



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS PATÓGENOS DEL
GÉNERO *SALMONELLA* Y *ESCHERICHIA COLI* EN MUESTRAS DE
CARNE Y QUESO FRESCO POR MÉTODOS CONVENCIONALES Y PCR.**

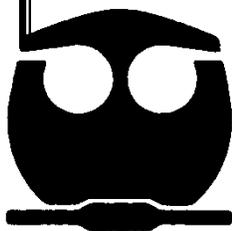
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JUAN JOSE POLANCO POLANCO

MÉXICO, D. F. MAYO DE 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SECRETARIO: JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE

1^{ER} SUPLENTE: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUIZ

2^º SUPLENTE: FELIPE CRUZ GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CENID- MICROBIOLOGÍA; INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN FORESTAL AGRARIO Y PECUARIO

ASESOR DEL TEMA: JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE

SUSTENTANTE: JUAN JOSE POLANCO POLANCO

Agradecimientos

Agradezco al CENID-Microbiología, INIFAP por el apoyo que me brindó para poder hacer este trabajo, el cual fue financiado con el proyecto: **DETECCIÓN MOLECULAR DE CINCO PATÓGENOS BACTERIANOS EN CARNE Y QUESO FRESCO DE BOVINOS PARA CONSUMO. No. 260232M.**

Agradezco al Dr. Jesús Vázquez por la asesoría y el apoyo que me otorgo durante la realización de la tesis

Agradezco las correcciones, la asesoría y el apoyo brindado por los sinodales de mi tesis

Dedicatoria

A mi familia por todo el apoyo brindado durante estos años, en especial a mi padre Elias Polanco Braga, a mi tío Juan Polanco Braga y a mi tía Catalina Nova Arroyo, ya que fueron elementos fundamentales durante mi carrera y la elaboración de la tesis.

A mis hermanos Adrian y Elias por todos los momentos que compartimos, gracias a sus críticas y consejos que me permitieron crecer como persona.

Gracias a Estelita por los momentos que pasamos juntos, por su apoyo y ayuda durante la carrera, así como en la parte experimental de mi trabajo

A mis amigos Daniel, Adriana, Hilario, Alejandra, Teresa y a los “morros” por todo lo que hicieron por mí y sobre todo por su compañía en la facultad

Resumen

Los géneros bacterianos estudiados en el presente trabajo son: *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., debido a que se reportan frecuentemente en productos derivados de la industria pecuaria. Estos patógenos poseen varios factores de virulencia como enterotoxinas termolábiles y termoestables, lipopolisacarido, proteínas que participan en la invasión y sobrevivencia dentro del macrófago. Desde este punto de vista, se utilizan para el diagnóstico algunos marcadores molecular como el gene *invA* y la subunidad 16S ribosomal para la detección de bacterias del género *Salmonella*, mientras que para los serotipos de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) se utilizan los genes *eltAB* y *stx1* respectivamente.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de aislar e identificar bacterias del género *Salmonella* sp., ECET y ECEH en muestras de carne y queso fresco obtenidas de mercados municipales de varios estados del centro del país mediante técnicas bacteriológicas y PCR.

Los resultados de este trabajo permitirán conocer la frecuencia de estos patógenos en estos mercados de abasto popular, así como el riesgo sanitario al que están expuestos las personas por consumir productos como el queso fresco elaborado con leche no pasteurizada. En este trabajo se analizaron 79 muestras de carne y 40 muestras de queso fresco tipo ranchero obtenidas de 8 estados del centro del país. De todas las muestras analizadas se aislaron 33 cepas del género *Salmonella* sp. a partir de carne de res y 16 de quesos fresco tipo ranchero, por lo que corresponde a *Escherichia coli*, se aislaron 24 cepas de carne de res y 15 de queso fresco. En los muestreos se pudo observar que el 70% de las muestras estaban contaminadas con enterobacterias de las cuales, cerca del 38% son *Salmonellas* en carne y queso, mientras que de *E. coli* son de 35%. Por lo que corresponde a la identificación de serotipos de *Salmonella* Enteritidis 16 fueron aisladas de carne de mientras que 7 fueron aisladas de quesos. Con el PCR en punto final se detectaron en las cepas del género *Salmonella*: 16 cepas (48%) en

carne y 7 cepas (44%) en queso. Mientras que de *E. coli* fueron en 9 cepas (39.2%) en carne y 6 cepas (43%) en quesos. Con esto resultados se concluye que tanto en carne como queso fresco distribuidos en los mercados de abasto popular de los estados analizados, están presentes serotipos patógenos de estos dos géneros bacterianos, lo cual representa un riesgo.

Índice

1. Introducción.....	9
1.1 <i>Salmonella</i>	9
1.1.1 Características generales.....	9
1.1.1.2 Distribución, incidencia y supervivencia.....	11
1.1.1.3 Factores de crecimiento.....	12
1.1.1. 4 Incidencia en agua	13
1.1.1.4.1 Carne cruda, carne cocida y productos cárnicos.....	13
1.1.1.5 Epidemiología de la salmonelosis.....	14
1.1.2 Enteritidis Características de la enfermedad.....	15
1.1.2.1 Sintomatología.....	15
1.1.2.2 Tratamiento.....	15
1.1.3 Enfermedad sistémica.....	15
1.1.3.1 Sintomatología.....	16
1.1.3.2 Tratamiento.....	16
1.1.4 Colonización asintomática.....	17
1.1.5 Mecanismos de transmisión.....	17
1.1.6 Defensas del huésped.....	18
1.1.7 Factores de virulencia.....	19

1.1.8 Enterotoxinas.....	19
1.1.9 Endotoxinas.....	20
1.1.10 Verotoxinas o toxinas de Shiga.....	20
1.2 <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.1 Características del microorganismo.....	22
1.2.2 Características bioquímicas.....	23
1.2.3 Características serológicas.....	24
1.2.4 Transmisión por alimentos del patógeno.....	24
1.3 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	26
1.3.1 Características de la enfermedad.....	27
1.3.2 Patogenicidad.....	27
1.3.3 Factores de colonización.....	27
1.3.4 Enterotoxinas termolábiles (LT).....	28
1.3.5 Enterotoxinas termoestables (ST).....	29
1.3.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	30
1.3.2.1 Características de la enfermedad.....	31
1.3.2.2 Patogenicidad.....	32
1.4 Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	32
1.5 Métodos rápidos de análisis microbiológico.....	36

2	Objetivos.....	38
2.1	Objetivo general.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	Justificación.....	39
4	Hipótesis.....	39
5	Materiales y metodología.....	40
5.1	Materiales empleados.....	40
5.1.2	Medios de cultivo y caldos de cultivo.....	40
5.1.3	Reactivos y soluciones.....	41
5.1.4	Cepas de referencia.....	41
5.2	Obtención de las muestras.....	41
5.3	Preenriquecimiento y enriquecimiento.....	42
5.4	Aislamiento.....	42
5.5	Identificación.....	43
5.6	Extracción de DNA.....	45
5.7	Preparación y realización de PCR.....	46
6	Resultados.....	47
6.1	Muestreos.....	47
6.2	Aislamientos, Identificación y confirmación.....	48
6.3	Serología.....	54

