



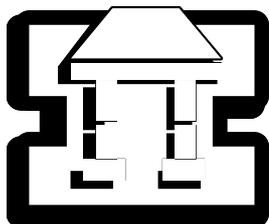
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CARNE DE POLLO
CONGELADA Y FRESCA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ALEJANDRA MONDRAGÓN NAVARRO

DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS





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.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios: Te doy gracias por la vida, por que siempre estas conmigo y por tantas bendiciones. Te pido ilumines mi camino y me guíes siempre.

A mi Mamá: Gracias por tus cuidados, por estar pendiente de mi, por tu amor infinito, gracias por tu apoyo y comprensión. Te quiero mucho mami.

A mi Papá: Gracias por ser quien siempre me apoya cuando me siento frágil, por tener ese temple, por ser fuerte. Gracias Papá porque me has enseñado que en la vida todo se puede. Te quiero mucho.

A mi esposo: Gracias amor por todo tu apoyo incondicional, por tu gran comprensión, por que estuviste a mi lado en las buenas y en las malas durante la carrera, y porque ahora emprendemos un camino juntos y de mucha responsabilidad con nuestra hija. Te amo.

A mi hija: A ti capullito te dedico este trabajo, por que eres la bendición más grande que Dios me ha dado, y porque me das la fuerza de continuar y ser mejor cada día, gracias por ver en ti el milagro de la vida. Te quiero mucho bebecita preciosa.

A mis hermanos :

A mi hermana Verónica: Gracias manita por tu apoyo, por tus palabras francas y por tu gran cariño. Gracias por ser mi hermanita .Te quiero mucho.

A mi hermano Héctor: Aunque estas lejos siempre te recuerdo y te doy gracias por entenderme y apoyarme moralmente cuando más lo necesite. Te quiero mucho manito.

A mi hermana Maribel: Gracias mugrosa por que sin tu apoyo no hubiera sido posible este sueño, te agradezco de todo corazón, tu ayuda incondicional, tu animo, tu espíritu de lucha constante gracias por ser como una hermana .Te quiero mucho.

A mis suegros: Gracias por considerarme como una hija. Les estoy muy agradecida por todo el apoyo que he recibido. Los quiero mucho.

A mis amigas: Gracias por haber emprendido juntas la aventura de la universidad, aunque tomamos caminos diferentes, nunca olvidare su amistad, comprensión y ayuda gracias: Erika, Julieta, Keila, Mónica, Stephanie, Jessica, Vanesa, Moni Alcázar, Montserrat, Argelia, Becky, Sonia y todos los que de alguna manera me ofrecieron su amistad.

A mis sinodales: Que han sido fundamentales en el comienzo, desarrollo y culminación De este trabajo.

A la Maestra Gloria Luz Paniagua Contreras: Gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por su apoyo y consejos, por sus valiosas aportaciones y sugerencias académicas.

Al Maestro Erick Monrroy Pérez: Gracias por todo el tiempo que me brindo con sus enseñanzas, su paciencia y todo su apoyo.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco: Gracias por su tiempo y conocimientos que fueron soporte para la realización de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Vázquez Cruz: Le agradezco mucho su ayuda su comprensión y su tiempo, gracias por sus comentarios y sugerencias.

A la Bióloga Susana González Almazán: Gracias por ser la persona que siempre me ayudo con sus conocimientos teóricos y prácticos, por tu paciencia, apoyo y amistad.

Quiero agradecer especialmente a todos los maestros de la carrera de Biología que han sido parte importante en mi formación académica.

Un agradecimiento especial para El Dr. Antelmo Martínez Soria.

ÍNDICE.

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
METODOLOGÍA	11
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	34
ANEXO	35
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN.

En México las enfermedades gastrointestinales transmitidas por la ingesta de carne de pollo contaminada por bacterias o por sus toxinas, representan un serio problema de salud pública. Entre las bacterias que ocasionan infecciones intestinales se encuentran *Salmonella* spp. En este trabajo se analizaron un total de 45 muestras de pollo, dentro de las cuales, el 73.33% (n = 33) fue recolectada de mercados, 13.33% (n = 6) de centros comerciales (WallMart, Chedraui y Comercial Mexicana), y un 13.33% (n = 6) de rastros, ubicados en el Distrito Federal y la periferia del Municipio de Tlalnepantla. Las muestras de pollo fueron colectadas en bolsas estériles en diferentes puntos de venta y transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, Iztacala, FESI, UNAM. La cuenta de mesófilos aerobios se realizó por el método de cuenta en placa, la cuenta de coliformes totales por la técnica del número más probable, la cuenta de coliformes fecales por la técnica de Mackenzie, la cuenta de *Staphylococcus aureus* por el método de Vogel-Johnson. La identificación de enterobacterias se realizó por pruebas bioquímicas y la identificación de *Salmonella* spp. por PCR multiplex. El 50 % de las muestras de pollo fresco rebaso los límites permitidos por la Norma Oficial Mexicana para coliformes totales y fecales, 30% para mesófilos aerobios y el 10 % para *Staphylococcus aureus* . El 20% de la carne de pollo congelada superó los límites establecidos para coliformes totales y fecales (en cada caso), y 10% para mesófilos aerobios. En el 66.6% de la carne fresca se aisló a *E.coli* en el 61.1% a *Klebsiella* spp y en el 44.4 % a *Proteus vulgaris*, mientras que en la carne congelada se aisló el 37 % a *Proteus vulgaris* y *Klebsiella* ssp. (en cada caso) y *E.coli* en el 25%. En el 10% de las muestras de pollo fresco y congelado se identificó a *Salmonella typhimurium* por PCR multiplex. Los resultados evidenciaron la elevada contaminación por bacterias patógenas en la carne de pollo fresca y congelada, por lo que resulta importante que se establezcan programas informativos entre la población para disminuir los factores de riesgo de infecciones gastrointestinales.

INTRODUCCIÓN.

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) son causadas por el consumo de alimentos o de agua contaminada con microorganismos patógenos (bacterias parásitos y virus) o por la producción de sus toxinas.

Las enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial son una de las causas más preocupantes en salud pública ya que anualmente ocurren de 24 a 81 millones de casos y más de diez mil muertes por consumo de alimentos contaminados.¹²

En los países subdesarrollados las enfermedades gastrointestinales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.⁴⁸ En México para 1989, las diferentes instituciones de salud notificaron, 3, 419 casos de brucelosis, 9, 790 de shigelosis, 10, 939 de tifoidea, 30, 899 intoxicaciones alimentarias no especificadas, 72, 754 de salmonelosis y 1, 948, 542 de otras infecciones intestinales, lo que da un total de 2, 076, 343 episodios relacionados con transmisión alimentaria.¹³ En el periodo de (1980-1989), se notificaron a la Dirección General de Epidemiología 314 brotes de ETA con un total de 12, 344 casos y 348 defunciones. De éstos, 227 correspondieron a brotes de origen microbiano o parasitario con 9, 621 casos y 232 defunciones.⁴⁸

Sin embargo datos epidemiológicos correspondientes al periodo 1995-1999, muestran una incidencia de 757 brotes que afectaron a 11 mil 535 personas, de las cuales 76 fallecieron.

Por lo cual en América Latina, México ocupa el segundo lugar en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.²⁴

PRINCIPALES ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)

En nuestro país las ETAs constituyen un problema médico que afecta significativamente a los habitantes, lo cual se ve reflejado en las elevadas cifras reportadas en los casos de gastroenteritis y otras enfermedades diarreicas.⁵¹

Las infecciones ocasionadas por alimentos pueden ser de tipo gastrointestinal (amibiasis, shigelosis, teniasis, salmonelosis, ascariasis, giardiasis, cólera e intoxicaciones alimentarias) o de tipo extraintestinal (brucelosis, cisticercosis, fiebre tifoidea, hepatitis, botulismo, etc.)⁴⁸, Cuya etiología incluye virus, hongos, parásitos, productos químicos y toxinas de origen vegetal y animal.⁸

Entre las principales bacterias que pueden sobrevivir en los alimentos y que conservan una patogenicidad elevada se encuentra la familia enterobacteriacea. Dentro de esta familia el genero *Salmonella* spp ocasiona infecciones gastrointestinales e intoxicaciones.⁵

La *Salmonella* spp, es un bacilo corto Gramnegativo, de 0.7–1.5x2.05 micras, perteneciente a la familia enterobacteriacea. Es aerobia facultativa, se encuentra en la naturaleza en el tracto intestinal y materia fecal tanto de humanos como de animales causando gastroenteritis.

La salmonelosis es una enfermedad adquirida a través de alimentos contaminados los cuales causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2 501 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*.

La salmonelosis es una enfermedad aguda de distribución mundial, con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y no cuentan con

medidas de salud pública óptimas. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida: en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables.⁵²

PATOLOGIA

El genero *Salmonella* consta de una sola especie *Salmonella enteritidis* la cual puede ocasionar gastroenteritis.

La gastroenteritis es la forma más habitual de la salmonelosis, los síntomas suelen presentarse entre 6 – 48 hrs, después de consumir agua o alimentos contaminados, se presentan nauseas, vómitos y diarrea no sanguinolenta. La fiebre, el dolor abdominal, las mialgias y la cefalea son frecuentes. Los síntomas pueden persistir entre dos días y una semana antes de su resolución espontánea.³⁵

En el intestino delgado hay prominencia de las placas de Peyer, que hacen gran saliente por debajo de la mucosa, así como aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mesentéricos, las placas de Peyer alcanzan hasta 6 a 8 cm de diámetro y están cubiertas por mucosas sin pliegues y despulida, mientras el resto de la mucosa es de aspecto normal. Conforme avanza el padecimiento los nódulos intestinales empiezan a ulcerarse dando origen a la enteritis clásica de la salmonelosis, con úlceras de tamaño irregular y bordes elevados dispuestas a lo largo de los pliegues transversales pero con un eje mayor paralelo al eje longitudinal del intestino. En esta etapa también existen focos de necrosis en los ganglios linfáticos mesentéricos que continúan aumentando de volumen.

