminada. El estado de Jalisco es el más riesgoso para consumir cualquiera de estos dos productos.

6.2.3 PCR multiplex en punto final para determinar *Salmonella* en muestras de queso fresco

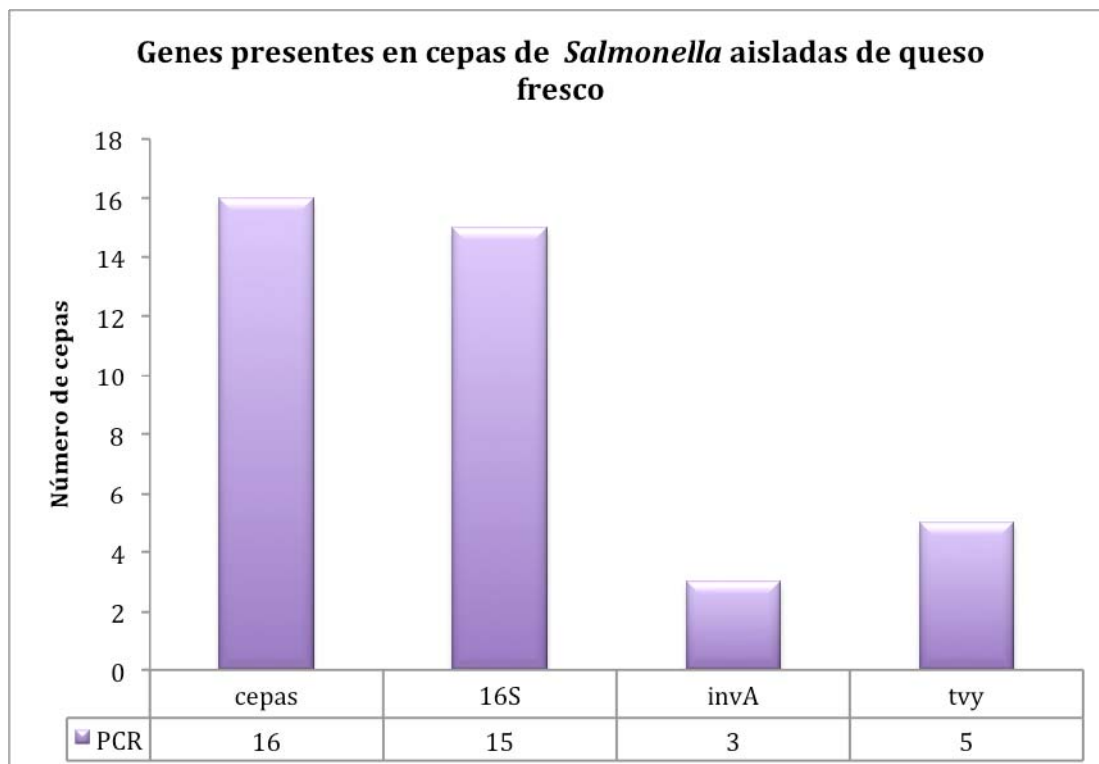
De un total de 16 muestras positivas a *Salmonella* spp encontradas en queso fresco mediante el empleo de API 20E, se halló que el 94% equivalente a 15 cepas amplificó a la gen 16S ribosomal, mostrando ser posiblemente patógena con capacidad potencial a desarrollar una enfermedad gastrointestinal; mientras que solo una cepa, el 6 % no amplificó a este gen; por lo que se descarta de ser parte de este género.



Gráfica 6.9 Muestra la cantidad de Salmonellas que amplificaron al gen 16S

El hecho de que la mayoría de las cepas de *Salmonella* presentaron tener el gen subunidad 16S ribosomal no da cabida a que todas sean patógenas, ya que de este total solo 3 resultaron tener el gen *invA* con capacidad de invadir macrófagos, de estas, solo 5 implicaron tratarse de *Salmonella* Typhi al amplificar el gen *tyv* correspondiente únicamente a este patotipo tal y como lo demuestra la gráfica 6.10.

Grafica 6.10. Cantidad de genes presentes en cepas de *Salmonella* aisladas de muestras de queso fresco por PCR multiplex



con respecto a las 15 cepas aisladas de muestras de queso fresco se halló que apenas 3 y 5 cepas respectivamente arrojan tener alguno de los dos genes en cuestión para dar a conocer si se podía discutir su presunta patogenicidad.

6.2.4 Serotipificación de los aislamientos de *Salmonella*

La serología realizada en las 16 cepas de queso fresco aisladas por medios selectivos y diferenciales e identificadas por API 20 E y PCR multiplex y PCR en tiempo real se llevó a cabo mediante el uso de antisueros somáticos (O) y flagelares (H) para tener una prueba más y poder confirmar el seropatotipo; los resultados fueron: 5 cepas de *Salmonella* Typhi, 4 de *Salmonella* Enteritidis y 2 de *Salmonella* Thyphimurium; una vez más se observa que los datos de serología son muy similares a los obtenidos por PCR multiplex y PCR en tiempo real; cabe mencionar que los antisueros no eran los suficientes como para identificar otros patotipos; por lo que, quizá las cepas que alojaron resultados negativos, no pueden descartarse su posible patogenicidad hasta no realizar más pruebas.

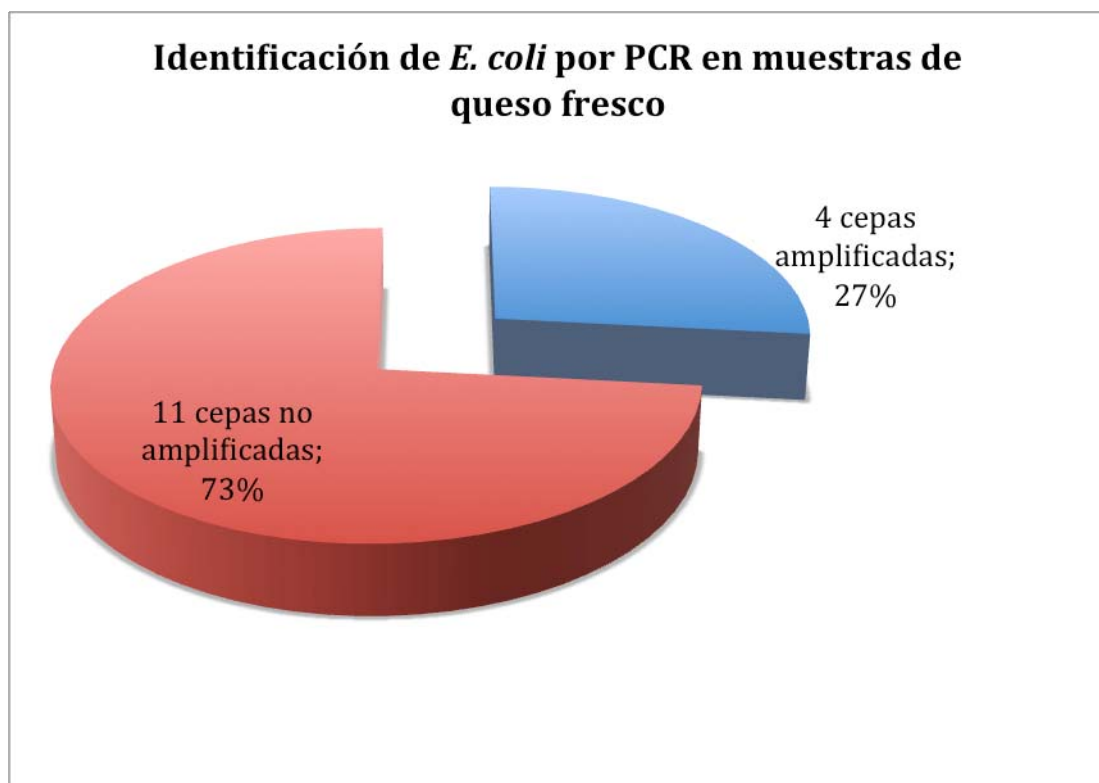
Tabla 6.8. Identificación de serotipos de *Salmonella* spp mediante pruebas serológicas en muestras de queso fresco.