6.4 PCR.....	57
7 Discusión.....	62
8 Conclusiones.....	67
9 Perspectivas.....	68
Referencias.....	69

ABREVIATURAS

INDRE Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

E. coli *Escherichia coli*

(ECEP) *Escherichia coli* enteropatógena

(ECEI) *Escherichia coli* enteroinvasiva

(ECET) *Escherichia coli* enterotoxigénica

(ECEH) *Escherichia coli* enterohemorrágica

(ECEAgg) *Escherichia coli* enteroagregativa

(O) Antígenos somáticos

(H) Flagelares

(TS) Termoestable

(TL) Termolábil

(FCP) Factores de colonización putativos

(SUH) Síndrome urémico hemorrágico

(A/E) Lesiones de adherencia y esfacelamiento

(ETA) Enfermedades transmitidas por alimentos

(DNA) Acido desoxinucleico

(PCR) Reacción en cadena de polimerasa

(NOM) Normas Oficiales Mexicanas

1 Introducción

1.1 Género *Salmonella*

Desde hace cien años hay información que relaciona a las bacterias del género *Salmonella* con padecimientos en humanos y en animales. En la actualidad la salmonelosis es la principal causa de enfermedad transmitida por los alimentos en la mayoría de los países desarrollados y subdesarrollados, una de las más importantes causas de muerte (1).

Aunque en la actualidad existen alrededor de 2400 serovares, todos considerados potencialmente patógenos al humano, solo 200 son asociados con enfermedades humanas (23, 13).

1.1.1 Características del género *Salmonella*

El esquema de Kauffman-White se ha acreditado como la técnica más útil para la diferenciación de los serovares dentro del género. Esta técnica diferencia a los organismos con base en sus antígenos somáticos O y flagelar H y por los antígenos Vi. Este esquema asigna la posición de especie a cada serovar. En 1941 el esquema contenía 100 serovares y desde entonces su número ha aumentado constantemente hasta cifra de alrededor de 2400 (23).

El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Estudios del DNA mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella entérica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella entérica* subespecie *arizonae*, *Salmonella entérica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella entérica* subespecie *houtenae*, *Salmonella entérica* subespecie *indica*, *Salmonella entérica* subespecie *entérica* y *Salmonella entérica* subespecie *salamae* (26).

A su vez las subespecies de *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de

diferentes asociaciones de factores antígenos somáticos O y flagelares H. Los nombres de todas las serovariedades están contenidos en el esquema de Kauffmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de Paris (23).

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (24,26).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos de 0.7-1.5 x 2.0-5 mm, generalmente móviles por flagelos periféricos (excepto *S. gallinarum*), aerobios facultativos, no esporulados, no fermentadores de lactosa, fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, D-sorbitol, L-ramnosa, trehalosa, D-xilosa y D-dulcita. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, urea negativo y producen SH₂ (30).

Los miembros del género *Salmonella* se pueden clasificar en tres grupos:

- a) Los que tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- b) Los que infectan solo al hombre: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* y *Salmonella Paratyphi C* y que se transmiten en forma directa e indirecta de una persona a otra
- c) Los que están adaptados a un huésped en especies animales: *S. Abortusovis*, en los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves (30).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta edad. Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternales, geriátricos, restaurantes (25).

Es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados. También puede ocurrir la transmisión de persona a persona (25, 18).

1.1.1.2 Distribución, incidencia y sobrevivencia

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos u animales de abasto, animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, habitualmente sin presentar ninguna enfermedad manifiesta (1).

El humano no representa más que un eslabón en la cadena contaminante. Los animales domésticos o salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir del cual las *Salmonellas* pueden difundirse al ambiente y en especial al agua y alimentos. Pueden ser diseminadas por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y al aire (1).

La frecuencia de aislamiento y sobrevivencia de *Salmonella* en el medio ambiente y otros sustratos está determinada por factores ecológicos como la temperatura, actividad de agua, pH, potencial de oxidación y reducción, expuesta a agentes germicidas, la composición del material en que se encuentra y la humedad del ambiente (ver tabla 1). Según Bryan el tiempo de permanencia del microorganismo varía de días a meses, en tiempos más prolongados se observan en polvo, pasturas y ropa. El grado de sobrevivencia en heces depende de la especie animal.

Tabla 1. Supervivencia de *Salmonella* en diferentes sustratos

MATERIAL	DIAS
Tierra y pastura	200
Ropa	228
Fundas de plástico	93
Polvo	300
Material fecal de roedores	148
Heces de cucarachas	199
Heces de pollos	9
Heces secas de res	1000
Cascarón de huevo	21-350
Huevos enteros desecados	1460
Telas de algodón y lana	168
Agua de la llave	87
Agua de pozo S. dublin	115
Agua	120
Tierra de jardín	280
Heces secas de aves	840
Forrajes	42
Agua de río esterilizada por filtración	13
Solución salina isotónica	2190
Tierra húmeda	530

1.1.1.3 Factores de crecimiento

Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y pueden hacerlo dentro de amplios márgenes. Puede crecer entre 5 a 47°C. La temperatura mínima de crecimiento es muy importante para la seguridad de los alimentos ya que la refrigeración es la medida más utilizada en para prevenir la multiplicación de microorganismos, se han reportado casos de algunos serovares de *Salmonella* que crecen entre 4 y 2°C.

pH

Valores cercanos a la neutralidad son más favorables para que se multiplique más activamente. El pH mínimo para el desarrollo no es fácil de definir porque se encuentra muy por una variedad de factores: naturaleza del ácido, tipo de serovar, temperatura de incubación, entre otros, se encuentran en promedio consultando varias fuentes entre 4.0 y 4.2 y superiores de 9.0.

Agua

El óptimo de actividad de agua es de 0.99. El microorganismo generalmente es inhibido por concentraciones de 3-4% de NaCl. De ninguna manera la hostilidad a la desecación hacia la viabilidad de la *Salmonella* puede manejarse para confiar en la seguridad de un alimento desecado para consumo humano ya que han existido diversos brotes de salmonelosis en estos productos (28).

1.1.1.4 Incidencia de Salmonella:

Agua

En Guadalajara, durante 1993, varios estudios reportaron la siguiente positividad a *Salmonella* en 125 muestras de seis variedades de agua superficial: agua de desecho 94%, agua de fuentes de ornato 20%, lagos 38.1%, arroyos 80%, manantiales 14.3% y en piscinas 0%(Fernández Escartín y col. 1993). Se identificaron 25 serovares con predominio del *derby* (28.4%), *adelaide* (17.3%), y *agona* (12.3%). El serovar *Thyphimurium* fue el más frecuente en las fuentes de ornato.