Microscópicamente el tejido linfoide se distingue de otras inflamaciones agudas por que casi no se observan linfocitos polimorfonucleares. También durante el periodo de invasión activa el vaso aumenta de tamaño, dando origen a una de las esplenomegalias de instalación más rápida.

En el corazón y los riñones se describen fenómenos degenerativos intensos como tumefacción turbia y degeneración vacuolar, Los músculos esqueléticos son muy susceptibles y muestran una pronunciada degeneración de Zenker (cérea), esta alteración afecta con mayor frecuencia a los músculos esqueléticos como los intercostales, diafragma, y rectos anteriores del abdomen, estos últimos sufren disrupción y esto suscita dolor, hemorragia y otros trastornos. Tales signos se presentan con *Salmonella typhi* mientras que las demás variedades de *Salmonella* producen otras manifestaciones clínicas y lesiones mucho menos pronunciadas. ^{10, 29}

Dentro de los alimentos que se involucran con mayor frecuencia como causantes de salmonelosis se encuentran la carne de pollo y los productos elaborados a base de la misma. ⁴

INDICADORES DE LA CALIDAD DE ALIMENTOS

Con el propósito de conocer las condiciones higiénicas de los alimentos se utilizan organismos indicadores para estimar tres factores: Seguridad microbiológica, condiciones de saneamiento durante el procesamiento y la calidad del producto.

El aislamiento de los indicadores mas usuales son: Mesofilos aerobios, coliformes, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, Hongos y Levaduras, *Clostridium perfringens* y *Pseudomonas* spp, entre otros. ⁵

- **Mesofilos aerobios.**

A este grupo pertenece una gran cantidad de microorganismos capaces de desarrollarse entre 20 y 37 ° C, como ejemplo encontramos a bacilos, cocos Grampositivos y Gram negativos. Este grupo de bacterias, son indicadores del valor comercial de un alimento, de la presencia de bacterias patógenas, de las condiciones

higiénicas en las que ha sido manejado un alimento, predice la vida de anaquel del mismo y la eficiencia de los germicidas o de preservación de los alimentos. ¹⁸

- **Coliformes.**

Los organismos coliformes están formados por un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente en el intestino. Son bacilos Gramnegativos no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 hrs, de incubación a 37 °C, son abundantes y están siempre presentes en la materia fecal del hombre y de los animales. Con el objetivo de ampliar la investigación microbiológica alimentaria se ha introducido el término de coliformes fecales para referirlos a un grupo de microorganismos más específicos que el de los coliformes y con mayor identidad a *Echerichia coli* ¹⁸

- **Salmonella spp.**

Las Salmonelas son bacilos Gramnegativos móviles, aerobios-anaerobios facultativos utilizan la glucosa o la manosa pero no pueden utilizar la lactosa o la sacarosa, reducen nitratos a nitritos, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, son resistentes a la congelación y sobreviven en agua durante largos periodos de tiempo. ⁴⁶

- **Staphylococcus spp.**

Son células esféricas Grampositivas, generalmente se encuentran formando racimos irregulares, las colonias son redondas, lisas, elevadas brillantes y forman diversos pigmentos.

Staphylococcus aureus es de color amarillo dorado, *S. epidermidis*, es de color blanco aporcelanado. Tienen elevada resistencia a la sal, su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C. Pueden fermentar carbohidratos, con la producción de ácido

láctico pero no de gas; *Staphylococcus aureus*, es coagulasa positivo, son miembros de la flora normal de la piel y mucosas del hombre. ¹⁸

- **Hongos y Levaduras**

Los hongos son organismos eucariontes no fotosintéticos, por lo general desarrollan hifas y su conjunto se denomina micelio, hay especies macroscópicas y microscópicas con reproducción sexual y asexual.

Los hongos y levaduras son microorganismos que tiene interés como causa de alteración, ya que algunos hongos producen toxinas con efecto en animales y en el hombre, denominándose micotoxinas. ¹⁸ Las levaduras son hongos unicelulares, su reproducción asexual es normalmente por gemación, son organismos aerobios y aunque unas especies son fermentadoras otras no, la mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48° C. Solo unas pocas (2%) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24° C. ¹⁴

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

Una de las problemática al que se enfrentan los médicos al tratar las infecciones bacterianas transmitidas por alimentos es el debido a la selección de cepas bacterianas a los antibióticos de uso común.

La resistencia bacteriana a los antibióticos fue reportada por primera vez por Morgenroth y Kaufman (1912) tiempo después del descubrimiento del efecto de la optoquina sobre los neumococos. Posterior a la introducción de varios antibióticos se reportaron cepas bacterianas resistentes a sulfanilamida³³, a penicilina¹, y a estreptomycin. ³⁴

Se ha descrito que la resistencia bacteriana a los antibióticos a menudo se encuentra conferida por plásmidos mismos que pueden transferirse de una bacteria a otra de la misma especie, de especies distintas e incluso de géneros diferentes.⁵⁴

Los plásmidos constituyen el principal mecanismo de diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos que se agudiza en los hospitales a menor escala.¹⁵

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS Y DE RESISTENCIA BACTERIANA

Antibiótico	Sitio de acción	Resistencia
Antibióticos b lactámicos	Proteínas de unión a penicilina	b- lactamasas Alteración Enzimática Cambio en permeabilidad
Vancomicina	Precusores de peptidoglicanos	Alteración de precursores de la pared
Polimixina	Lipolisacáridos	Cambios de permeabilidad
Aminoglicósidos	Subunidad 30S	Modificación enzimática
Tetraciclinas	Subunidad 30S	Modificación Ribosomal y extracción atb
Cloranfenicol	Subunidad 50S	Inactivación enzimática
Macrólidos	subunidad 50S	Modificación Ribosomal e inhibición enzimática
Quinolonas	DNA girasa	Modificación de la girasa A
Sulfonamidas	Enzimas del met. del folato	Modificación de enzimas blanco
Trimetoprim	Dihidrolasa peptidas	Modificación de enzimas blanco
Carbapenem *	Proteínas de unión a la penicilina	Metalo b- lactamasas

* Pertenece a antibióticos b-lactámicos

Tabla 1.Mecanismos de acción y de resistencia bacteriana a los antimicrobianos

ANTECEDENTES.

- Bello – Pérez y colaboradores en 1990 reportaron la frecuencia de *Salmonella* ssp en el 32.44 % de carnes crudas.

- Durante el periodo de 1980 a 1989 el laboratorio Nacional de Salud Pública realizó un estudio de infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario, donde se confirmaron 58 brotes (73%), de los 79 estudiados, dentro de los cuales el principal microorganismo implicado fue *Staphylococcus aureus*, que provocó el 48.2 % de los incidentes y *Salmonella enterica* causó 34 % de los brotes.

- Pérez y colaboradores en 1996 analizaron la calidad de la carne de cinco especies de animales, encontrando resultados microbiológicos inaceptables en la carne de caballo y res.

- En Australia durante el periodo del 2002 al 2003, Berghold y colaboradores aislaron *Salmonella enteritidis* procedente de carne de pollo, reportando un 27.7 % de los 159 muestras analizadas.

JUSTIFICACIÓN.

La carne de pollo es un producto perecedero de alto consumo en México, el público la prefiere por sus atributos nutricionales y bajo costo, sin embargo la poca vigilancia sanitaria y las limitadas condiciones de higiene generan factores de riesgo para la salud, debido a esto es necesario estudios de evaluación microbiológica de la carne de pollo.

OBJETIVOS.

General:

- Determinar la calidad Microbiológica de la carne de pollo congelada y fresca distribuida en tiendas de autoservicio, mercados y el rastro.

Particulares:

- Identificar los diferentes grupos de microorganismos en la carne de pollo.
- Identificar por PCR multiplex los principales serotipos de *Salmonella* que contaminan la carne de pollo fresca y congelada.
- Determinar la resistencia a los antibióticos en las bacterias patógenas identificadas.

METODOLOGÍA.

TRANSPORTE DE MUESTRAS.

La carne de pollo fue adquirida en tiendas de autoservicio, mercados urbanos y en el rastro, ubicados en el Distrito Federal y la periferia del Municipio de Tlalnepantla, tales muestras se depositaron en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio de Análisis clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI-Iztacala) para su procesamiento.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES.

Con el propósito de obtener la primera dilución (1:10), se cortaron fragmentos de carne de pollo incluyendo músculo de ala, pierna, muslo y pechuga, se pesó la cantidad de 10 g, este material se colocó en un vaso de licuadora marca Osterizer previamente esterilizado y se agregó 90 ml de agua peptonada estéril, la mezcla fue depositada en un matraz de 200 ml. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones sucesivas hasta 1: 100,000 (NOM-110-SSA1-1994) (A y B).

CUENTA DE MESÓFILOS AERÓBICOS (METODO DE CUENTA EN PLACA)

Para la cuenta de mesófilos aerobios se transfirió 1 ml de cada dilución a cajas de petri estériles y se agregaron 15 ml de medio de cultivo (agar estándar), se homogeneizaron y se dejaron gelificar. Se prepararon testigos de cada dilución (agar estándar solo). Las cajas se incubaron en posición invertida de la siguiente manera:

Carnes frescas a 22 ° C/72 horas

Al término se contaron las colonias presentes en cada placa (excepto hongos) y el número se multiplicó por el inverso de la dilución para obtener el número de colonias por ml o gramo de muestra (NOM-110-SSA1-1994) (B)

CUENTA DE COLIFORMES TOTALES (TÉCNICA DEL NMP)

Se transfirió 1 ml de cada una de las diluciones (1:10, 1:100, 1:1000) a cada uno de los 3 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato de sodio y se incubaron 48 horas /35° C. Se consideró como prueba positiva, al tubo con formación de gas, el cual se apreció por medio de campanas de Durham.