cepa	GRUPO O			GRUPO H							Microorganismo identificado
	GRUPO D ₁	GRUPO D ₂	POLI A ₁ Y Vi	FACTOR m	FACTOR t	FACTOR s	COMPLEJO G	Anti-eh	Anti-Z ₂₉	polivalente (a,b,d)	
Referencia	++++	++++	++++	+++			++++	++++	++++	++++	S.Typhi
Gto. M-9Q	++++	++++	++++	++++				+++	++++	+++	S.Typhi
Pueb. M-4Q							++				NS
Pueb. M-10Q			++		++		+	+	+++	+++	NS
Pueb. M-5Q	++		++++	+++	+++	+++	+++			++++	S. Typhi
Oax. M-6Q	++				++	+++					S. Typhimutium
Oax. M-3Q	+++		++	++		++	+++			+	S. Typhi
Oax. M-7Q											NS
Oax.M-9Q	++	++	+++	++							S. Typhi
Jal. M-3Q	+++			++		+++		+++		++++	S. Enteritidis
Jal. M-2Q	+++	+++	+++				++++			+	S. Typhi
Jal. M-1Q							++++				NS
Hgo. M-3Q	++			+++		+++	++++				S. Enteritidis
Edo.Mex M-6Q					++		+	+		++	NS
D.F. M-6Q									+	+	NS
D.F. M-7Q	++					++					S. Enteritidis

NS = No serotipificable

6.2.5 PCR multiplex en punto final para determinar *E. coli* en muestras de queso fresco

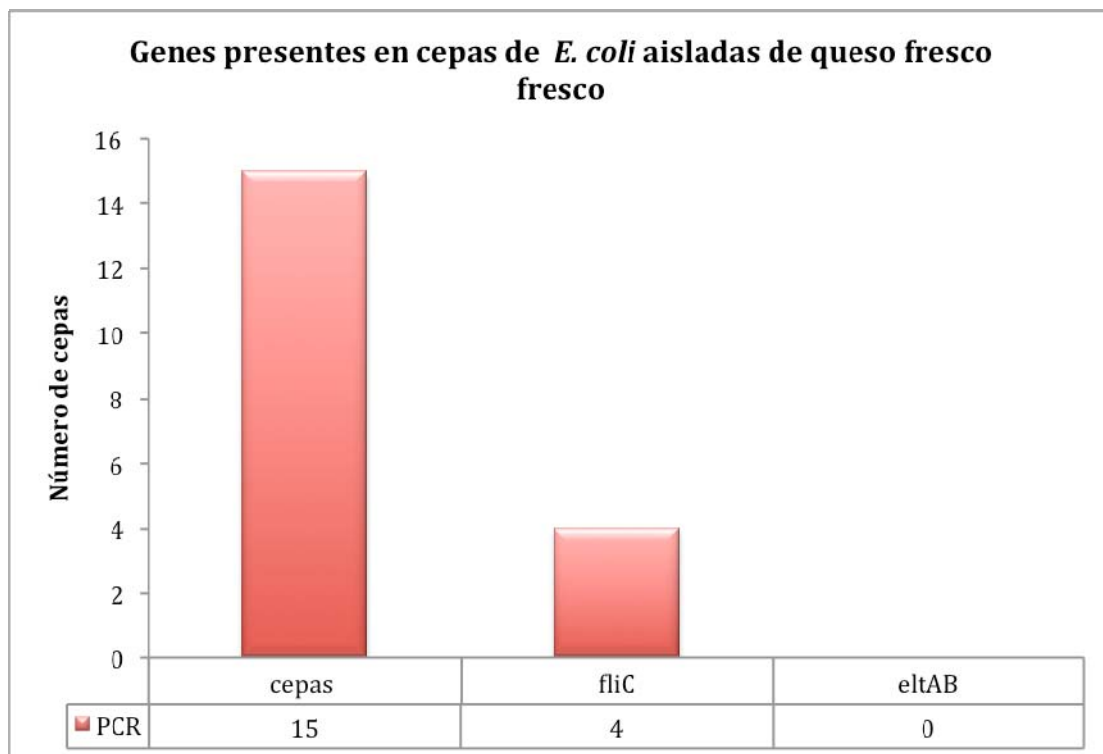
El PCR multiplex realizado a las 15 cepas aisladas de queso fresco mostraron resultados medianamente altos en cuanto a la identificación del serotipo ECEH, 4 cepas amplificaron a este gen equivalente al 27% en oposición con 11 cepas no amplificadas. Con otro PCR de punto final para encontrar cepas de ECET se vió una ausencia de este seropatotipo, dejando de manifiesto que no existió contaminación con la cepa de *E. coli* característica de la diarrea del viajero.



Grafica 6.11. Muestra los porcentajes y cantidades de cepas que alojaban a los genes *e/t AB* y *fliC* en muestras de carne por PCR

La representación gráfica del número de cepas patógenas pertenecientes al serotipo ECEH muestra que resultaron 4 cepas amplificadas al gen *fliC* de las 15 aisladas y ninguna cepa presente de ECET; lo que representa un riesgo mayor de hallar una ECEH en lugar de una ECET en el consumo de este producto; sin embargo, independientemente del serotipo encontrado existe una clara indicación de tratarse de contaminación fecal. Gráfica 6.12

Gráfica 6.12. Cantidad de genes presentes en cepas de *E. coli* por PCR multiplex aisladas de muestras de queso fresco.



6.2.6 Serotipificación de los aislamientos de *E. coli*

En el caso de muestras de queso; los resultados revelan que 3 cepas de *E. coli* se trataban de *E. coli* O157:H7 de las 13 cepas totales; los resultados obtenidos con PCR multiplex muestran concordancia con esta prueba; con la combinación de ambas metodologías se reporta un resultado más confiable al momento de especificar si se trata de cepas patógenas, por los factores que les confieren esa capacidad.

Tabla 6.9. Identificación de *E. coli* O157:H7 mediante pruebas serológicas en muestras de queso fresco

cepa	Grupo O	Microorganismo identificado
	Anti- O157:H7	
Referencia	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
2		
5		
7	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
13		
14		
15		
16		
20		
21		
22		
23		
24		
25	++++	<i>E. coli</i> O157:H7
26	++	<i>E. coli</i> O157:H7
27	+	<i>E. coli</i> O157:H7

Tabla 6.10. Porcentaje de contaminación en muestras de carne por API 20E y porcentaje de patogenicidad en cepas de *Salmonella* y *E. coli* por PCR multiplex y en tiempo real.