En muestras de aguas negras recolectadas en los drenajes de Monterrey, Nuevo León durante 1988, aislaron siete serovares: *Typhimurium*, *javiana*, *agona*, *derby*, *Newport*, *infantis* y *worthington* (Viscaya, A. R. y Rodríguez, 1990)

En la ciudad de Colima entre 1987 y 1988, se analizaron 48 muestras de agua fluvial, 37 muestras 77% resultaron positivas al patógeno e identificaron a los

serovares: *give* (11%), *agona* (9.8%), *derby* y *oranienburg*, ambos con (7.6%). Aislaron una cepa de *S. Typhi* (11).

En el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) se analizaron 24 394 cepas de *Salmonella* aisladas en México durante el periodo de 1972 a 1999. Del total, 1 372 (5.6%) cepas de muestras clínicas fueron aisladas en el Laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE y el resto, de alimentos y ambientales, en los 30 laboratorios estatales de salud pública de la Secretaría de Salud, así como de la industria privada.

1.1.1.4.1 *Carne cruda, carne cocida y productos cárnicos*

La contaminación por *Salmonella* en la carne de cerdo, res o pollos crudos se lleva a cabo en las canales de los animales en los rastros. Las cifras de *Salmonella* en las canales muestreadas varían en los reportes de diferentes países de 0 a 74% en las canales de res, de 17.5 a 80% canales de cerdo y de 1 a 65% en las de pollo (21).

1.1.1.5 *Epidemiología de la salmonelosis*

La salmonelosis es uno de los padecimientos más comunes en el mundo. La causa del 70% de casos de enfermedad en humanos son diez serovares. En USA *Typhimurium*, *enteritidis* y *beidelberg* son los serovares más frecuentemente aislados en humanos. Las cifras reportadas para el número de casos y brotes transmitidos por *Salmonella* fueron: 80 brotes (19.7%), que involucraron 2834 casos (25.7%) y 8 defunciones (50%) del total de casos y brotes. La mayoría de salmonelosis humana resulta de consumir alimentos contaminados, especialmente de origen animal (87%), la contaminación de persona a persona llega a el 10%, a partir de mascotas el 3% y el saneamiento 1%. (24, 26, 27).

1.1.2 Enteritidis Características de la enfermedad

Patogenia y síndromes clínicos

Periodo de incubación. Tiene una duración comprendida entre 6 y 48 horas.

1.1.2.1 *Sintomatología.*

Los síntomas principales son: fiebre ligera, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea duran unos pocos días pero en algunos casos pueden persistir durante una semana o más; mialgias y dolor de cabeza son comunes. La enfermedad es generalmente autolimitante, pero puede ser más grave en grupos sensibles.

Las infecciones gastrointestinales están relacionadas principalmente con aquellos serovares que existen en los animales y en las personas. Por su gravedad, pueden variar desde la afección asintomática a una diarrea grave y son el tipo de salmonelas más corriente. La tasa de mortalidad de este tipo de salmonelosis se sitúa entre 0.1 y 0.3%. Los grupos de edad que más afecta son especialmente niños y ancianos.

1.1.2.2 *Tratamiento*

Generalmente en este tipo de salmonelosis está limitada a la reposición de líquidos por pérdida de electrolitos, la terapia antibiótica no se da a menos que desarrolle septicemia, la razón es que los antibióticos reducen la microflora normal del tracto gastrointestinal, y vuelven al individuo más vulnerable a desarrollar otras infecciones. (29).

1.1.3 *Enfermedad sistémica*

Los serovares adaptados al hospedero son más invasivos y tienden a causar una enfermedad sistémica en ellos, característica que está relacionada con su resistencia a la destrucción fagocítica en las personas, esta propiedad se aplica a

los bacilos típicos y paratípicos; *S. Typhi* y *S. paratyphi* A, B y C que causan la enfermedad septicémica conocida como fiebre entérica o tifoidea

1.1.3.1 *Desarrollo de la enfermedad*

Las *Salmonellas* invasoras atraviesan el epitelio intestinal y posteriormente son transportadas a los ganglios linfáticos mesentéricos. Después de multiplicarse en los macrófagos, son liberados para entrar a la corriente sanguínea y diseminarse por todo el organismo. Son eliminadas de la sangre por los macrófagos pero continúa multiplicándose en su interior. Finalmente esta multiplicación destruye a los macrófagos que liberan a la corriente sanguínea gran cantidad de bacterias causando septicemia. En esta fase, la primera de la enfermedad, el microorganismo puede ser cultivado a partir de muestras de sangre. Hay una lenta presentación de síntomas que incluye fiebre, dolor de cabeza, sensibilidad abdominal y constipación, y la aparición en la superficie del cuerpo manchas de color rojo que palidecen a la presión.

Durante la segunda fase de la enfermedad el germen llega a la vesícula biliar, donde se multiplica en la bilis. El flujo de bilis contaminada recontamina el intestino delgado causando su inflamación y ulceración. La fiebre persiste pero va acompañada de diarrea en la que son excretadas grandes cantidades de bacterias y, en menor grado a través de la orina. En los casos más graves puede haber hemorragias de úlceras y perforación del intestino que puede provocar peritonitis. En los casos más benignos las úlceras sanan, la fiebre desciende y el enfermo se restablece transcurridas cuatro o cinco semanas.

1.1.3.2 *Tratamiento*

La septicemia requiere terapia con cloranfenicol, ampicilina o trimetoprim sulfametoxazol, de ellos el cloranfenicol ha sido elegido como terapia para la fiebre tifoidea, sin embargo, el incremento de la resistencia bacteriana a estas drogas ha

llevado a desarrollar nuevas clases de fármacos, tales como cefalosporinas y quinolonas de tercera generación (29, 21).

1.1.4 *Colonización asintomática*

Las *Salmonellas* causantes de la fiebre tifoidea, son mantenidas por portadores humanos. Entre el 1 y 5% de los pacientes experimentan colonización crónica durante más de un año, después de la enfermedad sintomática, y la vesícula biliar representa el reservorio en la mayoría de los casos. En nuestros días, los portadores crónicos pueden ser tratados con antibióticos, pero en los casos especiales recalcitrantes es necesaria la colecistectomía (extirpación quirúrgica de la vesícula biliar). En las personas sensibles, también pueden ser invasores de una serie de serovares no humanos adaptados: *S. blegdam*, *S. bredeney*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. panamá*, *S. Typhimurium* y *S. virchow*. Estos serovares pueden causar formas menos graves de fiebre entérica y de septicemia e infecciones focales en el organismo.