Posteriormente los tubos positivos se agitaron y una muestra (2 a 3 asadas) fue transferida a tubos con caldo lactosa bilis verde brillante (10 ml) y se incubaron a 35°C durante 48 horas. Se consideró como prueba positiva aquellos tubos con formación de gas. El número de coliformes totales por gramo o mililitro se reportó con ayuda de la tabla del NMP (número más probable) (NOM-110-SSA1-1994) (B).

CUENTA DE COLIFORMES FECALES (Técnica de Mackenzie)

Se depositó 1 ml de cada una de las diluciones a cada uno de 3 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato de sodio, y se incubó a 45° C/48 horas. La presencia de gas evidenció positiva la prueba.

Para confirmar la prueba, una muestra de 2 a 3 asadas fue transferirá a tubos con agua peptonada estéril (10 ml), los cuales se incubaron a 45° C/48 horas, tomando como positivos aquellos que después de ser incubados, formaron un anillo rojo al agregar reactivo de Kovacs. Se determinó el NMP de coliformes fecales por gramo o mililitro.

CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS (Método de cuenta en placa)

Se transfirió 1 ml de cada una de las diluciones a cajas petri estériles y al término se agregaron 15 ml de agar dextrosa y papa fundido y acidificado. Posteriormente se homogeneizó, se gelificó y se incubaron las cajas a 22° C /3días.

Al término se contaron las colonias de hongos y colonias de levaduras. Para obtener el resultado, el número de colonias se multiplicó por la inversa de la dilución (NOM-111-SSA1-1994) (C)

CUENTA DE *Staphylococcus aureus* (Técnica de Vogel- Jonson)

Se colocó 1 ml de cada dilución de las muestras a tubos con 4.5 ml de Caldo de soya tripticaseína y se incubaron a 35° C/48horas. Terminado el tiempo, se sembraron las muestras de los tubos con crecimiento bacteriano a placas de S110 y se incubarán a 35° C/48horas. Finalmente se contaron las colonias crecidas y se realizó la prueba de coagulasa de la siguiente manera:

Número total de colonias	Colonias sometidas a la prueba de coagulasa
Menos de 50	3
De 51 a 100	6
De 101 a 150	7

El número de colonias de *Staphylococcus aureus* se reportó de la siguiente manera:

Número de colonias _____ Número de colonias que resultaron
 Probadas coagulasa positiva

Número de colonias _____ X = Número de colonias de *Staphylococcus aureus*
Crecidas (NOM-115-SSA1-1994)

AISLAMIENTO DE LAS *Salmonella* spp Y ENTEROBACTERIAS EN MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

Se transfirieron 25 g o 25 ml de la carne homogeneizada (macerada) a un frasco que contenía 225 ml de agua peptonada y se incubaron a 35° C/24 horas.

Para aislar cepas bacterianas pertenecientes el género *Salmonella* se transfirieron 0.5 ml del cultivo anterior a un tubo con caldo selenito (5ml) y a un segundo tubo con caldo tetrionato y se incubaron a 35° C/24horas.

En condiciones de esterilidad se sembraron en medios selectivos como agar verde brillante y agar *Salmonella – Shigella* y se se incubaron a 35 ° C / 24 horas.

Para la obtención de las enterobacterias, se realizó un sembrado directo del crecimiento a los agares; eosina azul de metileno (EMB) y verde brillante

IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp. POR PCR MULTIPLEX.

Una vez aisladas y crecidas las cepas bacterianas pertenecientes al Género *Salmonella*, se tomó una muestra del crecimiento por medio de asas estériles calibradas (1/100), se resembró por estría cruzada en el medio de agar MacConkey y se incubó a 37° C por 24 horas.

EXTRACCIÓN DEL DNA BACTERIANO

Obtenido el crecimiento visible de las colonias en el agar MacConkey y por medio de un asa estéril se tomó una muestra bacteriana y se depositó en un tubo de rosca de 16 x 150 que contenía 2 ml de agua desionizada estéril. La muestra se mezcló en un vortex por 20 segundos y se hirvió por 20 minutos. Al terminó la muestra se depositó en contenedores con hielo por 10 minutos y se centrifugó en tubos eppendorff a 12,000 rpm por 10 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante (contenía el DNA) y se guardó a – 20° C para su posterior utilización.

PCR MÚLTIPLEX PARA IDENTIFICAR LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE *Salmonella* spp.

Para la detección de los diferentes serotipos de *Salmonella* spp se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (Tabla 2).

Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Concentración
1. Antisense-i	ATAGCCATCTTTACCAGTTCC	5 pmol
2. Antisense-iv	CCTGTCACTTTCTGTGTTAT	5 pmol
3. Forward G	GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG	5 pmol
4. Reverse-G	AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG	5 pmol
5. Antisense-z10	CGTCGCAGCTTCTGCAACC	5 pmol
6. Reverse-sdf-1	CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC	5 pmol
7. forward-sdf1	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	5 pmol
8. Antisense-r	AAGTGACTTTTCCATCGGCTG	5 pmol
9. Sense 60	GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG	5 pmol
10. Antisense-eh	AACGAAAGCGTAGCAGACAAG	7 pmol
11. Antisense-b	CGCACCAGTCTAAACCTAAGGCGG	7 pmol
12. Forward-d	CCCGAAAGAACTGCTGTAACCG	7 pmol

Tabla 2. Secuencia y concentraciones de las soluciones stocks de los oligonucleótidos utilizados para detectar los Serotipos de *Salmonella* spp.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA REACTIVA.

El volumen final por mezcla de reacción para detectar los Serotipos de *Salmonella* spp fue de 25 µl, para lo cual se tomó 1 µl (a una concentración final de 5 pmol) de cada uno de los 8 primeros primers (1-9, tabla 3) y 1.4 µl (7 pmol) de los 4 primers restantes (9-12, tabla 2) y se depositaron en un tubo eppendorff nuevo y estéril.

Al término se adicionaron 6.9 µl de agua desionizada estéril y 1.5 µl de Buffer. Para realizar la amplificación del DNA, se tomaron los 22 µl de la mezcla de reacción y se adicionaron a cada uno de los tubos de la marca Puretaq Ready-to-go, que contenían 1.5 mMolar de MgCl₂, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mMolar de los dNTPs (marca comercial puretaq). Finalmente se adicionaron 3 µl de DNA templado obtenido de las cepas pertenecientes al Género *Salmonella*. Se utilizaron controles positivos (DNA obtenido de cepas de *Salmonella typhimurium* y *S. infantis*)

AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR.

La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 95° C, posteriormente 20 segundos a 58° C y 20 segundos a 72° C. Finalmente la extensión se prolongó a 72° C por 7 minutos.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Después de la amplificación, los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % (TBE 1X), bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers en un tiempo de 60-120 minutos. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados por la comparación de un marcador de peso molecular

escalera (50 pb). Al término de la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (50 µl en 500 ml de H₂O destilada) por 5 minutos y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Una vez identificadas las bacterias, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para probar la susceptibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con una asa estéril, se inocularon en 5 ml de caldo Muller Hilton, y se incubaron a 37 ° C durante 3 horas, hasta que apareció una turbidez ligera. La turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta obtener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario.

El estándar se preparó mezclando 5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/ volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland)

Posteriormente se inoculó sobre el agar de Muller Hilton por medio de hisopos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar.

Por último se tomó un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar, por medio de una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller Hinton. El antibiótico se difundió formando un gradiente de concentración que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37 ° C.

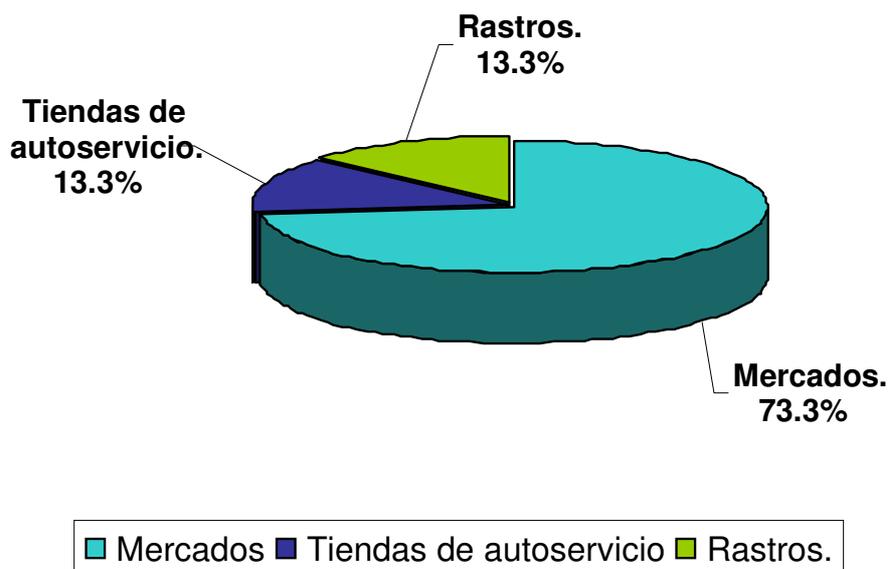
De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición, el cual se midió con un vernier.

RESULTADOS.