Origen	N	Método convencional				PCR en tiempo real			
		<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		+	%	+	%	+	%	+	%
D.F	9	2	22.22	1	11.11	2	22.22	0	0
Edo. Mex	9	1	11.11	2	22.22	1	11.11	0	0
Hig	9	1	11.11	2	22.22	1	11.11	0	0
Gto.	9	1	11.11	3	33.33	1	11.11	1	11.11
Jal	9	3	33.33	6	66.66	2	22.22	1	11.11
Oax	9	3	33.33	1	11.11	3	33.33	0	0
Pub	10	5	50	0	0	5	50.00	2	20.00
total	64	16	25.00	15	23.43	15	23.43	4	6.25

Los resultados mostrados en esta tabla corresponden a la identificación de cepas tanto de *Salmonella* como de *E. coli* con análisis bacteriológico y PCR tiempo real; aquí se observa en términos generales, que el porcentaje total de *Salmonella* vía método convencional es del 25% comparado con un 23.43% de identificación por tiempo real; se ve una disminución clara en el porcentaje de identificación debido a que en la prueba de PCR se buscaron ciertos serotipos mostrados en la gráfica 6.10, pero con la combinación de ambas técnicas se llega a un resultado más confiable y eficaz. Para el caso de *E. coli* se ve exactamente lo mismo, de un 23.43% de identificación por método convencional bajo hasta un 6.25% de identificación por PCR, la razón: con PCR se buscó en específico cepas de ECEH tal y como lo muestra la gráfica 6.12; donde se observan solo 4 cepas de *E. coli* O157:H7, en comparación con análisis bacteriológico en donde solo se aislaron cepas de *E. coli* de cualquier serovariedad.

El estado de Puebla una vez más expone ser el más peligroso, pues con un 50% de muestras contaminadas por *Salmonella* deja claro el peligro al momento del consumo de carne en este lugar; el PCR mostró 5 cepas patógenas. Para *E. coli* los estados con el porcentaje más alto fueron Jalisco y Puebla; en este último, se hallaron 2 cepas patógenas en queso fresco;

mostrando así que no hay un buen control de los quesos que se distribuyen y se consumen el centro de la República Mexicana.

6.3 Estudio molecular en muestras de carne y queso fresco

6.3.1 Amplificación de los genes *tyv*, *invA* y subunidad 16S ribosomal en *Salmonella*

En la figura 1 se observa la amplificación de los fragmentos de: 500 pb correspondientes al gen 16S ribosomal en cepas de *Salmonella*, 500 pb que corresponde al gen *invA* en cepas de *Salmonella* y 370 pb pertenecientes al gen *tyv* en cepas de *Salmonella* Typhi.

De las 36 cepas de *Salmonella* spp aisladas en muestras de carne y queso fresco, se hallaron 39 positivas al gen 16S, 6 al gen *invA* y 9 al gen *tyv*. (gráficas 6.4 y 6.10)

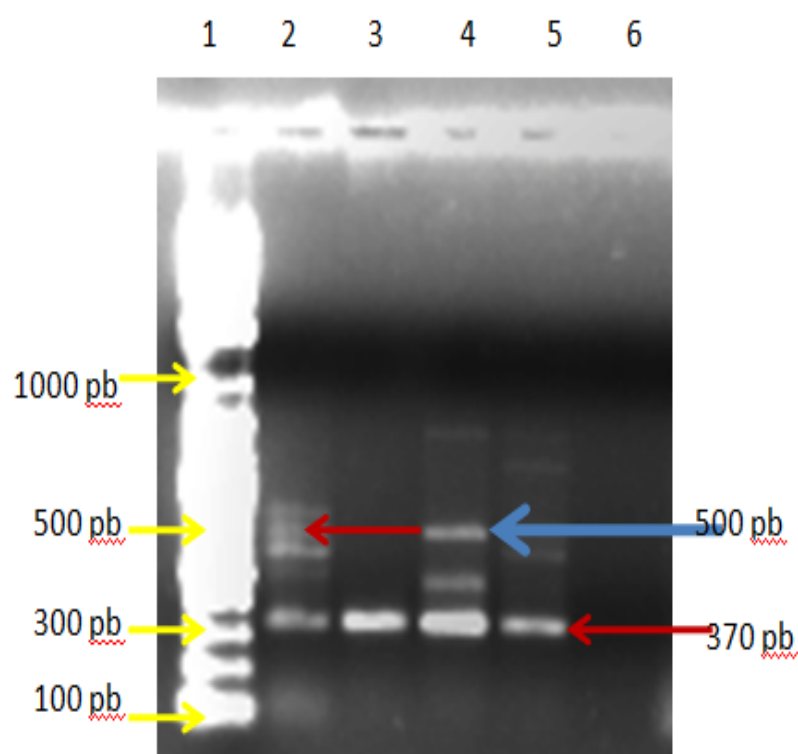


Figura 1. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante PCR multiplex para la identificación de *Salmonella* spp y *Salmonella* Typhi mediante la detección el gen 16S ribosomal y la detección simultanea de los genes de invasión *invA* y de LPS *tyv*. Carril 1: marcador molecular 2 log, carril 2: cepa de referencia perteneciente a *Salmonella* Typhi donde se observa el gen *invA* y 16S, ambos de 500 pb y *tyv* de 370 pb, Carril 3: cepa aislada de queso *tyv*, carril 4: cepa de queso con los genes 16S, *invA* y *tyv*, carril 5: cepa de carne con genes *tyv* y 16S, carril 6: control negativo. La electroforesis fue corrida en gel de agarosa al 1.5% y posteriormente teñido con bromuro de etidio.

6.3.2 Amplificación de los genes *fliC* y *elt* AB en *E. coli*

En la figura 2 se muestran las amplificaciones de los fragmentos de: 175 pb correspondientes al gen *fliC* en cepas de ECEH provenientes del PCR múltiplex en punto final; 350 pb que corresponden al gen *elt* A en cepas de ECEH y ECET, 795 pb correspondientes al gen *elt*B en cepas de ECEH y ECET.

De las 28 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de carne y queso se hallaron: 13 positivas al gen *fliC* y 2 al gen *elt* AB. (graficas 6.6 y 6.12)

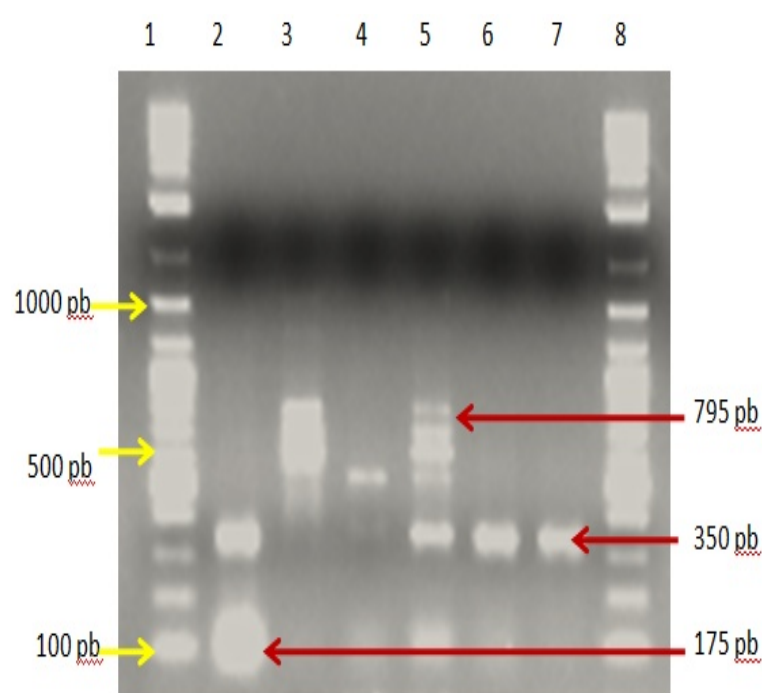


Figura 2. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante PCR múltiplex para la identificación de *E. coli* O157:H7 mediante la detección el gen *fliC* y la detección simultanea de los genes *Salmonella*. El uso de PCR en punto final permitió detectar los genes *elt* A y B. Carril 1: marcador molecular 2 log, carril 2: cepa de referencia perteneciente a ECEH donde se observa el gen *fliC* de 175 pb y el gen *elt* A de 350 pb, Carril 3: cepa aislada de queso que posee el gen *elt*B de 795 pb, carril 4: cepa proveniente de carne, carril 5: se muestra la cepa de carne con genes *fliC*, *elt* A y B, carril 6: muestra de carne con el gen *elt* A y carril 7: muestra de queso con el gen *elt* A. La electroforesis fue corrida en gel de agarosa al 1.5% y posteriormente teñido con bromuro de etidio

6.3.3 Amplificación de los genes *tyv*, *invA*, *fliC* y *elt AB* en *Salmonella* y *E. coli* por un PCR tiempo real

Amplificación del gen *tyv* en *Salmonella Typhi* en un PCR tiempo real

Para un resultado más confiable se realizó un PCR en tiempo real, donde, el resultado positivo daría un dictamen confirmatorio a las cepas aisladas de queso fresco y carne de bovino.