1.1.5 *Mecanismos de transmisión*

En la transmisión de la salmonelosis operan múltiples fuentes y mecanismos, siendo la vía oral la más frecuente implicada; los podemos resumir en los siguientes:

- a) La ruta de infección más común es a través de la boca
- b) Animales y sus productos son la fuente de infección más común
- c) Inhalación de soluciones y aerosoles contaminados
- d) Cocción insuficiente de huevo y carnes.
- e) Contaminación cruzada.
- f) Contaminación de alimentos por manos de preparadores.
- g) Contacto, ingestión o inhalación de tierra contaminada con heces.
- h) Leche cruda y pasteurizada contaminada.
- i) Harina de huesos, fertilizantes y alimentos para animales.
- j) Mascota (perros, gatos, tortugas y reptiles)

k) Persona a persona.

1.1.6 Defensas del huésped

Una de las principales características de la patogenicidad de *Salmonella* es su capacidad para entrar y vivir como un parásito intracelular facultativo, es decir puede invadir las células y multiplicarse dentro de ellas sin requerir factores de la célula huésped para su sobrevivencia.

Varias defensas del huésped son importantes para resistir la colonización e invasión por *Salmonella*. La acidez gástrica normal (pH menor a 3.5) es letal para las *Salmonellas*. En individuos sanos, el número de microorganismos ingeridos disminuye en estómago, de tal forma que pocos o ningún organismo entra al intestino. La movilidad intestinal normal barre rápidamente las *Salmonellas* protegiendo al intestino de la invasión.

La microflora intestinal normal defiende al hospedero contra la *Salmonella*, probablemente a través de la flora anaerobia, la cual libera ácidos grasos de cadena corta que son tóxicos para el germen, la alteración de la flora intestinal por el uso de antibióticos vuelve más susceptible al hospedero. Anticuerpos secretados en la luz intestinal también lo protege.

Los niveles de protección inmunológicas son humoral y celular. En la primera, las inmunoglobulinas secretadas por el plasma opsonizan antígenos específicos para facilitar la fagocitosis. Uniones de IgG o IgM a antígenos celulares pueden activar el sistema de complemento clásico, una serie de proteínas séricas y reacciones enzimáticas que conducen a las bacterias a una lisis por medio de daño a la membrana celular, atracción de células fagocíticas a sitios de infección o superficie de las células antigénicas con un fragmento del complemento (C3b) para estimular la fagocitosis. La inmunidad intestinal es un importante mecanismo que transfiere una respuesta localizada dependiente de IgA. El antígeno bacteriano activa los linfocitos B localizados en el tejido linfoide en las placas de Peyer's dentro de la submucosa intestinal. La activación resulta en

la entrada de la IgA (IgA-s) de células plasmáticas a la lámina propia. La IgA es un anticuerpo dimérico que es transportado de la lámina propia de la mucosa epitelial donde se une a una glicoproteína, componente secretorio producido por las células epiteliales. El complejo IgA-s-CS liberado entre la capa mucosa (glucocalix) del vello intestinal es resistente a la degradación proteolítica de enzimas intestinales y puede ser detectado por más de doce meses después de la infección por *Salmonella*. La IgA impide la adhesión y subsecuente invasión del patógeno, también inmoviliza células y sus toxinas en la superficie de la mucosa, facilitando por lo tanto la inactivación proteolítica.

En la inmunidad mediada por células, dos tipos de linfocitos proporcionan protección: linfocitos T citotóxicos fijan para lisar antígenos viables que no hayan sufrido autodestrucción. En reacción, las células de efecto retardado TDTH (células de hipersensibilidad) son activadas por antígenos específicos y secretan linfocinas que precipitan la lisis de células no específicas o activan macrófagos para un estado de muerte no específica.

La invasión de patógenos que han sobrevivido a estas barreras protectoras es entonces enfrentada con células fagocíticas como macrófagos y granulocitos neutrofilos cuya función es ingerir y destruir antígenos extraños (20, 23).

1.1.7 Factores de virulencia

Para tener capacidad patógena, la *Salmonella* debe poseer una serie de atributos llamados factores de virulencia, los cuales incluyen: la habilidad para invadir células, poseer una capa completa de lipopolisacáridos, capacidad para replicarse intracelularmente y posibilidad de producir toxinas. La mayoría de estos factores de virulencia representan respuestas adaptadas de *Salmonella* contra los mecanismos naturales de defensa.

1.1.8 Enterotoxinas

Las cepas de *Salmonella* pueden producir una enterotoxina termolábil similar a la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (TL) o toxina colérica (TC) esta toxina cataliza la APD ribosilación de la proteína reguladora de adenilatociclasa G5, cuya actividad conduce a niveles elevados de AMP cíclico, alteración del transporte de electrolitos y cambios en la concentraciones normales produciendo una diarrea secretora consiguiente.

1.1.9 Endotoxinas

Como otras bacterias Gram negativas las células de *Salmonella* contienen una compleja estructura lipopolisacarida que es liberada en lisis celular y en especial en cultivo prolongado. Esta compleja endotoxina macromolécula consiste en tres componentes, una capa externa de lipopolisacarido O, una porción media (el core R) y una capa interior, el lípido A. La estructura lipopolisacárida es importante por varias razones, entre ellas la naturaleza de unidades de azúcares repetidas en la capa externa, es responsable de la especificidad del antígeno O y ayuda a determinar la virulencia del microorganismo. Las *Salmonellas* que carecen de secuencias complejas de azúcares repetidos son llamadas rugosas a causa de la apariencia rugosa de las colonias, ellas son usualmente avirulentas o menos virulentas de las cepas lisas, las cuales poseen todo el complemento de azúcares repetidos.

El componente endotóxico de la pared celular juega un papel importante en la patogénesis y en algunas manifestaciones clínicas, provoca fiebre, activa el complejo sérico, altera la función linfocítica, la endotoxina circulante puede ser responsable en parte de varias manifestaciones de shock séptico que ocurren en las manifestaciones sistémicas. La endotoxina es un factor de virulencia atribuido a la estructura y fisionomía de la salmonella que actúa sinérgica o independientemente para promover la invasión y multiplicación del patógeno en los tejidos del hospedero y para producir los síntomas clínicos. No obstante la

temperatura, pH, potencial oxidación-reducción y otros factores ambientales pueden también afectar la virulencia de cepas potencialmente infecciosas.

1.1.10 Verotoxinas

La citotoxina relacionada con la Shiga neurotoxina, producidas por algunas cepas de *Salmonella* tienen una acción fisiológica y un efecto citotóxico sobre cultivos de células eucariotas en modelos animales. La citotoxina es termoestable y se encuentra en la membrana externa de las células bacterianas. Se ha demostrado que tales citotoxinas producen un efecto citopático pronunciado en cultivos tisulares, resultan letales para el ratón y provocan citotoxicidad gastrointestinal. La toxina afecta células Vero y células ováricas del hámster chino (CHO) e inhibe la síntesis de proteínas en células Vero y en células epiteliales del intestino de conejo, mediada por la producción de leucina 3H. Algunas evidencias sugieren además que la citotoxicidad ejerce una mayor inhibición de proteínas celulares en las regiones de los vellos que en las criptas del epitelio intestinal (11,12, 13, 16).