MUESTRAS ANALIZADAS

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron un total de 45 muestras de pollo (Gráfica 1), dentro de las cuales, el 73.3% (33) correspondió a mercados, 13.3% (6) a centros comerciales (Wal Mart, Chedraui y Comercial Mexicana), y un 13.3% (6) a rastros, ubicados en el Distrito Federal y la periferia del Municipio de Tlalneantla.

Gráfica 1. Muestras de Carne de Pollo Analizadas.

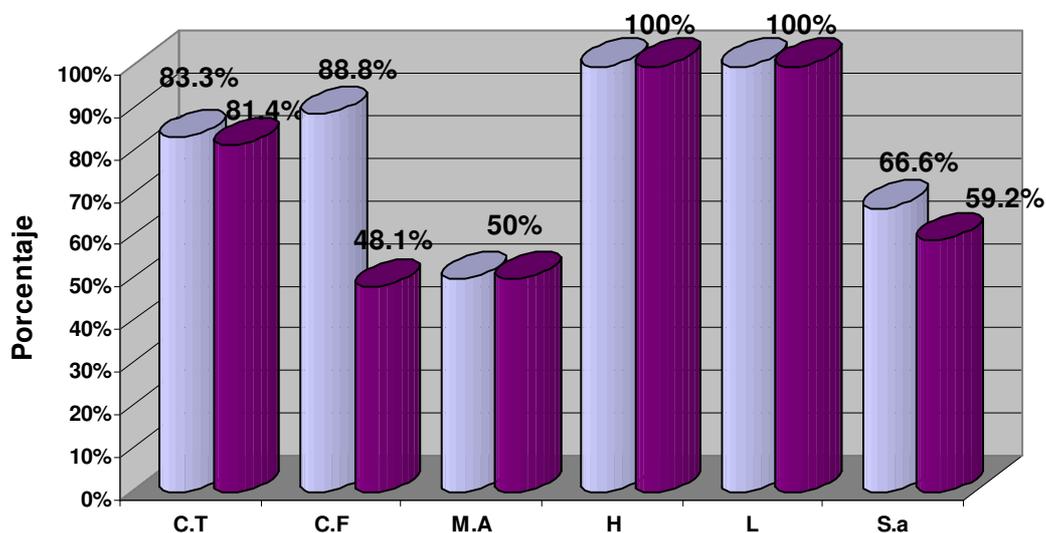


MICROORGANISMOS INDICADORES

En este estudio detectamos que el 100% (n = 45) de las muestras de pollo fresco (rastros y mercados) rebasó los límites permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas (Ver anexo) para Hongos y levaduras (Gráfica 2 y Tabla 3) el 88.8 % para coliformes fecales, el 83.3% para coliformes totales, el 66.6 % para *Staphylococcus aureus* y el 50% para mesófilos aerobios.

Por otro lado se detectó que el 100% de la carne de pollo congelada superó los límites establecidos para hongos y levaduras, el 81.4% para coliformes totales, el 48.1% para coliformes fecales, el 59.2% para *Staphylococcus aureus* y el 50% para mesófilos aerobios.

Gráfica 2. Microorganismos Indicadores que rebasaron la Norma de la Secretaría de Salud.



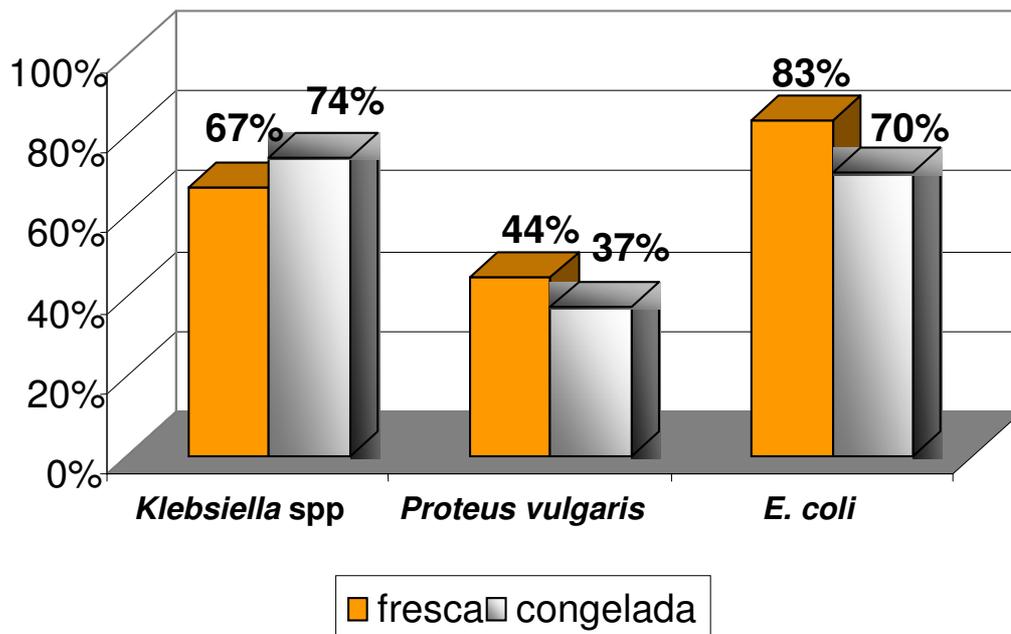
C.T.= Coliformes Totales, C.F.= Coliformes Fecales, M.A.= Mesófilos Aerobios,
H= Hongos, L= Levaduras, S.a= *Staphylococcus aureus*



BACTERIAS GRAMNEGATIVAS AISLADAS

En el 83% de la carne fresca se aisló a *E. coli* en el 67% a *Klebsiella* spp y en el 44.40 % a *Proteus vulgaris*, mientras que en la carne congelada se aisló en el 70% a *E. coli*, en el 74% a *Klebsiella* spp. y en el 37% a *Proteus vulgaris* (Gráfica 3 y Tabla 4).

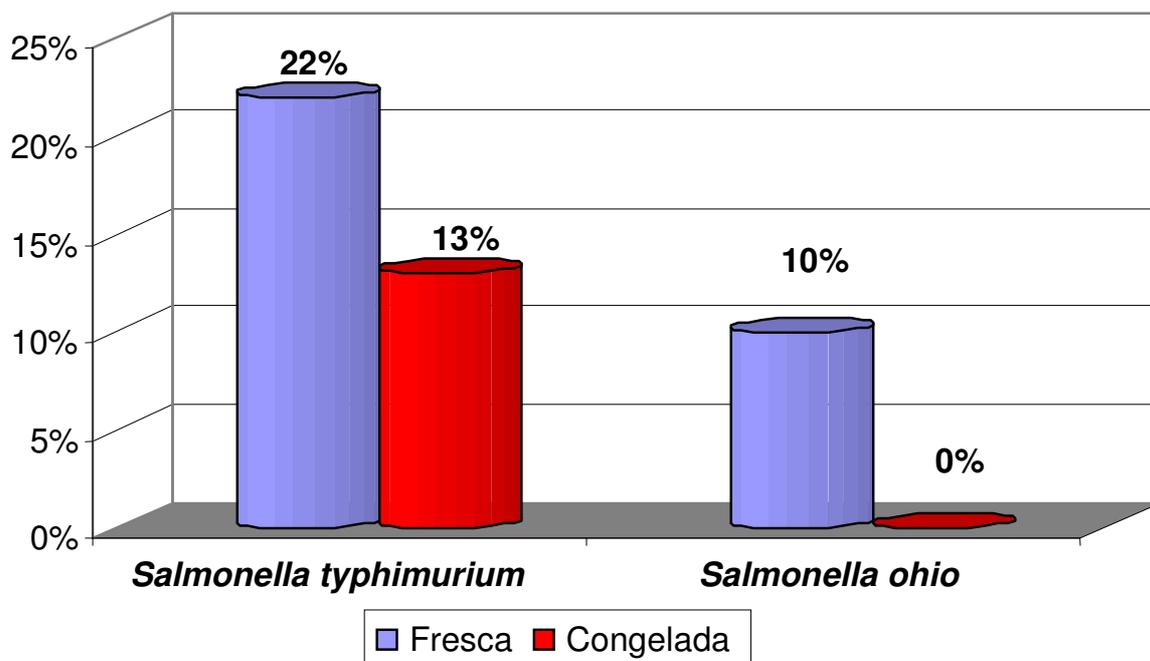
Gráfica 3. Enterobacterias aisladas de la carne de pollo fresca y congelada



IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* SPP. POR PCR MULTIPLEX

Nosotros utilizamos 12 primers (tabla 2) complementarios a regiones internas variables de los genes *fliC* (Fase flagelar I), a fin de detectar amplicones de tamaños característicos que nos permitió identificar los alelos de los antígenos H de los serotipos más frecuentes de *Salmonella*. En la Gráfica 4 se aprecia que en el 22% de las muestras de pollo fresco y en el 13% de las muestras congeladas se identificó a *Salmonella typhimurium*, mientras que el serotipo de *Salmonella ohio*, únicamente se identificó en el 10% de la carne de pollo fresco.

En la figura 1 se observan los amplicones de los antígenos flagelares de fase I de *Salmonella* obtenidos por PCR multiplex de los cultivos bacterianos obtenidos de las muestras de carne de pollo fresca y congelada. En donde en la línea 1 se aprecia el control negativo (sin DNA), en la línea 2 se aprecia *S. typhimurium* (250 pb), en la línea 3 el marcador de peso molecular (50 pb), en la línea 4 (control positivo) *S. infantis* (275 pb) y en las líneas 5-10 *S. ohio* (150 pb).