En el gráfico de amplificación pueden visualizarse las curvas de amplificación del fragmento de 370 pb propio del gen *tyv* de *Salmonella Typhi* que da como resultado una fluorescencia umbral promedio de Ct = 25.01; con esto, se ve integrado la detección del patógeno en la muestra.

Las cepas que amplificaron a este gen en esta prueba mostraron resultados igualmente positivos en el resto de las técnicas de identificación utilizadas anteriormente (tabla 6.5 y 6.10), llegando así a una congruencia en los resultados; tanto para este gen como para el resto los genes estudiados en este trabajo.

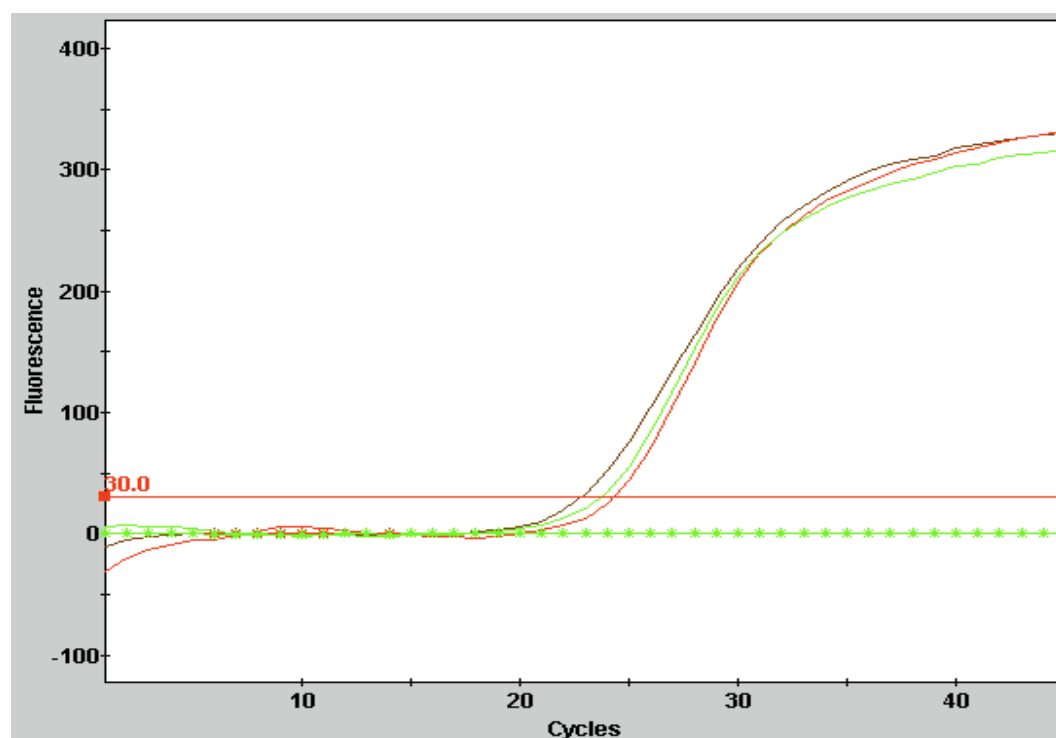


Figura 3. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con SYBR Green, donde se aprecia la amplificación de cepas de *Salmonella Typhi* con el gen *tyv* de 370 pb, en un gráfico FAM – TX.

Amplificación del gen *invA* en *Salmonella* spp

Se aprecia la curva de amplificación con un Ct promedio de 24.6 para la identificación de *salmonella* spp con el gen *invA*

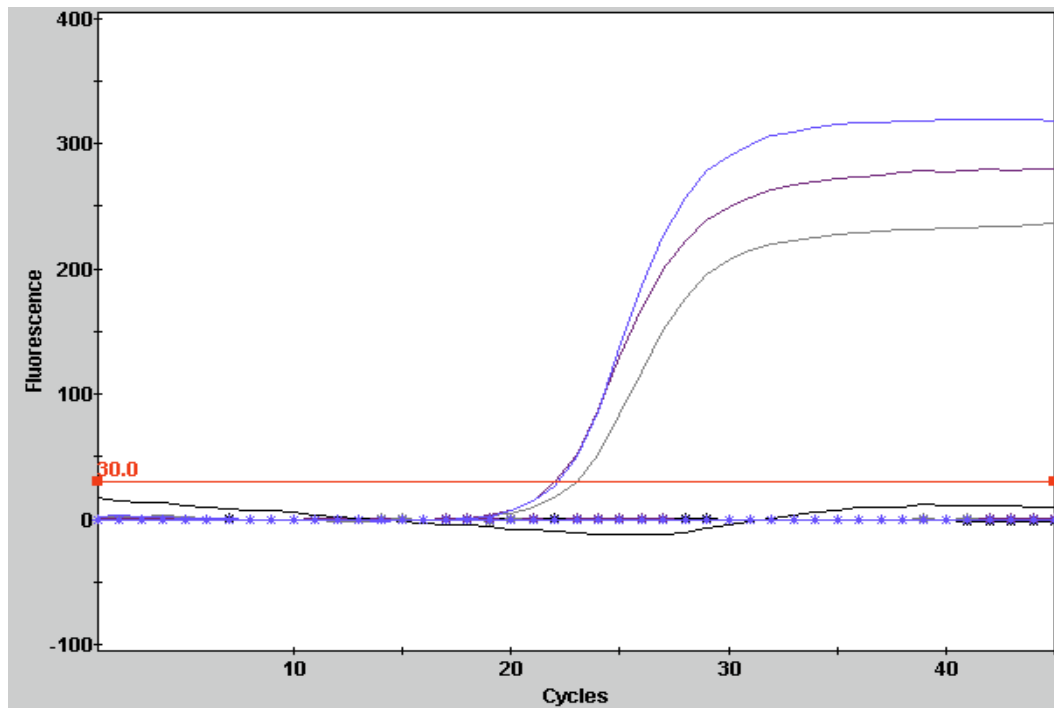


Figura 4. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con SYBR Green, donde se aprecia la amplificación de cepas de *Salmonella* spp con el gen *invA* de 500 pb, en un gráfico FAM – TX.

Amplificación del gen *fliC* en *E. coli*

Se aprecian las curvas de amplificación para el gen *fliC* en cepas de *E. coli* con un Ct promedio de 26.8; se comprueba la detección de ECEH en muestra de carne y queso fresco; además se puede observar en esta gráfica que hubo gran variación de la concentración inicial dando como resultado que las Ct se presentaran en diferentes ciclos.