1.2 *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre, coloniza el intestino dentro de las primeras horas de vida y a partir de entonces se convierte en un residente importante, estableciendo una relación de mutuo beneficio con su hospedero, sin embargo, algunas cepas han desarrollado la capacidad para provocar enfermedades en el hombre, principalmente infecciones gastrointestinales, urinarias o de sistema nervioso central y se conocen en forma genérica como *E. coli* patógenas. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo (7).

E. coli patógena produce factores de virulencia que le permiten infectar a su hospedero, sobreponerse a sus mecanismos de defensa y producir síndromes diarreicos con características particulares, de acuerdo con los cuales puede ser agrupada en cinco categorías: enteropatógena (ECEP), enteroinvasiva (ECEI),

enterotoxigénica (ECET), enterohemorrágica (ECEH) y enteroagregativa (ECEAgg). A principios de la década de los ochentas *E. coli* enterohemorrágica se reconoce como un patógeno emergente de gran importancia por la severidad de los síndromes clínicos que origina (11).

Si bien, *E. coli* es una de las bacterias más estudiadas en la historia de la microbiología, su papel en el desarrollo de enfermedades transmitida por los alimentos (ETA) mantiene a una parte de la comunidad científica conjuntando esfuerzos para entender los mecanismos mediante los cuales desencadena los procesos infecciosos que la caracterizan y proponiendo medidas para su prevención y control (9).

1.2.1 Características del microorganismo

Escherichia coli es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual fue aislada y caracterizada por primera vez por Theodor Escherich en 1885. Desde entonces, se ha convertido en uno de los microorganismos más estudiados en la historia de la microbiología. A lo largo de más de un siglo de investigación, diversos estudios basados en *E. coli* ha permitido la explicación de importantes fenómenos biológicos, como la descripción de gran parte de las vías biosintéticas, el desarrollo del concepto de gen, la elucidación del código genético, el descubrimiento de los mecanismos moleculares de la regulación genética y la descripción molecular de la morfogénesis viral (6).

E. coli habita en el tracto intestinal del hombre y en otros animales de sangre caliente en los que es parte de la microbiota y juega un importante papel en la fisiología intestinal. Aproximadamente el 0.1% del total de la microbiota intestinal de un adulto, está representada por *E. coli*, mientras que en el recién nacido constituye junto con los lactobacilos y enterococos la microbiota más abundante. La presencia de estas bacterias en el intestino es necesaria para el adecuado funcionamiento del organismo, ya que constituye la principal fuente de vitamina K y vitaminas del complejo B.

E. coli es un bacilo Gram negativa no esporulado, puede poseer flagelos periféricos o se inmóvil y es anaerobio facultativo. La temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5°C y la máxima 45°C; puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación. El rango de pH en el cual se ha observado crecimiento es de 4.4 a 9.0 y la mínima actividad de agua es de 0.95. Puede ser aislada fácilmente a partir de heces al utilizar medios selectivos como agar MacConkey e incubado a 37°C en condiciones de aerobiosis. Este medio permite diferencia preliminar a través de la morfología colonial y de la capacidad para fermentar la lactosa presente en el medio. La identificación de la especie se realiza por medio de pruebas bioquímicas que ponen de manifiesto las capacidades metabólicas del microorganismo.

1.2.2 Características bioquímicas

Entre las características metabólicas de *E. coli* se encuentra su capacidad para utilizar azúcares simples como fuente de carbono y desarrollar en medios basales mínimos; además, fermenta la glucosa y otros carbohidratos con producción de piruvato. Se observa un número considerable de productos finales de fermentación en condiciones anaerobias con glucosa como fuente de carbono y energía, entre los que se encuentran el succinato, lactato, acetato, etanol, formato y dióxido de carbono; el tipo y cantidad de productos varían de acuerdo con las condiciones específicas de crecimiento. Cerca del 90% de las cepas tienen la capacidad de fermentar la lactosa, pero la fermentación puede ser lenta en algunos casos; es importante señalar que algunas de las cepas diarreogénicas son típicamente lactosa negativas, por lo cual la identificación preliminar basada en esta propiedad debe tomarse con mucha cautela.

Entre su comportamiento bioquímica destacan cuatro características importantes que se usan como base para su identificación: la producción de indol a partir del metabolismo de triptófano, la producción de ácidos por vía de la fermentación de ácido mixta sin producción de acetilmetilcarbonil y la no utilización de citrato como única fuente de carbono. Estas características se utilizan como un

conjunto de pruebas diferenciales denominadas IMiC + + - - y se clasifica como biotipo 1, mientras que el porcentaje restante presenta el patrón IMiC - + - - y se denomina biotipo 2.

1.2.3 *Características serológicas*

E. coli posee diversos antígenos superficiales cuyas diferencias permiten su clasificación en grupos y tipos antígenos mediante un esquema de serotipificación basados en los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno O forma la base para clasificar a *E. coli* dentro de los serogrupos, de los cuales se han descrito 173; dentro de cada serogrupo hay uno o más serotipos definidos, según la combinación específica de los antígenos O y H. Actualmente se han identificado 56 antígenos H diferentes, mientras que se distinguen 103 antígenos K. Los serotipos muestran cierta correlación con la presencia de factores de virulencia específicos, por lo que la serotipificación representa una herramienta diagnóstica importante; sin embargo, la identificación del serotipo de una cepa no es suficiente para clasificarla como patógena, pues para ello es necesario realizar pruebas específicas que pongan de manifiesto sus propiedades de virulencia (5, 7, 8, 11).

1.2.4 *Transmisión por alimentos del patógeno*

Antes de 1945 investigadores habían sugerido la existencia de cepas de *E. coli* capaces de producir enteritis en humanos; sin embargo, fue hasta ese año que Bray estableció una asociación directa de serotipos de *E. coli* y la diarrea infantil de verano; a partir de entonces a los serotipos de la especie que son patógenas para el hombre se les denominó genéricamente con el nombre de *E. coli* patógena y su capacidad para producir enfermedades, está determinada por factores de virulencia que les permite infectar a los hospederos y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten al microorganismo sobrevivir en condiciones ambientales adversas (3).

Las cepas patógenas que causan diarrea se transmiten de manera directa o a través de los alimentos y causan diversos síndromes clínicos, las heces de animales de sangre caliente, el agua no tratada y los portadores infectados suelen ser la fuente de contaminación más común a los alimentos. En la actualidad *E. coli* patógena asociada al consumo de alimentos se agrupan en cinco categorías: ECEP, ECEI, ECET, ECEH y ECEAgg que se distinguen entre sí por sus propiedades de virulencia, las interacciones que establecen con la mucosa intestinal, los síndromes clínicos que originan, así como las diferencias epidemiológicas y de serogrupos O:H que presentan. En la tabla 2 se muestran los serotipos de importancia clínica asociados a las 5 categorías.