Gráfica 4. Detección de *Salmonella* spp. por PCR multiplex

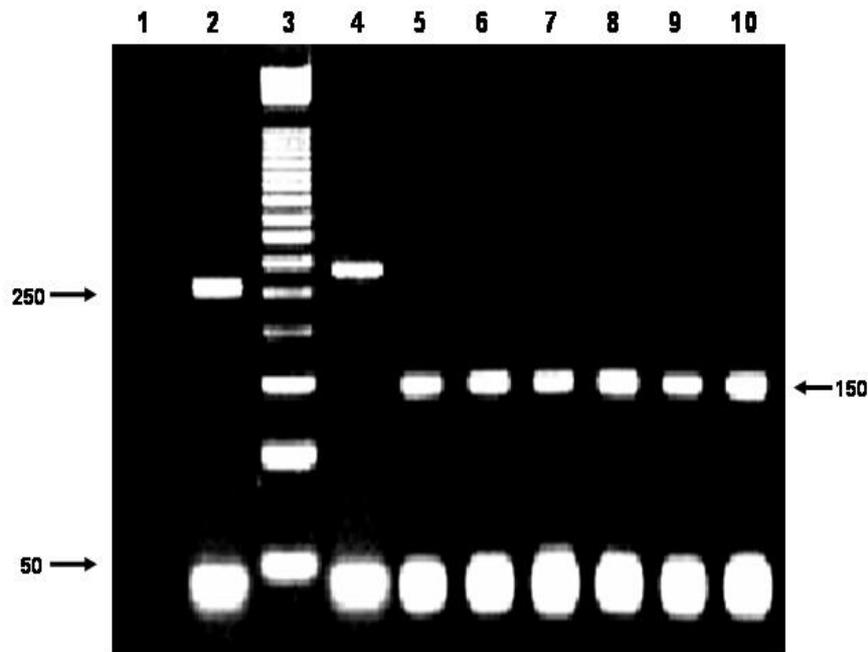


Figura 1. Amplificación por PCR multiplex de los antígenos flagelares de Fase I de *Salmonella*, obtenidos de muestras de carne de pollo. Línea 1: Control negativo. Línea 2: *Salmonella typhimurium*. Línea 3: 50-pb ladder. Línea 4: Control positivo (*Salmonella infantis*); línea 5-10: *Salmonella ohio*.

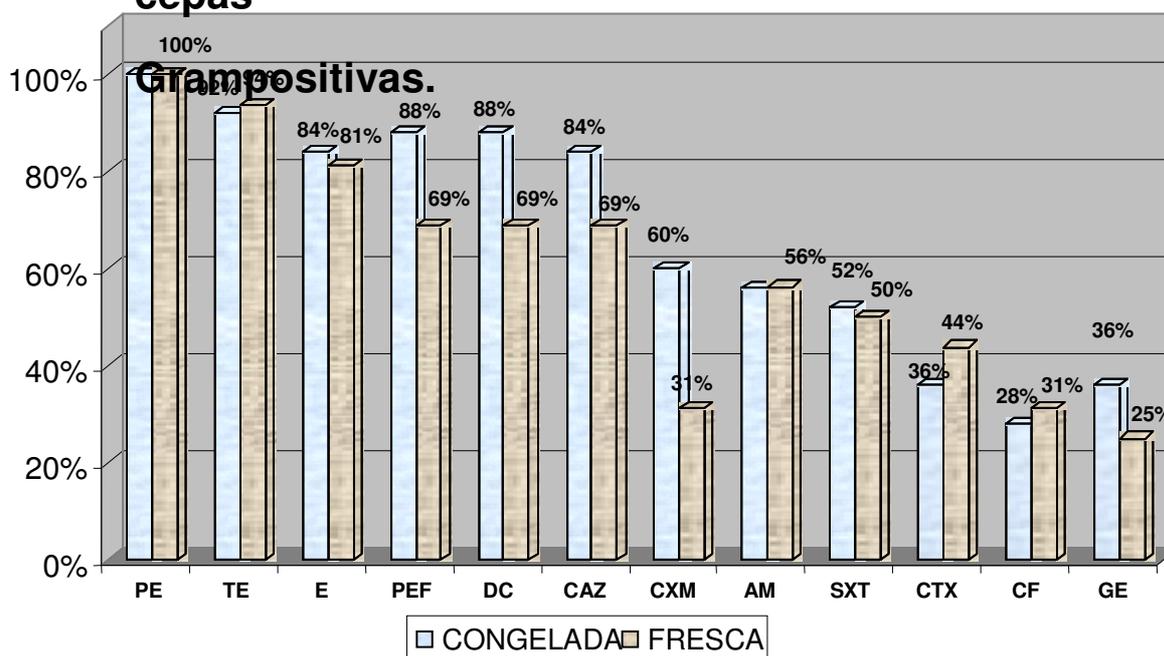
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

Cepas Grampositivas.

En la Gráfica 5 se aprecia que el 100% las cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de la carne de pollo fresca fueron resistentes a la penicilina, 94% a tetraciclina, 81% a eritromicina, 69% a pefloxacina, dicloxacilina y ceftazidima (en cada caso), mientras que los porcentajes más bajos de resistencia bacteriana a estos agentes, fueron para la cefuroxima y cefalotina con 31% (en cada caso) y 25% para gentamicina.

Por otro lado se detectó que el 100% de las cepas Grampositivas recuperadas de la carne de pollo fue resistente a la penicilina, el 92% a tetraciclina, 88% a pefloxacina y dicloxacilina (en cada caso) y el 84% para eritromicina y ceftazidima (en cada caso).

Gráfica 5. Resistencia a antibióticos por las cepas

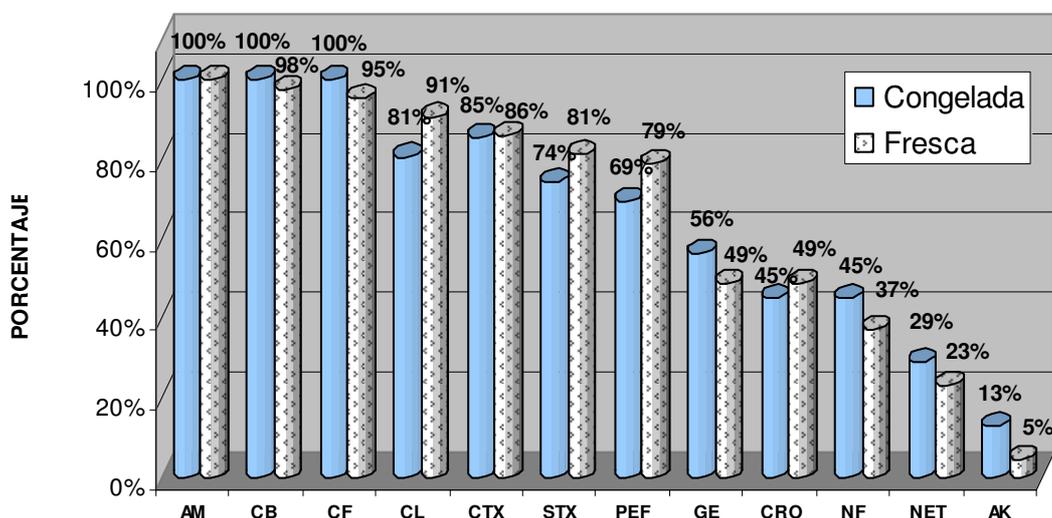


PE – Penicilina, TE – Tetraciclina, E – Eritromicina, PEF – Pefloxacina, DC – Dicloxacilina, CAZ – Ceftazidima, CXM – Cefuroxima, AM – Ampicilina, STX - Trimetoprim-sulfametoxazol, CTX – Cefotaxima, CF – Cefalotina, GE – Gentamicina.

Cepas Gramnegativas.

En la gráfica 6 se aprecia que el 100% de las cepas recuperadas de la carne de pollo congelada fue resistente a ampicilina, carbenicilina y cefalotina (en cada caso), mientras que para la carne de pollo fresco el 100% fue resistente a ampicilina, 98% a carbenicilina, y 95% a cefalotina.

Gráfica 6. Resistencia a antibióticos de cepas Gramnegativas (Enterobacterias).

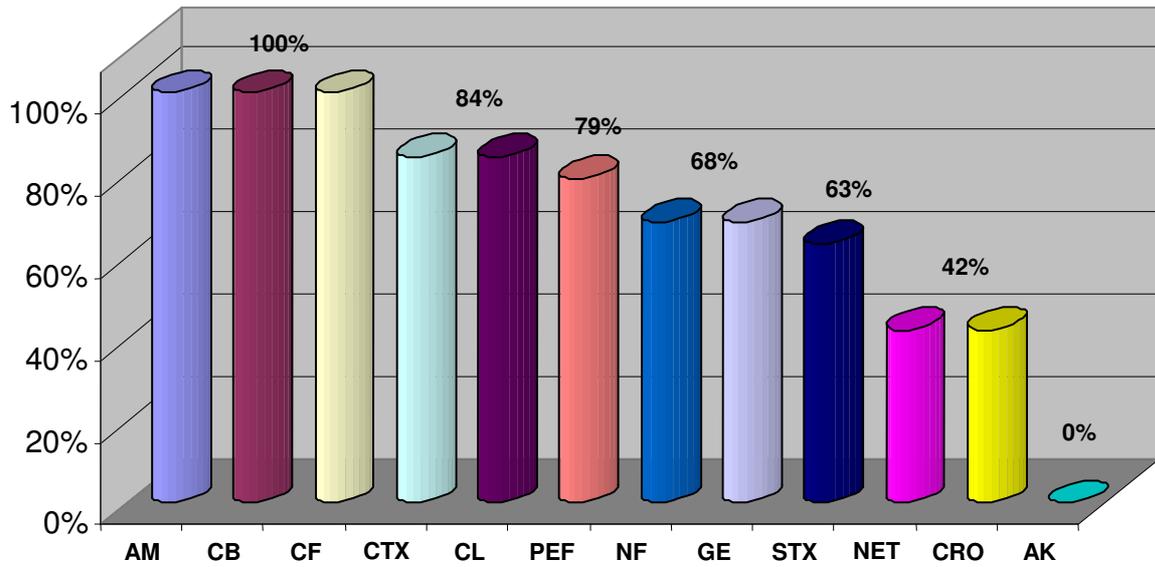


AM – Ampicilina, CB – Carbenicilina, CF – Cefalotina, CL – Cloranfenicol, CTX – Cefotaxima, STX – Trimetoprim – sulfametoxazol, PEF – Pefloxacina, GE – Gentamicina, CRO – Ceftriaxona, NF- Nitrofurantoína, NET – Netilmicina, AK – Amikacina.