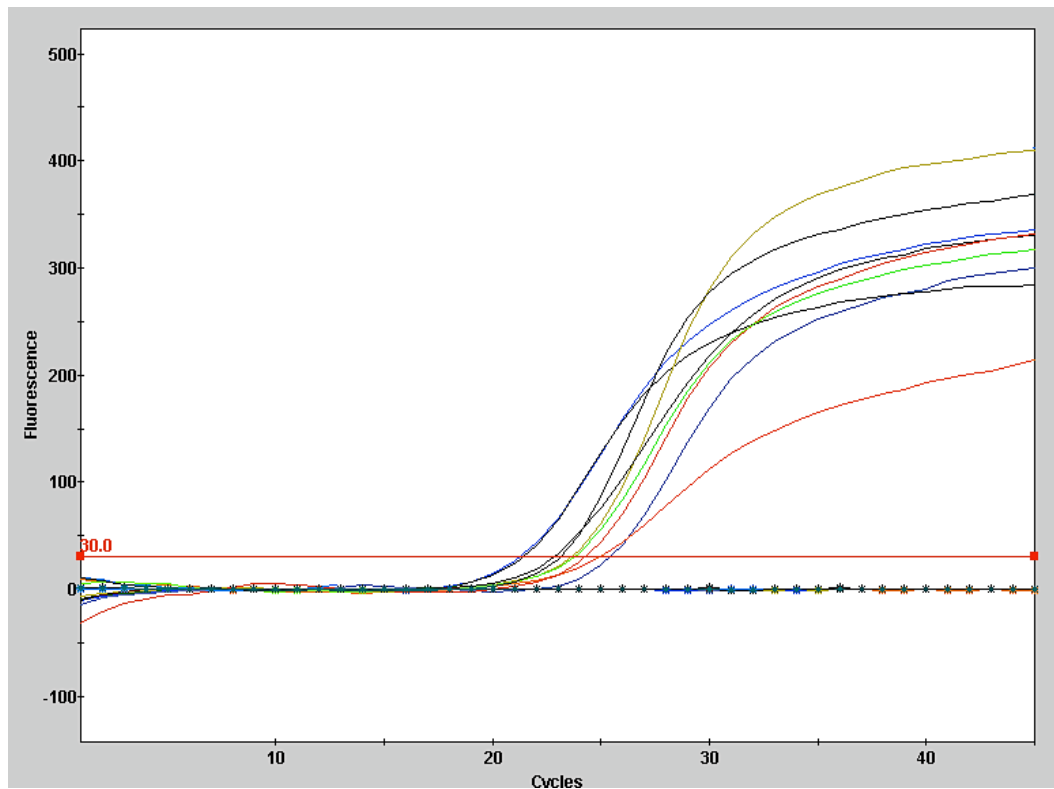


Figura 5. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con SYBR Green, donde se aprecia la amplificación de cepas de *E. coli* con el gen *fliC* de 175 pb, en un gráfico FAM – TX.

Amplificación del gen *elt* AB en ECET

En este gráfico de amplificación se pueden observar dos curvas de amplificación que alcanzan distintas fluorescencias; es decir, las fases exponenciales tienen distinta magnitud; esto se debe a que se trata de dos genes *elt* A y *elt* B que tienen la misma temperatura de alineación. Para *elt* A se obtuvo una $C_t = 30$ mientras que para *elt* B un $C_t = 32.7$. Con este resultado se tiene una correcta identificación de las cepas de ECET de las muestras de carne y queso fresco.

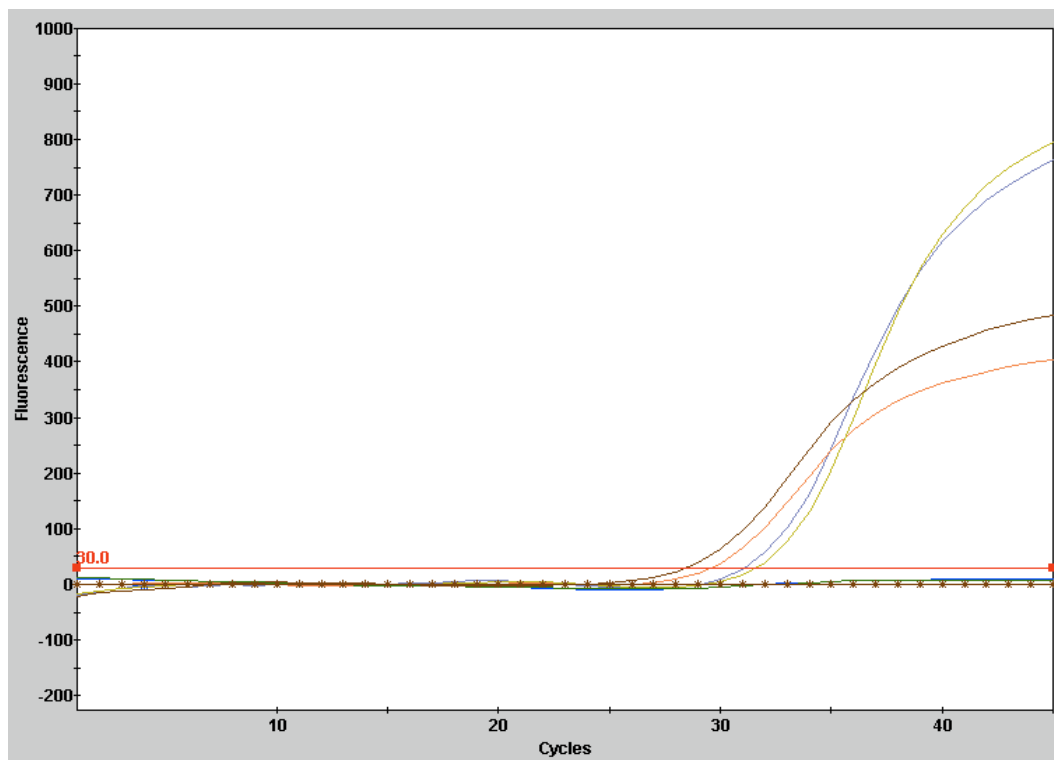


Figura 6. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con SYBR Green, donde se aprecia la amplificación de cepas de *E. coli* con el gen *elt* AB de 350 y 795 pb, en un gráfico FAM – TX.

7 Discusión

E. coli y *Salmonella* son un peligro inminente para la salud pública; estas dos bacterias son extremadamente patógenas si poseen genes que codifican para factores de virulencia como *E. coli* O157:H7, ECEP, *Salmonella* spp y *Salmonella* Typhi, identificadas en este estudio; ya que, causan severas enfermedades gastrointestinales como las ETA consideradas una problemática a nivel mundial y nacional, ya que el costo y los daños que generan son de gran impacto; tan solo en México, las enfermedades infecciosas gastrointestinales ocupan el 19° sitio en defunciones al año³⁹.

El presente trabajo tiene la finalidad de dar a conocer la frecuencia de *Salmonella* y *E. coli* e informar a la población sobre lo importante que es cocinar correctamente los alimentos y evitar consumirlos crudos o insuficientemente cocidos, principalmente si se trata de alimentos como carne de bovino y quesos frescos a la venta en mercados y tianguis en la vía pública; este tipo de productos son muy susceptibles a contaminación microbiana tal y como se ha demostrado en varios estudios; al representar un riesgo epidemiológico.

Este estudio reveló que de 65 muestras de carne, el 69.23% se encontró contaminada con bacterias gram negativas; porcentaje considerable; en la probabilidad de contraer una infección gastrointestinal. El 30.76% de las muestras contaminadas fueron de *Salmonella* spp y de esta cantidad, 16 cepas equivalentes al (24.61%) amplificó al gen subunidad 16S ribosomal con una reacción de PCR; además, 3 cepas dieron un resultado positivo al gen *invA* y 4 al gen *tyv* lo que significa probabilidad de *Salmonella* Typhi debido que con las pruebas serológicas queda confirmado pues se aislaron 5 cepas de *Salmonella* Typhi, 3 de *Salmonella* Enteritidis y 1 de *Salmonella* Typhimurium. Para *E. coli* se aislaron de las 65 muestras totales de carne: 13 cepas (28.88%) de *E. coli* mediante métodos bacteriológicos, que posteriormente con ayuda de un PCR multiplex y en tiempo real se identificaron 9 cepas de ECEH O157:H7 por amplificación al gen *fliC* y 4 cepas de ECEP por amplificación al gen *elt* AB; al mismo tiempo, de las 13 cepas sospechosas de ser *E. coli* mediante pruebas serológicas resultaron 7 positivas al serotipo ECEH O157:H7, estos métodos permitieron la identificación de más cepas patógenas de ECEH además de

acortar el tiempo de identificación y generando menos residuos en comparación con las pruebas serológicas.