E. coli diarrogénica actúa en la mucosa del epitelio intestinal y genera un proceso infeccioso a través de la colonización de la mucosa epitelial, evasión de las defensas del hospedero, multiplicación, daño a células epiteliales y producción de toxinas. Las cepas de *E. coli* patógenas deben tener la capacidad para colonizar la mucosa intestinal sobreponiéndose a el movimiento peristáltico y deben de competir por nutrientes y espacio contra el resto de la microbiota intestinal, de esta forma la capacidad de adhesión a la mucosa epitelial del intestino se convierte en un mecanismo esencial para lograr la colonización. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen estructuras denominadas fimbrias o producen sustancias llamadas adhesinas no fimbriales que actúan como mecanismos para asegurar la adhesión a las células epiteliales del hospedero; una vez que se establece la colonización, el microorganismo exhibe factores de virulencia característicos que son obtenidos por plásmidos, fagos o a través de genes cromosómicos denominados islas de patogenicidad (11).

Tabla 2. Serotipos patógenos de *E. coli*

Categoría	Serotipos asociados				
ECEP	O18a,c:H7	O55:H7	O111:H-	O126:H-	O128:H8
	O20:H26	O55:H-	O114:H10	O127:H6	
	O20:H43	O86:H27	O114:H32	O127:H9	O128:H12
	O25:H1	O86:H34	O119:H6	O127:H21	
	O26:H11	O86:H-	O119:H-	O127:H40	O128:H-
	O26:H-	O91:H-	O125:H-	O127:H-	
	O44:H34	O91:H7	O125ac:H21	O128:H2	O142:H6
	O55:H6	O111:H2	O126:H2	O128:H7	O158:H23
ECET	O6:H16	O20:H	O55:H6	O148:H28	O173:H-
	O8:H9	O25:H42	O78:H11	O149:H10	
	O11:H27	O25:H-	O78:H12	O159:H20	
	O15:H11	O27:H7	O128:H7	O16:H28	
ECEH	O4:H-	O26:H32	O91:H21	O113:H21	O145:H-
	O5:H-	O46:H31	O98:H-	O117:H14	O157:H7
Categoría	Serotipos asociados (continuación)				
ECEH	O16:H6	O48:H21	O111ab:H2	O118:H12	O157:H-
	O26:H11	O55:H7	O111:H8	O119:H6	O172:H-
	O26:H21	O91:H10	O111:H-	O125:H-	
ECEI	O28ac:H-	O124:H30	O126:H-	O152:H-	O167:H4
	O29:H-	O124:H32	O143:H-	O159:H2	O167:H5
	O112ac:H-	O124:H-	O144:H-	O159:H-	
ECEAgg	O3:H2	O15:H18	O77:H18	O86:H-	O126:H2
	O7:H-	O44:H18	O86:H-	O111:H12	O126:H27

1.3 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)

E. coli enterotoxigénica fue reconocida como causa importante de diarrea en humanos en Bangladesh e India en 1968, países donde las infecciones por este microorganismo son endémicas y constituye una de las principales causas de deshidratación infantil correlaciona con condiciones nutricionales adversas. Estudios posteriores realizados con tropas británicas en Aden y tropas norteamericanas en Vietnam, permitieron la identificación de serotipos de *E. coli* O148:H28 y O6:H16 en soldados con diarrea; las cepas aisladas producían una toxina similar a la del *Vibrio cholerae* y posteriormente se caracterizaron dos enterotoxinas, una termoestable (TS) y otra termolábil (TL). Desde entonces ECET ha sido identificado como el agente etiológico mas importante en la diarrea del viajero que afecta a personas que viajan de áreas con buenas condiciones de higiene y climas templados hasta lugares con estándares higiénicos deficientes, particularmente zonas tropicales de países en desarrollo, donde el microorganismo es la principal causa de diarrea entre niños y jóvenes. Las cepas de *E. coli* que elaboran una de las dos enterotoxinas se clasifican como ECET.

1.3.1 *Características de la enfermedad*

La enfermedad se presenta de manera abrupta, con un periodo de incubación de 14 a 50 horas. La diarrea es acuosa, sin sangre ni moco, se presenta dolor abdominal, malestar y náuseas, mientras que la fiebre y el vómito son menos frecuentes; el cuadro suele ser autolimitante pero en su forma más severa semeja al cólera por la diarrea profusa con ocho a doce evacuaciones diarias durante cuatro a cinco días y heces en forma de agua de arroz, lo que conduce rápidamente a una deshidratación. El tratamiento con antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas es el más recomendado ya que la resistencia a antibióticos tradicionales está en aumento. Para personas que viajan a países en desarrollo y en circunstancias de alto riesgo es recomendable la quimioprofilaxis; en la actualidad se encuentran en desarrollo diversas vacunas orales para prevenir las infecciones por ECET.

1.3.2 Patogenicidad

Después de la ingestión de ECET a través de agua o alimentos contaminados, las células deben sobrevivir al ambiente hostil del estómago y adherirse a las células epiteliales del intestino delgado en donde elabora una o ambas enterotoxinas.

1.3.3 Factores de colonización

ECET se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado por medio de fimbrias llamadas factores de colonización. Los genes que codifican la producción de estos factores de colonización se localizan en los mismos plásmidos responsables de la producción de enterotoxinas y también posee la información para la elaboración de una subunidad proteica fimbrial denominada pilina, otras proteínas accesorias para el procesamiento, secreción y ensamblaje de fimbrias. Las fimbrias confieren una patogenicidad específicas para ciertas especies. Las cepas patógenas para el hombre poseen su propio conjunto de factores de colonización entre los que se encuentran las CFA/I, II, III y IV, así como diversos antígenos de superficie y factores de colonización putativos (FCP). Los factores de colonización se unen a glicoproteínas presentes en la mucosa del epitelio intestinal y su gran heterogeneidad antigénica es un obstáculo para el desarrollo de vacunas eficaces contra ECET.

1.3.4 Enterotoxinas termolábiles (TL)

Se inactiva a 65°C durante 30 minutos y posee una fuerte homología en estructura y función con enterotoxina de *Vibrio cholerae*, por lo que es probable que la información genética haya sido transferida por este microorganismo mediante procesos de recombinación genética. Existen dos tipos principales de LT denominados LT-I y LT-II que no presenten reacciones inmunológicas cruzadas. LT-I es producida por *E. coli* patógenas para animales y humanos, mientras que LT-II se aísla con frecuencia de animales pero no ha sido identificada como causa de enfermedad.