S. thyphimurium y S. ohio

En la figura 7 se aprecia que el 100% de las cepas de Salmonella identificadas fue resistente a Ampicilina, carbenicilina y cefalotina, mientras que el 84% presentó resistencia frente a cefotaxima y cloranfenicol. Los menores porcentajes de resistencia se encontraron para netilmicina (42%) y para ceftriaxona (42%).

Gráfica 7. Resistencia a antibióticos por las cepas de *Salmonella* spp.



AM – Ampicilina, CB – Carbenicilina, CF – Cefalotina, CTX – Cefotaxima, CL – Cloranfenicol, PEF – Pefloxacina, NF – Nitrofurantoína, GE – Gentamicina, STX – Trimetoprim – sulfametoxazol, NET – Netilmicina, CRO – Ceftriaxona, AK – Amikacina.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CARNE DE POLLO CONGELADA Y FRESCA

ORIGEN	CONDICIÓN	No. DE MUESTRA	COLIFORMES TOTALES NMP/ g ó ml.	COLIFORMES FECALES NMP/ g ó ml.	MESÓFILOS AEROBIOS UFC/ g ó ml.	HONGOS UFC/ g ó ml.	LEVADURAS UFC/ g ó ml.	<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g ó ml.	
Rastros		1	> 1100	> 1100	83 000	64 000	110 000	10 000 000	
		2	1100	> 1100	17 000 000	73 000	83 000	10	
		1	460	> 1100	6 000 000	262 000	11 000 000	8 000	
		2	460	> 1100	4 000 000	35 000	2 000 000	1 000 000	
		A	> 1100	> 1100	345 000 000	105 000	1000 000	300 000	
		28	> 1100	> 1100	186 000 000	48 000	220 000 000	300 000	
Mercados	FRESCA	9	> 1100	> 1100	310 000 000	10 000	283 000 000	0	
		10	> 1100	> 1100	60 000 000	26 000	22 000 000	10	
		2a	> 1100	> 1100	82 000	440	75 000 000	3 000 000	
		1b	> 1100	> 1100	938 000	142 000	438 000	307 000	
		2b	> 1100	1100	1 000 000	26 000	255 000	1200	
		5c	> 1100	> 1100	227 000	66 000	126 000 000	3 000 000	
		3	> 1100	> 1100	163 000 000	173 000	1 000 000	3 000 000	
		12	> 1100	> 1100	207 000	2000	155 000	2 000 000	
		H	> 1100	1100	76 000 000	336 000	282 000	400	
		45	> 1100	> 1100	451 000 000	150 000	317 000 000	2 000 000	
		8	>1100	> 1100	37 000 000	123 000	26 000 000	20	
		3	> 1100	> 1100	3 000 000	89 000	2 000 000	600	
		CONGELADA	4	> 1100	< 1100	62 000 000	300 000	303 000 000	120
			1a	> 1100	> 1100	132 000 000	26 000	192 000 000	3 000 000
	3b		> 1100	460	1 000 000	70 000	765 000	2000	
	4c		> 1100	> 1100	8 000 000	93 000	5 000 000	290	
	6c		> 1100	> 1100	294 000 000	40 000	124 000 000	3 000 000	
	9		< 1100	< 1100	2 000 000	86 000	2 000 000	2 000 000	
	10		> 1100	< 1100	49 000 000	82 000	19 000 000	200	
	11		> 1100	< 1100	1000 000	70 000	546 000	600	
	13		93	240	2 000 000	80 000	10 000 000	300 000	
	B		> 1100	1100	158 000 000	165 000	395 000	200	
	Tiendas de Autoservicio	20	> 1100	460	1000 000	43 000	218 000	120 000	
		21	> 1100	> 1100	2 000 000	40 000	338 000	2500	
22		> 1100	> 1100	35 000 000	22 000	54 000 000	2900		
29		> 1100	> 1100	210 000 000	179 000	214 000	700 000		
30		> 1100	> 1100	151 000 000	90 000	119 000 000	2 000 000		
31		> 1100	> 1100	150 000 000	340 000	229 000 000	500 000		
42		> 1100	> 1100	69 000 000	234 000	229 000 000	500 000		
43		> 1100	> 1100	223 000 000	621 000	228 000 000	1 400 000		
44		> 1100	> 1100	581 000 000	331 000	359 000 00	10 000		
8		> 1100	< 1100	317 000	106 000	701 000	0		
4	> 1100	> 1100	* 57 000 000	97 000	16 000 000	700			
W	23	3.6	29 000	94 000	140 000	230 000			
C	> 1100	160	2 000 000	124 000	245 000 000	320 000			
CH	> 1100	240	4 000 000	67 000	5 000 000	0			
5	150	1100	* 8 000 000	87 000	12 000 000	190			
6	> 1100	> 1100	3 000 000	46 000	80 000	0			
7	23	23	2 000 000	478 000	1 000 000	100			

Tabla 3. Cifras de microorganismos indicadores encontradas en las diferentes muestras de carne pollo.

* Cifras que rebasan la Norma Oficial Mexicana.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CARNE DE POLLO CONGELADA Y FRESCA

ORIGEN	CONDICIÓN	No. DE MUESTRA	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>Salmonella ohio.</i>		
Rastros		1	x		x				
		2	x	x	x				
		3			x				
		4		x	x				
		5	x				x		
		6				x	x		
Mercados	FRESCA	7		x	x				
		8			x				
		10	x	x	x	x			
		11	x		x	x			
		13	x	x					
		14	x	x	x	x			
		15	x		x				
		16	x		x				
		17	x				x		
		18	x		x				
		19	x	x	x	x			
		20			x	x			
		Mercados	CONGELADA	21		x	x		
				22	x		x	x	
23	x			x					
24					x		x		
25				x	x				
26	x				x	x			
27	x				x				
28	x				x				
29	x				x				
30	x						x		
31	x						x		
32						x	x		
33	x								
34	x						x		
35	x			x					
36						x	x		
37	x			x	x	x			
38	x		x	x	x				
39		x			x				
40	x	x	x						
41	x	x							
Tiendas de Autoservicio		Wal Mart	x		x				
		Comercial Mexicana	x	x	x				
		Chedraui	x		x				
		Wal Mart			x				
		Chedraui	x	x					
Wal Mart		x		x					

Tabla 4. Enterobacterias aisladas de las muestras de carne de pollo analizadas.

X Indica la presencia de bacterias.

DISCUSIÓN.

MICROORGANISMOS DETECTADOS EN LA CARNE DE POLLO

En este estudio describimos que el 100% (n = 45) de las muestras de pollo fresco (rastros y mercados) rebasó los límites permitidos por la Norma Oficial Mexicana para Hongos y levaduras (Gráfica 2 y Tabla 3), el 88.8 % para coliformes fecales, el 83.3% para coliformes totales, el 66.6 % para *Staphylococcus aureus* y el 50% para mesófilos aerobios, mientras que el 100% de la carne de pollo congelada superó los límites establecidos para hongos y levaduras, el 81.4% para coliformes totales, el 48.1% para coliformes fecales, el 59.2% para *Staphylococcus aureus* y el 50% para mesófilos aerobios (Gráfica 2). Los elevados porcentajes de los grupos de microorganismos detectados por nosotros en la carne de pollo, contrastan con los reportados en un amplio estudio realizado en los alimentos del comedor del Hospital General de Tlalnepantla³, en donde se reportó que el 53.2% de las muestras analizadas (pollo y carne roja) rebasaron las normas establecidas por la Secretaria de salud para mesófilos aerobios, el 59.4% para coliformes totales, el 43.8% para coliformes fecales y el 18.8% para hongos.

En este estudio describimos que en el 66.6 % de las muestras de pollo fresco y en el 59.2% de las muestras de pollo congelado se detectó a *Staphylococcus aureus* (Gráfica 2 y tabla 3), lo cual podría representar un serio problema de salud para los consumidores, debido a que en un estudio realizado en los años de 1980 a 1989, se reportaron brotes de toxiinfecciones alimentarias y se confirmó que *Staphylococcus aureus* fue el responsable del 48.2% de los casos⁴⁸. Se ha descrito que un número importante de cepas de *S. aureus* produce alguna de las siete enterotoxinas más conocidas, las cuales al momento de la infección pueden causar síntomas característicos como; náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea, desarrollándose entre 1 y 6 horas después de haber consumido el alimento. Generalmente estos síntomas no persisten más allá de 24 horas, pero en casos severos puede haber deshidratación que en personas ancianas y en niños podría ser grave²³. Es por esto que las muestras de alimentos con

cargas por arriba de las permitidas por la Norma Oficial Mexicana representan un peligro para los consumidores, por tener una mayor posibilidad de contener enterotoxinas. La contaminación de los alimentos por *Staphylococcus aureus* generalmente es debida a portadores, que durante el proceso o manipulación de los alimentos pueden contaminarlos.