Para las muestras de queso fresco tipo ranchero estudiadas se encontró que un 56.25% de ellas desarrollaron contaminación microbiana; nuevamente considerando este porcentaje como un número por arriba de la media, por lo que existe mayor riesgo hallar una muestra de queso contaminada que libre de microorganismos. Por análisis bacteriológico se lograron aislar 16 (44.44%) cepas de *Salmonella*, de las cuales, mediante PCR múltiplex y en tiempo real se identificaron 15 cepas de *Salmonella* spp por amplificación al gen subunidad 16S ribosomal, 3 cepas de *Salmonella* spp por amplificación al gen *invA* y 5 cepas de *Salmonella* Typhi correspondiente a la amplificación del gen *tyv*, más adelante al hacer la comparación con las pruebas serológicas se mostró una similitud; la serología arrojó a 5 cepas de *Salmonella* Typhi, 4 de *Salmonella* Enteritidis y 2 de *Salmonella* Typhimurium. De las 64 muestras de queso fresco se obtuvieron 15 (41.66%) cepas de *E. coli* por medio de pruebas bacteriológicas, de ahí que por una reacción en PCR multiplex y en tiempo real se lograron identificar 4 cepas de *E. coli* O157:H7 y por amplificación al gen *fliC* y por pruebas serológicas el mismo número de ECEH del tipo O157:H7. En muestras de queso no hubo presencia de ECET al no amplificar con el gen *eltAB*; por lo que al menos en este estudio se muestra claramente que hay una mayor frecuencia de ECEH que de ECET.

Se puede apreciar además que las técnicas moleculares tales como PCR múltiplex y en tiempo real, son más sensibles y por lo tanto factibles de usar con mayor ceteza que las técnicas de bacteriología ordinarias, además no solo tienen esa ventaja sobre los analisis bacteriológicos sino que la PCR multiplex permite la identificación simultanea de fragmentos de ADN de *Salmonella* y *E. coli* en corto tiempo y generando menos residuos, mientras el PCR en tiempo real tiene como ventaja acortar aún más el tiempo, pues no es necesario un gel de electroforesis, ya que en un par de horas se tiene un resultado confiable y reproducible permitiendo monitorear la reacción en un determinado número de ciclos, sin olvidar también que se deja de trabajar con bromuro de etidio, un compuesto carcinogénico, pues el ensayo de PCR en tiempo real emplea

SBRGreen un producto económico. Por tales motivos, las técnicas moleculares son de gran utilidad; sin embargo, estos métodos no sustituyen, sino que complementan a los ya usados métodos microbiológicos tradicionales, la combinación de varias metodologías llegó a un resultado más exacto, dónde no se compararon metodologías sino que se emplearon para dar a conocer los seropatótipos de bacterias aisladas con ayuda de un buen aislamiento y purificación de las cepas aisladas de las muestras de queso y carne.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran similitudes con otros proyectos realizados en distintos lugares y fechas, dejando de manifiesto que la inocuidad alimenticia es un proceso que se debe tomar en cuenta para asegurar la salud de miles de personas alrededor del mundo en cuanto al consumo de alimentos saludables. Uno de estos trabajos realizado por Claudia D. Alcázar Montañez, María Salud Rubio Lozano y colaboradores de la facultad de veterinaria y Zootecnista de la UNAM mostró un estudio realizado en el 2006 en quesos, dónde se analizaron 30 muestras, de las cuales 16 (50.0%) se hallaron contaminadas con *Salmonella* spp y 8 (26.6%) con *E. coli*¹⁹.

La persistencia de *Salmonella* y *E. coli* en las industrias de carne porcina, bovina y ovina tienen su origen tanto en la exposición del ganado a fuentes de contaminación. Es evidente que la mejora futura en el estado de estos patógenos de los animales de carnicería depende de los esfuerzos coordinados y sostenidos por parte de todos los sectores de la industria cárnica para implantar medidas de control riguroso no solo al nivel de granja sino también en los sectores de tratamiento, distribución y venta al por menor de la industria.

En todos los mercados establecidos o sobre ruedas donde se adquirió la carne y/o el queso fresco resultaron contaminados con enterobacterias del género *Salmonella* y *E. coli*. Esto significa un mal control de carne que se distribuye en los rastros del centro de la República Mexicana; así como también en la venta y distribución del queso fresco tipo rancharo; las causas de dicha contaminación pueden ser varias, comienza durante el sacrificio de la res, continúan en otras dependencias del matadero y lugares de venta para terminar en el hogar del

consumidor. En el momento del sacrificio, algunos gérmenes pueden atravesar la barrera intestinal o provenir de la piel, para llegar a los músculos por vía sanguínea. Durante el desuello y evisceración, resulta fácil la contaminación de la carne con gérmenes procedentes del intestino, suelo, ambiente o personas que manipulan la carne. En caso de largos períodos de almacenamiento en frío, puede proliferar una contaminación psicrófila. Prosigue la contaminación durante el transporte hacia los lugares de venta, donde aumentará la contaminación con microorganismos durante su almacenamiento si las condiciones higiénicas son desfavorables hasta terminar con la falta de higiene en la manipulación en los puntos de venta.

Para el queso, ocurre casi lo mismo; la contaminación comienza desde el ordeño de la leche, pues se realiza mediante un sistema mecánico poco higiénico y con recipientes sucios o mal lavados; el ambiente donde se realiza la operación también suele ser una fuente de contaminación al estar en contacto con el aire y el suelo, además de algunos vectores como las moscas; sin dejar de mencionar que el animal tiene una importante fuente de contaminación microbiana en escamas de la piel, pelos, suciedad, pezón, rabo, etc. Posteriormente al ordeño y a la elaboración de quesos, éstos se pueden contaminar por un aumento de microorganismos, según la temperatura de conservación. Si no se frena este crecimiento, se producen una serie de modificaciones fisicoquímicas en el producto y se inicia una fase de acidificación a consecuencia de la fermentación y por último la mala higiene en la elaboración del queso fresco y en el almacenamiento y manipulación del producto terminado.

Para tratar de frenar el riesgo de contraer una ETA por las causas de contaminación en la carne de bovino; las autoridades deben vigilar que se cumplan las normas oficiales mexicanas de productos pecuarios, comenzando por la adquisición de animales jóvenes sanos por los ganaderos, el planeamiento eficaz del alojamiento, de la limpieza y desinfección y de la logística y el uso de agua únicamente de calidad potable. Carga, transporte al matadero, descarga y alojamiento en el matadero que aseguren un trato cuidadoso; animales limpios y con descanso conveniente, antes del sacrificio. Evitar desde el principio hasta el final de la línea de sacrificio y carnación de la

contaminación, realizando las prácticas de desollado y evisceración según las normas de higiene y cuidando la desinfección de cuchillos y demás material de equipo. Los consumidores también deben cumplir la parte que les corresponde en el hogar llevando a cabo las cinco medidas clave para la inocuidad de los alimentos que dio a conocer la OMS en el 2010³⁸, estas son: mantener la limpieza, separar los alimentos crudos de los cocinados, cocinar bien todos los alimentos, mantener los alimentos a la temperatura adecuada y utilizar agua e ingredientes inocuos.