LT-I es una proteína de 86 KDa compuesta por una subunidad A responsable de la actividad enzimática y cinco subunidades B idénticas, dispuestas en forma de anillo. Las subunidades A y B son sintetizadas por separado y se requiere la presencia de A para la formación del pentámero B. Los genes que codifican la producción de LT-I (etx) radica en plásmidos, sin embargo, ciertos genes cromosómicos afectan su grado de expresión. Estos plásmidos también poseen los genes para producción de ST, de antígenos de colonización (CFA) y de factores de resistencia a antibióticos. Una vez que la toxina es liberada por la bacteria, el pentámero B se une al gangliósido GM1 presente en la membrana de las células epiteliales intestinales; posterior a la unión se produce la translocación de la subunidad A al citoplasma, posiblemente a través de un poro en la membrana celular epitelial. Una vez dentro de la célula la subunidad A se activa y actúa como adenosin- ribosil-transferasa estimulando la actividad de la adenilato ciclasa para generar niveles intracelulares de AMP cíclico hasta 100 veces mayor a los normales. El incremento de cAMP provoca una elevada fosforilación de canales de cloro en la membrana de las células generando un incremento en la secreción de iones cloruro (Cl^-) e inhibición en la adsorción de iones sodio (Na^+). La concentración de ambos iones en la luz intestinal aumenta y provoca la salida de agua por efectos osmicos, lo que se traduce en una diarrea profusa. Al parecer la respuesta secretoria es más compleja e incluye síntesis y liberación de prostaglandinas y leucotrienos que estimulan aun más el transporte de electrolitos y la motilidad intestinal.

1.3.5 *Enterotoxinas termoestables (TS)*

Son polipéptidos de bajo peso molecular, contiene seis residuos de cisteína cuyos puentes disulfuro les proporciona la estabilidad al calor que les caracteriza. Los genes que codifican para su producción se localizan en plásmidos, aunque han sido identificados también en transposones y frecuentemente estos asociados a genes que codifican para factores de colonización, colicinas y factores de resistencia a antibióticos. Existen dos variantes de ST denominadas TSa y TSb, ambas estableces al calentamiento a 100°C durante 15 minutos, solubles en agua,

resistentes a la acción de enzimas proteolíticas y a condiciones de acidez pero no de alcalinidad. TSa es producida por cepas de ECET aisladas de cerdos, bovinos y humanos, mientras que solo las cepas de origen humano producen TSb.

TSa es producida por cepas de ECET y otras bacterias Gram negativas como *Yersenia enterocolitica* y *V. cholerae*. Es un péptido de 18 a 19 aminoácidos transportado al exterior de la célula bacteriana para unirse a los receptores intestinales (RTSa) localizados en la membrana apical de las células epiteliales del intestino. La unión de la toxina con el receptor activa la enzima guanilato ciclasa provocando un incremento intracelular de GMP cíclico que conduce a una mayor secreción de cloro e inhibición en la absorción de sodio, provocando un cuadro diarreico.

TSb se sintetiza como un precursor de 71 aminoácidos convertidos posteriormente en una proteína de 48 aminoácidos y 5.1KDa. También posee residuos de cisteína y puentes disulfuro que le confiere resistencia térmica, pero no presenta homología con TSa. TSb se une con diferentes grados de afinidad a lípidos de células epiteliales, como fosfolípidos, glucolípidos. Lípidos neutrales y vesículas con lípidos cargados negativamente y utiliza la bicapa de la membrana celular para modular la enterotoxicidad en lugar de utilizar una glicoproteína específica de superficie. TSb genera daño en las microvellosidades epiteliales sin aumento en la producción del flujo de electrolitos; sin embargo, incrementa la secreción de bicarbonato y estimula la liberación de prostanglandina E2 y serotonina, lo que sugiere una participación del sistema nerviosa en la respuesta secretoria (6, 8, 9).

1.3.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

El termino ECEH propuesto inicialmente por Levine, incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas epidemiológicas y patogénicas que las del serotipo O157:H7, que es considerado el prototipo del grupo. El reconocimiento de ECEH se remonta a principios de la

década de los ochenta cuando la descripción de dos brotes de enfermedad gastrointestinal con un cuadro clínico poco usual denominado colitis hemorrágica, caracterizado por evacuaciones con gran cantidad de sangre y aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de los coprocultivos de los pacientes, así como la asociación de casos esporádicos de síndrome ureico hemolítico con cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas, constituyeron hallazgos epidemiológicos que permitieron definir a ECEH como agente causal de enfermedad intestinal y renal.

Debido a la capacidad de las cepas para producir citotoxinas a partir de 1977 se adoptó el término “*E. coli* verotoxigénica” ECVT, por el efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero en cultivo. Paralelamente surgió el término *E. coli* productora de toxina Shiga ECTS debido a que una de las citotoxinas es prácticamente idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Stx). Ambos términos son equivalentes y se refieren a cepas que producen una o más toxinas pertenecientes a la familia Stx. El término *E. coli* enterohemorrágica en cambio, incluye una connotación clínica y describe cepas que provocan colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, producen toxinas Shiga, causan lesiones A/E en células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa.

E. coli enterohemorrágica particularmente el serotipo O157:H7 se considera uno de los patógenos emergentes transmitidos por alimentos más importantes de los últimos años.

1.3.2.1 *Características de la enfermedad*

El periodo de incubación es de tres a cuatro días; la enfermedad tiene una duración de dos a nueve días; al inicio el cuadro se caracteriza por dolor abdominal repentino, vomito, fiebre ligera o ausente y desarrollo de diarrea sin presencia de sangre. Dentro de las siguientes 24 horas se presenta diarrea acuosa sanguinolenta y dolor abdominal sumamente intenso, a tal grado que pueden ser más agudos que un cuadro de apendicitis; este segundo periodo puede tener una duración cuatro a diez días y se conoce como colitis hemorrágica.

La infección se distingue de la shigelosis, amebiasis, campilobacteriosis o de la gastritis por ECEI, por la ausencia de fiebre y de leucocitos en heces; aunque aproximadamente el 50% de los pacientes requieren hospitalización, la enfermedad suele ser autolimitante.

El 10% de los casos, principalmente niños y ancianos, evolucionan hasta el síndrome urémico hemorrágico SUH que provoca insuficiencia renal aguda. Al parecer, la colitis hemorrágica favorece el desarrollo del SUH, ya que facilita el acceso de las citotoxinas a la circulación sanguínea. El SUH se caracteriza por la triada de anemia hemolítica microangiopatía (coagulación intravascular de eritrocitos), trombocitopenia (descenso de plaquetas) y nefropatía aguda. El daño renal se caracteriza por edema y desprendimiento de células endoteliales del glomérulo, coagulación intravascular y depósitos de fibrina, alteraciones que disminuyen el flujo sanguíneo glomerular. Los pacientes con SUH suelen requerir diálisis y transfusiones sanguíneas. La mortalidad es del 6 a 10% en niños y del 3 al 6% en pacientes de todas las edades.

La púrpura trombótica trombocitopénica es la manifestación más severa de la infección, presenta características clínicas y patológicas semejantes a las del SUH pero incluye daño cerebral y posee una alta mortalidad. El término púrpura se refiere a las manchas de color púrpura resultantes de hemorragias en la piel; los pacientes frecuentemente presentan coágulos cerebrales que suelen ser mortales. Otras complicaciones poco usuales asociadas con la infección por ECEH incluyen cistitis hemorrágica, convulsiones, sepsis con otros microorganismos y anemia.