Nosotros reportamos que en el 83% de la carne de pollo fresca y en el 70% de carne congelada se recuperó a *Escherichia coli* (Grafica 3). La elevada presencia de ésta especie en la carne de pollo resulta peligroso para los consumidores, debido a que *Escherichia coli* se encuentra entre las principales bacterias que ocasionan infecciones gastrointestinales en los humanos.²¹ Por ejemplo en un estudio realizado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) de la Secretaría de Salud, en el cual, se muestrearon rectalmente a 1550 pacientes de la población del Valle de Chalco, Estado de México, que presentaron diarrea y vómito durante el desastre natural acontecido el 31 de mayo de 2000, se detectó en el 76.6% a *E. coli*; 62.2% *Escherichia coli* enterotoxigénica, 0.84% *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enteropatógena, en cada caso y *E. coli* enterohemorrágica en el 0.08%.¹¹

Se ha descrito que *E. coli* provoca en la población mundial alrededor de 630 millones de casos de diarrea anualmente con aproximadamente 775.000 muertes, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo.⁷ Se ha descrito que *E. coli* Verotoxigénica (VTEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (VTEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteroadherente (EAEC) son responsables de más del 25% de todas las enfermedades diarreicas ocurridas en países desarrollados.³⁶

DETECCIÓN DE *Salmonella* POR PCR MULTIPLEX

En este estudio reportamos que en el 22% de las muestras de pollo fresco y en el 13% de pollo congelado se identificó a *Salmonella typhimurium* (gráfica 4), mientras que

Salmonella ohio se detectó únicamente en las muestras de pollo fresco en un 10% (Grafica 4). Se ha descrito que el pollo es uno de los principales alimentos transmisores de *Salmonella* spp.¹⁷ Por ejemplo en un estudio realizado en 70 muestras de pollo crudo obtenidas en pollerías de Guadalajara, se detectó a *Salmonella* en el 69%.⁹ En otro estudio realizado en la ciudad de México en el periodo comprendido entre los años 1973 a 1977, en donde se analizaron 9,322 muestras de alimentos, se encontró que el serotipo de mayor incidencia fue *Salmonella derby* seguido por *Salmonella london*, *Salmonella give*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella agona*.⁵⁰ La salmonelosis representa un serio problema de salud, debido a que aproximadamente de 2 a 4 millones de casos ocurren cada año a nivel mundial, pero solo el 1 % recibe atención por las autoridades de Salud Pública.²⁰ En 1995 el sistema de vigilancia de los países miembros de la OMS reportó que el 76.1% de los aislamientos correspondieron a los serotipos *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. typhi*, en donde *Salmonella enteritidis* fue mas frecuente en 35 países, seguido por *Salmonella typhi* (12 países) y *Salmonella typhimurium* (8 países). Las principales serovariedades aisladas globalmente para 1995 incluyeron *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. hadar*, *S. infantis*, *S. newport*, *S. typhi*, *S. agona*, *S. Virchow* y *S. heidelberg*. Los aislamientos de *Salmonella enteritidis* se incrementaron de 25.6% en 1990 a 36.5% para 1995. En México en un estudio realizado en 24,934 cepas de *Salmonella* recuperadas de pacientes infectados en diversos centros de salud públicos y privados de la República Mexicana en el periodo de 1972 a 1999, se encontró que éstas se distribuyeron 199 serotipos distintos, dentro de los cuales *S. typhimurium* se identificó en 3225 ocasiones, *Salmonella newport* en 865, *Salmonella anatum* en 608, *S. infantis* en 326 y *S. ohio* en 61.²²

La incidencia de *Salmonella* no solamente ocurre en nuestro país, sino en todo el orbe, por ejemplo; El laboratorio de la Secretaría Distrital de Salud de Bogota (responsable de la detección de *Salmonella* spp), informó un incremento de positividad de 4.7% de 1988 a 15.2% para 1999. Las muestras positivas provenían principalmente de carne cruda de cerdo, res, pollo, y en menor grado pescado.⁵³ En Canadá el género *Salmonella* continúa siendo el principal agente productor de enfermedades por alimentos contaminados. En 1979, este patógeno fue responsable de 62 de los 130 incidentes

reportados de etiología microbiológica conocida. De esos 62, 9 fueron atribuidos a pollo, 16 a pavo y uno a otras carnes. La incidencia de *Salmonella* en canales de pollo se ha incrementado en años recientes desde 36% en 1975 a 63 % en 1982.⁵

En México se registró un incremento de 100,342 casos de salmonelosis en el año de 1994 a 215,155 en 1998 (tasa de de 111.21 y 223.53 por 100,000 habitantes respectivamente) con una mayor incidencia en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años, siendo el segundo grupo mas afectado. En cuanto a frecuencia con relación a los meses del año ésta se intensifica a partir de de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre, los estados mas afectados han sido Coahuila, Chiapas y Quintana Roo.²²

La carne y otros alimentos contaminados son especialmente peligrosos cuando se han mantenido bajo circunstancias que favorecen la multiplicación de la *Salmonella* y especialmente durante la época del calor. Las carnes crudas son uno de los principales vehículos de transmisión, ya que este patógeno ha estado implicado en una buena cantidad de brotes y aunque la carne de pollo no se consume cruda si existe contaminación cruzada con otros alimentos frescos potenciando riesgo en la salud.

En la actualidad, la globalización ha obligado a las empresas productoras de alimentos en México a mejorar sus condiciones sanitarias, así como sus condiciones de producción con el objeto de obtener una mayor eficiencia técnica y económica. Refiriéndose especialmente a la industria avícola, esto se traduce en un gran compromiso, pues en México esta industria representa un gran soporte para la alimentación de la población Mexicana.

Se ha reportado que en México desde 1972 a 1989, *S typhi* ocupó el cuarto lugar de frecuencia,²² esto se debió a los brotes ocurridos en 1972 en la ciudad de México y a partir de 1990 se observó un descenso en la frecuencia de aislamientos (1-2%), que coincide con la entrada del cólera a México. En contraste *S. enteritidis* se había

detectado en menor frecuencia, con menos del 10%, pero a partir de 1991 se observó un incremento de cuatro veces en las muestras humanas.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

Bacterias Grampositivas.

En este trabajo reportamos que la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de la carne de pollo fresca y congelada fueron resistentes a la penicilina, tetraciclina, pefloxacina y dicloxacilina (Gráfica 5). La elevada resistencia bacteriana a los antibióticos, principalmente a los de elección, como penicilina y dicloxacilina, no nos sorprende, debido a que en los últimos años ha ocurrido un incremento de las cepas de *Staphylococcus* resistentes a los antimicrobianos, por ejemplo en los hospitales de EUA en el año de 1975 al año de 1991 ocurrió un incremento en el porcentaje de las cepas de *S. aureus* resistentes del 2.4% al 29%.²

En la ciudad de México en un estudio realizado en 296 cepas de *S. aureus* y 212 de *Staphylococcus coagulasa* negativa colectadas en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría durante 1998-1999 y 127 cepas de *S. aureus* y 786 cepas de *S. coagulasa* negativa colectadas en pacientes del Hospital Infantil de México, Federico Gómez durante 1998-2000, se encontró que el 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* coagulasa negativa fueron resistentes a la oxacilina, amoxicilina-clavulanato, ticarcilina-clavulanato, cefepime, ceftriaxona e imipinem.²⁶

Bacterias Gramnegativas

Nosotros describimos que la mayoría de las cepas Gramnegativas aisladas de la carne de pollo fresca y congelada (Gráfica 6 y 7) fueron resistentes a los antimicrobianos ampicilina, carbenicilina, cefotaxima y cloranfenicol. La elevada resistencia de las cepas

Gramnegativas a los antibióticos detectada por nosotros, podría constituir un serio problema de salud para los consumidores, sobre todo, si consideramos los serotipos de *Salmonella* detectados. Nuestros porcentajes de resistencia bacteriana encontrados en este trabajo corroboran lo propuesto en un estudio, en donde se evaluó la efectividad de antibióticos en las bacterias identificadas.⁴⁵ Estos autores describieron que de las 137 cepas Gramnegativas aisladas de infecciones de un total de 118 pacientes, el 100% de las cepas fue resistente a ampicilina y cefalotina. En otro estudio realizado en 177 cepas de *E. coli*, obtenidas de infecciones post-parto en el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Florida, se encontró que la mayoría de fue resistente a penicilina (Edwards R.K. et al., 2002). Por otro lado en un trabajo realizado con cepas de *E. coli* y de *Klebsiella* spp. aisladas de pacientes infectados en cinco hospitales de El Cairo, Egipto, reveló que la mayoría fue resistente a penicilina y ampicilina.²⁸

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las muestras de pollo congelado y fresco rebasaron los límites permitidos por la Secretaría de Salud para los principales grupos de microorganismos.
2. La elevada prevalencia de bacterias como *E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus vulgaris*, evidenció la contaminación fecal de la carne de pollo.
3. En este estudio se identificaron por PCR Multiplex los serotipos de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella ohio*, lo cual representa un riesgo de salud para los consumidores, debido a que la incidencia de la salmonelosis en nuestro país ocasionada por estas serovariedades ocupa los primeros lugares.
4. El uso de la PCR como un implemento de detección de *Salmonella* spp. en la carne de pollo, nos ofreció resultados confiables y más rápidos que los métodos tradicionales, debido a la elevada sensibilidad y especificidad de esta novedosa técnica de Biología molecular.
5. La mayoría de las cepas Grampositivas y Gramnegativas aisladas de la carne de pollo, fueron resistentes a los antibióticos de elección.
6. Las elevadas cargas de microorganismos detectadas en el pollo fresco y congelado analizado, reflejó que el consumo de pollo expendido en estos lugares podría representar un serio problema de salud para los consumidores, sobre todo si consideramos la alta resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

7. La implementación de la PCR, no únicamente en la detección de *Salmonella* spp, sino también en la de los diferentes grupos diarreogénicos de *Escherichea coli* que ocasionan gastroenteritis, nos permitirá reforzar los métodos propuestos por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SSA1-1994, y de este modo notificar de manera más rápida y precisa a la Secretaría de Salud, sobre la identificación de bacterias que necesiten un control sanitario.