Es de suma importancia que se lleven a cabo las medidas antes mencionadas para tratar de frenar el aumento de ETA que cobran millones de vidas al año; de lo contrario estas enfermedades continuarán incrementándose como hasta ahora; en esta época han surgido con mayor fuerza debido al aumento de los viajes internacionales, el comercio y la globalización del suministro de alimentos; la introducción involuntaria de agentes patógenos en nuevas áreas geográficas; los viajeros internacionales pueden resultar infectados por patógenos transmitidos por los alimentos que no son comunes en sus países; los cambios en las poblaciones microbianas pueden conducir a la evolución de nuevos patógenos, el desarrollo de nuevas cepas virulentas en los agentes patógenos conocidos, el desarrollo de resistencia a los antibióticos que puede hacer una enfermedad más difícil de tratar, los cambios en la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas; un mayor número de gente sale y comidas preparadas; comer en restaurantes, cantinas, restaurantes de comida rápida, y por puestos ambulantes de alimentos^{36,37}.

Al mismo tiempo, los sistemas de control de la inocuidad de los alimentos siguen mejorando y los países son cada vez más conscientes de la necesidad de cooperar y compartir las prácticas óptimas a fin de garantizar la inocuidad de los alimentos a nivel mundial.

Debido a que no se obtuvieron muestras ambientales, ni de los trabajadores dentro de los mataderos, así como de las herramientas de trabajo que ellos utilizan; serán necesarios estudios posteriores para detectar la existencia de fuentes externas de contaminación, durante la evisceración.

8. Conclusiones

1. Se lograron aislar cepas de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de carne y queso fresco en base a la metodología empleada. En carne se hallaron 20 cepas de *Salmonella* y 13 de *E. coli*; mientras que para el queso se aislaron 16 cepas de *Salmonella* y 13 de *E. coli*.
2. El PCR multiplex y PCR en tiempo real logró identificar en muestras de carne a 16 cepas de *Salmonella spp*, de las cuales 4 resultaron tratarse de *Salmonella Typhi* por amplificación del gen *tyv*, 9 cepas de *E. coli* O157:H7 y 2 de ECEP. En muestras de queso fresco se identificaron 15 cepas de *Salmonella spp*, de ahí 5 cepas amplificaron al gen *tyv* indicando al serotipo Typhi, 4 cepas de *E. coli* O157:H7y ninguna de ECEP
3. Con pruebas serológicas realizadas con antisueros somáticos (O) y flagelares (H) se hallaron los serotipos: *S. Enteritidis*, *S. Typhi* y *S. Typhimurium*; además del género *E. coli* serotipo ECEH O157:H7
4. La contaminación en muestras de carne por *Salmonella* fue del 30.76%, mientras que de *E. coli* de 28.88%.
5. En muestras de queso fresco la incidencia de *Salmonella* fue de 44.44% y 41.66% de *E. coli*.
6. El uso de más de una metodología en análisis de alimentos puede llegar a resultados más eficaces y confiables; más aún si se trata de PCR múltiplex y en tiempo real, dónde no solo se acorta en tiempo, sino que se generan menos residuos.
7. La presencia de patógenos *Salmonella* y *E. coli* en productos como la carne y el queso es medianamente alta, de ahí que las autoridades responsables de la inocuidad de los alimentos deban estar vigilantes y disponer de recursos suficientes para realizar las inspecciones necesarias a fin de hacer cumplir las normas y garantizar la aplicación de prácticas seguras de producción y distribución de alimentos

9. Perspectivas del trabajo

1. Realizar un PCR multiplex en tiempo real para la amplificación de genes que codifican a factores de virulencia en cepas de *Salmonella* y *E. coli*.
2. Realizar estudios de multirresistencia en cepas de *Salmonella* y *E. coli* aisladas de muestras de carne y queso; para un uso adecuado de los antibióticos
3. Identificar la presencia de integrones en cepas de *Salmonella* y *E. coli*
3. Realizar un análisis del matadero, personal, aire, agua, animal, manos, lugares de almacenamiento, así como en los instrumentos de trabajo, para hallar las fuentes de contaminación en los alimentos.

10 . Referencias

1. STEPHEN H. GILLESPIE, "medical microbiology & infection at a Glance" editorial Blackwell, segunda edición, USA 2003, pp 47-49.
2. SHERRIS C. Jhon, "Microbiología Médica" Mc Graw-Hill Interamericana, cuarta edición, México 2001, PP 373- 400.
3. PRESCOTT, Harley y Klein, "Microbiología", Mc Graw Hill, séptima edición, España 2009, pp1035 y 1036
4. KONEMAN W. Elmer, "Diagnóstico microbiológico", atlas color, editorial médica panamericana, tercera edición QR67 C6418, pp 203-255
5. MARTÍNEZ Romero Esperanza, "Microbios en línea", coordinación de la investigación científica UNAM, 2001, pp 57-83
6. BERNARD D. Davis, "Tratado de microbiología", editorial masson, cuarta edición, España 1996, pp 541-549.
7. J.D. JARVIS, "Bacteriología Clínica básica", editorial el manual moderno, S:A mexicod.f 1976, pp 105-106
8. Yuwen Chong, Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7 – initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo. *Microbiology* (2007), 153, 794–802
9. M. A. Lasaro. Genetic Diversity of Heat-Labile Toxin Expressed by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans, *Journal of bacteriology*, Apr. 2008, p. 2400–2410
10. Karen J. Vigil, Zhi-Dong Jiang, Jaclyn J. Chen, Kathryn L. Palumbo, Short Report: Coliform and *Escherichia coli* Contamination of Desserts Served in Public Restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(4), 2009, pp. 606–608
11. Miguel Gallegos, Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates Obtained from Bovine and Porcine Carcasses, *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, No 2*, 139 - 146, 2009
12. Torres V. Ma. Agentes patógenos transmitidos por alimentos volumen 1 última edición. Universidad de Guadalajara 2003. Pg 65-86, 175-178, 185-200

13. DOYLE P. Michel, Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras, editorial acriba, España, pp 133-186
14. Douglas M. Heithoff, Human Salmonella Clinical Isolates Distinct from Those of Animal Origin, applied and environmental microbiology, Mar. 2008, p. 1757–1766
15. Anne Bishop, Interaction of *Salmonella* enterica serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion, Microbiology (2008), 154, 1914–1926
16. Haim Levy PCR Method To Identify Salmonella enterica Serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among Salmonella Isolates from the Blood of Patients with Clinical Enteric Fever, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2008, p. 1861–1866
17. Narjol González-Escalona, Detection of Live Salmonella sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting invA mRNA, applied and environmental microbiology, June 2009, p. 3714–3720
18. Introducción al PCR en tiempo real sistema 7900HT y 7900HT fast. Applied Biosystems
19. Claudia D. Alcázar Montañez, José Fernando Núñez Espinosa, Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.
20. Kenji Hirose, Selective Amplification of tyv (rfbE), prt (rfbS), viaB, and fliC Genes by Multiplex PCR for Identification of Salmonella enterica Serovars Typhi and Paratyphi A, Journal of clinical microbiology, Feb. 2002, p. 633–636
21. Walker J., Rapley R: 2000. Molecular Biology and Biotechnology. 4a. ed Royal Society of Chemistry, RU. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real Josep Costa Servicio de Microbiología. Hospital Clínic Provincial. Barcelona España.
22. Edna Yáñez, Detection of Salmonella spp. by real time PCR and standard methods in cattle carcasses and public fast food outlets in

- Montería Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Montería, Colombia
23. Microbiología alimentaria “Metodología analítica para alimentos y bebidas”, María del Rosario Pascual Anderson, editorial Díaz de Sntos, segunda edición, España 200, pp 17-30, 41-60, 219-223, 281-284.
 24. Castañeda S., Comparación de los métodos para detección de *salmonella* en alimentos: método tradicional vs. método de pcr en tiempo real
 25. Las tres etapas de los métodos de investigación de patógenos en alimentos basados en PCR. Noviembre-Diciembre de 2008
 26. María de Lourdes Pérez Chabela, Detección de microorganismos patógenos e indicadores en carne de bovino que se expende en supermercados de la Ciudad de México, NACAMEH Vol. 2, No. 2, pp. 188-194, 2008
 27. La PCR múltiple en microbiología clínica. Laboratorio de Biología Molecular, Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. España. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España
 28. Milagros de Vizcarrondo, Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular. Enero 2002
 29. Sistemas de detección de patógenos por pcr a tiempo real. Guía de interpretación de resultados, Microbial, septiembre 2009
 30. Rosario Martín de Santos, Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.*
 31. Global Salm-Surv (GSS) website.
 32. Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health
 33. Report of a WHO Meeting Geneva, Switzerland, 2-5 June 1998 WHO/EMC/ZDI/98.12

34. WHO Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food.
35. Report of a WHO Consultation, Geneva, Switzerland, 5-9 June 2000
WHO/CDS/CSR/APH/2000.4
36. Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health
37. Report of a WHO consultation, Oslo, Norway, 10-13 September 2001.
WHO/CDS/CSR/EPH/2002/11
38. Fives keys to safer food. <http://who.int>
39. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
40. NOM -109-SSA1-1994, Bienes y servicios. "Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico".
41. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método Para la Determinación de *Salmonella* en Alimentos.

Anexo

Material de laboratorio

Cajas petri de plástico desechables 20 mL	Tubos graduados para microcentrifuga 1.6 mL Neptune By CLP
Asa bacteriológica	
Asa bacteriológica calibrada 1µL	Pipeta de graduada de 5 mL Pyrex
Mecheros Fisher	Pipeta de graduada de 10 mL Pyrex
Portaobjetos	Micropipetas de 0,5 – 10 µL Thermolabsystems
Bisturí	Micropipetas de 2-20 µL Thermolabsystems
Pinzas de disección	Micropipetas de 20-200 µL Thermolabsystems
Gradillas	Micropipetas de 100-1000 µL Thermolabsystems
Espátula	Puntas p/micropipeta 0.5-10 µl
Tubos falcom 30 mL	Puntas p/micropipeta 1-1000µL
Tubos falcom 50 mL	Probetas 1L
Tubos eppendorf 1 mL	Matraz 500 mL Pyrex
Tubos eppendorf 3 mL	Matraz 2 L Pyrex
Tubos para PCR 0.2 mL BY MβP	Matraz 4 mL Pyrex

Agar nutritivo

Agar.....	15g
Extracto de carne de res	3.0g
Peptona de gelatina.....	5.0g
Agua destilada.....	1000.0mL
pH.....	6.8±0.2

Modo de preparación: Rehidratar 23 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Agar Mac Conkey

Peptona de caseína	17.0g
Peptona de carne.....	3.0g
Cloruro de sodio.....	5.0g
Lactosa.....	10.0g
Mezcla de sales biliares.....	1.5g
Rojo neutro.....	0.03g
Cristal violeta.....	0.001g
Agua destilada.....	1000.0mL
Agar	13.5g
pH	7.1±0.2

Modo de preparación: Rehidratar 50 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Agar salmonella y shigella

Agar.....	13.5g
Citrato férrico de amonio.....	1.0g
Citrato de sodio.....	8.5g
Extracto de carne.....	5.0g
Lactosa	10.0g
Peptona especial.....	5.0g
Rojo neutro.....	0.0025g
Sales biliares.....	8.5g
Tiosulfato de sodio.....	8.5g
Verde brillante.....	0.00033g
Agua destilada.....	1000.0mL
pH.....	7.0 ± 0.2

Modo de preparación: Rehidratar 60 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Agar EC

Cloruro de sodio.....	5.0g
Fosfato dipotásico.....	4.0g
Fosfato monopotásico.....	1.5g
Agar.....	13.5g
Lactosa.....	5.0g
Sales biliares.....	1.5g
Peptona biotriptasa.....	20.0g
Agua destilada.....	1000.0mL
pH.....	6.9 ± 0.2

Modo de preparación: Rehidratar 37 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Cuando la porción de la muestra a analizar es de 10 ml preparar el medio a concentración doble. Distribuir en tubos de ensayo o frascos con campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**Agar RV
(rappaport y vassiliadis)**

Cloruro de magnesio hexahidratado.....	29.0g
Cloruro de sodio.....	8.0g
Fosfato monopotásico.....	0.4g
Verde de malaquita.....	0.036g
Peptonade caseína.....	4.0g
Peptona de soya.....	1.0g
Agar	13.5g
Agua destilada.....	1000.0mL
pH	5.2 ± 0.2

Modo de preparación: Rehidratar 42.5 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos.

Base de caldo tetracionato

Carbonato de calcio.....	10.0g
Peptona especial	5.0g
Sales biliares.....	1.0g
Tiosulfato de sodio.....	30.0g
Agua destilada.....	1000.0mL

PREPARACION Rehidratar 46 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto. Enfriar aproximadamente a 45°C. Distribuir en tubos de ensayo estériles en volúmenes de 10 ml agitando para homogeneizar el precipitado. **NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE.** Conservar en refrigeración de 2 a 8°C. Antes de usarlo agregar 0.2 ml de una solución de Yodo-yodurada a cada tubo agitando perfectamente.

Solucion de yodo

Yodo en cristales.....	6.0g
Yoduro de potasio.....	5.0g
Agua destilada.....	20.0mL

Agua peptonada amortiguada

Cloruro de sodio.....	5.0g
Peptona	10.0g
Fosfato dipotásico.....	1.5g
Fosfato disódico.....	9.0g
Agua destilada.....	1000.0mL
pH.....	7.2 ± 0.2

Modo de preparación:Rehidratar 25.5 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Agitar para disolver por completo. Distribuir en tubos de ensayo o matraces de acuerdo a la técnica a seguir. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar

Medio de mantenimiento

Caldo nutritivo	7.0
Extracto de levadura	1.0
Agar bacteriológico	7.3
Fosfato de potasio monobásico	1.3
Fosfato de potasio dibásico	3.7
Glicerol	2.0 mL
Agua destilada.....	1000.0mL

Modo de Preparación: Rehidratar los componentes citados en un litro de agua destilada, calentar hasta su disolución y distribuir en tubos; esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Permitir que enfrié los tubos en posición inclinada.

Bromuro de etidio (1ug/ml)

Bromuro de etidio 1.0ug
Agua destilada.....hasta 1 ml.

Pesar el bromuro de etidio con guantes por ser una sustancia cancerígena, disolver y almacenar la solución en un frasco oscuro envuelto con papel aluminio a temperatura ambiente.

Buffer tae (tris-HCl- acetato-EDTA) 1X

Trizma base4.84g
Ac. Acetico glacial.....1.14ml
EDTAdiNa0.5MpH8.....2ml
Agua bidestiladahasta 1000ml.
pH 8

Buffer de carga 2X (ADN)

SDS 0.5%
Glicerol 25%
Azul de bromofenol0.05%
EDTA12Mm
pH..... 8

Gel de agarosa 1%

Agarosa1.0g
TAE 1X 100mL

SBRGreen 5%

SBRGreen 100X.....5µL
Agua grado molecular.....95µL