8. Los resultados evidenciaron la elevada contaminación por bacterias patógenas en la carne de pollo fresca y congelada por lo que resulta importante que se establezcan programas informativos entre la población para disminuir los factores de riesgo de infecciones gastrointestinales.

ANEXO

- Norma Oficial Mexicana **NOM-087-SASA1-1994**. Bienes y Servicios. Aves frescas refrigeradas y congeladas, enteras y troceadas envasadas. Especificaciones Sanitarias.

Parámetro	Limite Máximo
Mesófilos aerobios ufc/g	10,000,000
<i>Salmonella</i>	Ausente

- Norma Oficial Mexicana **NOM-034-SSA1-1993**. Bienes y Servicios. Productos de la carne molida y carne molida moldeada. Especificaciones Sanitarias

Parámetro	Limite Máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,000 ufc/g

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA CARNE DE POLLO CONGELADA Y FRESCA

- Norma Oficial Mexicana **NOM-067-SSA1-1993**. Bienes y Servicios. Productos de la carne, productos carnicol curados, emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias

Parámetro	Limite Máximo
Hongos y levaduras	<10 ufc/g

- Organismo de acreditación, Departamento de ciencia de los alimentos y biotecnología. Carne y productos carnicos.

Parámetro	Limite Máximo
Coliformes totales y fecales	< 3 NMP/g

BIBLIOGRAFÍA:

1. Abraham EP, Chain, Fletcher, C.M, Florey, H.W, Gardener,A.D, Heatley, N.G. and Jennings, M.A. Further observation on *Lancet penicilin*. 1941:77-188
2. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. *Clin Infect Dis*. 1998;26:1179-1181
3. Barrientos A.C. Evaluación bacteriológica de los alimentos del Hospital General de Tlanepantla. Tesis Profesional. Licenciatura en biología. ENEP- Iztacala. UNAM. México. 1997.
4. Bello. P. y Abarca M. Incidencia de *Salmonella* en chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero. México. *Sal púb Méx* 1991;33:178-183.
5. Bello Pérez, Ortiz D, Pérez M, Castro D. *Salmonella* en carnes crudas: Un estudio en localidades del Estado de Guerrero. México. *Sal púb Méx* .1990;32:74-79
6. Berghold.C., Kornschober.C., Lederer.I. y Allerberger.F. Occurrence of *Salmonella enteritidis* phage type 29 in Australia:An Opportunity to assess the relevance of chicken meat as source of human *Salmonella* infections. *Euro Surveill* 2004; 9 (10): 31-34
7. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P, González E.A., Hernández H. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo.
8. Bryan F. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Systems for retail food and restaurant operations. *J Food Prot*. 1978; 41: 816-27

9. Castillo-Ayala, A.M ., M.G. Salas Ubiarco , L.M. Márquez Padilla & M.D. Osorio Hernández. Incidencia de *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. en pollo crudo y rostizado en Guadalajara, México. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 1993; 35:371-375.
10. Correa .P. Arias-Stella .J. Perez.R.T. Carbonell. L. M. Texto de Patología. Segunda edición. México. 1975:172-173
11. Cortés OIA, Rodríguez AG, Moreno EEA, Tenorio LJM, Torres MBP, Montiel VE. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Sal Púb Mex.* 2002; 44: 297-302
12. Detección de patógenos en alimentos. Disponible en: <http://ciencias.uniandes.edu.co/pdf/deteccion.pdf>
13. Dirección General de Epidemiología. Informe Semanal 1990; 52
14. .Disponible:<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf>
15. Elwell , L.1978.Common plasmid specifying tobramicinresistence in two enteric bacteria insolated from burn patients. *Antimicrob.Agents Chemother.* 13:312-317
16. Edwards RK, Clark P, Sstrom CL, Duff P. Intrapartum antibiotic prophylaxis 1: relative effects of recommended antibiotics on Gram-negative pathogens. *Obstet Gynecol* 2002;100:534-539.
17. Fernandez, E.E& M.C Hernandez. Fuentes de contaminación de *Salmonella* en empacadoras de carne. *Rev. Lat-Amer. Microbiol* 25: 5155
18. Frazier. W. 1972.Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. España.

19. Franklin T.J. & Snow G.A. Biochemistry of antimicrobial action Champan and Hall. Londres 1989.
20. García. M.A., Tellez I.G., García E.G., Valladares D.C.J.C.,Urquiza. B.O. Determinación de la existencia de *S. enteritidis* serotipo enteritidis a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* sp provenientes de brotes de campo de aves domesticas. *Vet Méx.* 1996;27(4) 243 - 345.
21. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis* 1990;12:41–50
22. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP, González AMC. Serotipos de *Salmonella* identificadas en los servicios de salud de México. *Sal Púb Mex.* 2000;42:490-495
23. Hernández M.V.P. Búsqueda de *Salmonella* spp. Durante un procesamiento de pollo de engorda en un rastro de Guanajuato. Tesis de Licenciatura en Químico Fármaco Biólogo. FES Cuautitlan. México. 2005. 48 p.
24. Hinojo. C.G., Acosta. G. R., de la Garza B.M, Flores G.G vigilancia de coliformes totales, fecales y mesófilos en alimentos proporcionados en comedores industriales de Reynosa, Tamaulipas. Congreso de inocuidad alimentaría. No. 5-2004
25. Hui.Y.H. Guerrero. L. I. y Rosmini. M.R. Ciencia y Tecnología de Carnes. Editorial. Limusa. México.2006
26. Jaimes EC, De los Monteros LEE, Beltrán RA Epidemiology of drug resistacse: The case of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci infections. *Sal. Pub Mex.* 2002;44:108-112

27. Jawetz.E., Melnick.J.L.P., Adelberg.E.a. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial el manual moderno., S.A. de C.V. México.1996. p.262.
28. Kholly EA, Baseem H, Hall GS, Procop GW, Longworth DL. Antimicrobial resistance in Cairo, Egypt 1999-2000: a survey of five hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:625-63015).
29. Kissane.J.M., Anderson.W.A.O. Patología. Editorial Panamericana. Octava edición. Argentina .Volumen 1. 1984
30. López M. Análisis bacteriológico de los alimentos del Centro Hospitalario 20 de Noviembre. Tesis de Licenciatura en Químico Fármaco Biólogo. FES Cuautitlán. México. 1982.122 p.
31. Mac Faddin.T.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Editorial Panamericana. Argentina. 1990. 850 pp.
32. Martínez N. Estudio bacteriológico de los alimentos del comedor de la ENEP Iztacala. Tesis de licenciatura en Biología. ENEP- Iztacala. México. 2001. 65 p.
33. Maclean, I.H. Rogers, K.B. and Fleming, A.M.& B.693 and *Pneumococci lancet* 1939.1 :562-568
34. Murray, 1964. Kilham, L., Wilcox, C; & Finland, M.1964.Development of streptomycin resistance of gramnegative bacili in vitro and during treatment. *Proc Soc.Exptl.Biol. Med.* 63:470-474.
35. Murray. P.R.1992.Microbiología Médica. Editorial Mossby. España. p.110, 111
36. Mota F, Perez-Ricardez ML. Control of diarrheal diseases in Mexico and Latin America. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1989;46(5):360-7

37. Norma Oficial Mexicana. NOM- 087-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Aves frescas refrigeradas y congeladas enteras y troceadas envasadas. Especificaciones sanitarias.
38. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994 (A y B). Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
39. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994 (B) Método de cuenta en placa para mesófilos aeróbios.
40. Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994 (C) Método para la cuenta de hongos y levaduras en alimentos.
41. Norma Oficial Mexicana. NOM-115-SSA1-1994. Método para la cuenta de *Staphylococcus aureus*.
42. Norma Oficial Mexicana. NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coniformes. Técnica del número más probable.
43. Norma Oficial Mexicana. NOM-034-SSA1-1993. Productos de la carne molida y carne molida moldeada. Especificaciones Sanitarias.
44. Norma Oficial Mexicana. NOM-067-SSA1-1994. Productos de la carne, productos carnicos curados, emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
45. Paniagua C GL, Monroy PE, Trujillo AJ, Vaca PS, Negrete AE, Olvera PJ. Prevalencia de infecciones en herida quirúrgica en pacientes dados de alta de un hospital general. *Rev Hosp. Gral.* 2006;69:78-83
46. Pascual A.M.R. Microbiología alimentaría, metodología analítica para alimentos y bebidas. 1992. Ediciones de Santos S.A. España

47. Paratifoidea y otras Salmonelosis Disponible en <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/ii/2/contexto/nom034.html>
48. Parilla C., Vásquez. C., Saldate. C. y Nava. F. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Sal.Púb. Méx.*1993; 35:456-463.
49. Pérez M., G. Rodríguez, P. Lara e I. Guerrero. Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat science* 1996;51: 279- 282.
50. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Epidemiología. Boletín Mensual Epidemiológico. 1987. Información Estadística sobre Enfermedades Transmisibles.
51. Secretaria de Salubridad y Asistencia. Dirección general de epidemiología.1990. Boletín mensual epidemiológico. Información estadística sobre enfermedades transmisibles
52. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Disponible en: http://www.insp.mx/salud/42/426_2.pdf
53. Uribe C, Suárez C.,Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar.*Colomb Med* 2006; 37:151-158
54. Watanade,T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 1963.27:87-115.