1.3.2.2 *Patogenicidad*

ECEH posee factores de virulencia como la producción de factores de adherencia, de citotoxinas y enterohemolisinas, capacidad para transportar hierro y desarrollo de lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E) con destrucción de microvellosidades del epitelio intestinal. Los genes asociados a la patogenicidad

de ECEH son similares a los identificados en ECEP, excepto por la presencia de un bacteriófago que codifica la producción de toxinas de la familia Stx, insertado en el cromosoma de ECEH y por un plásmido de 60MDa denominado pO157 codifica la producción de enterohemolisina (ehx) y de un antígeno fimbrial (10, 11, 12).

1.4 Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA constituyen un importante problema de Salud Pública por su magnitud, tendencia creciente, emergencia y reemergencia de algunas de esas ETA, aparición de nuevos escenarios epidemiológicos y formas de transmisión, incremento de la resistencia antimicrobiana e impacto social y económico.

La vigilancia de las ETA es esencial para caracterizar la dinámica epidemiológica y orientar la planificación de las políticas y estrategias de control y prevención, evaluar el impacto de las intervenciones de los programas de inocuidad de alimentos e identificar áreas prioritarias de investigación, particularmente a nivel local. Debido a la multiplicidad de factores involucrados en la ocurrencia de las ETA y la necesidad de una respuesta intersectorial y comunitaria, podrían utilizarse como un modelo paradigmático para consolidar en los países la vigilancia en Salud Pública, fortaleciendo la coordinación entre salud y agricultura y otras instituciones públicas y privadas (39).

Los países de la Región todavía tienen debilidades en la cobertura de la vigilancia epidemiológica en general y del componente ETA en particular, En el caso de las ETA se debe fortalecer la sensibilidad del sistema para la detección y caracterización de brotes, a fin de proponer medidas de control y prevención de nuevas ocurrencias. Asimismo hay que mejorar la capacidad de análisis y uso de la información, incluyendo la comunicación de información y la retroalimentación a los distintos niveles del sistema. Los datos de un buen sistema de vigilancia son insumos importantes para la aplicación de modelos de análisis de riesgos. Los datos suministrados por un sistema de vigilancia no deben utilizarse para comparaciones entre países, debido a las diferencias existentes en cobertura y

calidad de los sistemas de vigilancia epidemiológica; deben ser analizados en el contexto de cada uno de los países, valorando las diferencias geográficas y la capacidad operacional del sistema nacional para una correcta interpretación de los mismos (39, 23, 25).

Impacto social y económico de las ETA

En 1995 el Centro Europeo de la Organización Mundial de la Salud estimó que alrededor del 15% de la población total de Europa padeció alguna ETA. En ese mismo año el Consejo para las Ciencias Agrícolas y Tecnología de los EUA calculó que todos los años en esa nación se presentan 6.5 a 33 millones de episodios de ETA y que cerca de 9,000 muertes tienen su origen en estos padecimientos. Las autoridades de salud de Canadá estiman que todos los años se presentan cerca de 2.2 millones de casos de ETA. Estudios hechos en otras naciones industrializadas (Reino Unido, Francia, Italia) sugieren que hasta el 10% de la población de esos países padece alguna ETA durante un año determinado.

Si este es el panorama en las naciones ricas e industrializadas del Norte, ya se puede suponer lo que ocurre en nuestros países pobres y subdesarrollados del Sur. Se calcula que, al menos, el 50% de la población de las naciones subdesarrolladas padece alguna enfermedad relacionada con la ingesta de agua contaminada y que se encuentra en riesgo de adquirir alguna ETA.

Con respecto a los menores de cinco años se estima que anualmente ocurren al menos 1,500 millones de casos de enfermedad diarreica aguda en dicha población, incluyendo tres millones de muertes. Por otro lado se estima que el 70% de las muertes debidas a ETA se debe al consumo de alimentos contaminados mientras que el 30% restante se debe a la ingesta de agua contaminada.

Entre los brotes más importantes de ETA se encuentran los siguientes:

- Quizá el brote más grande de hepatitis A ocurrió en 1986 en la provincia de Shanghái en China al presentarse 300,000 casos del padecimiento; la fuente de contagio fue el consumo de ostiones contaminados.
- En 1988 se presentó en España un brote de síndrome neurológico agudo que afectó a 20,000 personas y que se debió al consumo de aceite de colza.
- En 1994 se presentó un brote de salmonelosis que afectó a más 200,000 personas y que se debió a la ingesta de helado preparado con leche pasteurizada y que fue transportado en carros tanque que habían transportado previamente huevo líquido contaminado.
- El mayor brote de una ETA transmitida por agua se presentó en 1993 en la ciudad de Milwaukee, EUA; se presentaron 400,000 casos de diarrea por *Cryptosporidium parvum* y cerca de 4,000 personas requirieron hospitalización.
- En 1996 se presentó en Japón el mayor brote de enfermedad diarreica por *E. coli* O157:H7; se enfermaron 6,300 niños, incluyendo dos defunciones (2, 3, 39).

Se calcula que en 1991 y debido a la epidemia de cólera el Perú resintió pérdidas superiores a los 600 millones de dólares debido a las restricciones comerciales que otros países impusieron a sus productos.

Apenas en 1998 la presencia de *E. coli* O157:H7 en carne para hamburguesas obligó a que se destruyeran 250,000 kilogramos de carne molida con la consecuente pérdida económica para la empresa.

El daño que ocasionan los agentes microbianos productores de ETA se produce a través de cuatro factores:

- Tipo de alimentos contaminados,
- Inóculo microbiano,

- Procesamiento del alimento antes de ser consumido,
- Susceptibilidad del consumidor.

Para cerrar el apartado referente a la importancia que guardan las ETA vale la pena considerar que al parecer estas entidades nosológicas están experimentando un repunte en los últimos años. En este aumento es indudable que juega un papel la mejoría en los sistemas de notificación; sin embargo este elemento no basta para explicar el incremento que globalmente se observa.

1.5 **Métodos rápidos de análisis microbiológico** (12, 15, 21, 22)

Los métodos alternativos a los convencionales se conocen como “rápidos” porque son automatizados o semi-automatizados, y porque se requiere menos tiempo para preparar y procesar las muestras y para leer e interpretar los resultados. Los métodos rápidos han demostrado ser confiables como los métodos tradicionales, representando una mejor opción por las ventajas que ofrecen. Así, en la actualidad existen diferentes métodos rápidos de análisis, basados en diferentes técnicas:

a) Métodos rápidos basados en técnicas tradicionales

Son aquellos cuyo fundamento es el mismo que en el caso de los métodos tradicionales, el uso de medios de cultivo con nutrientes adecuados para cada tipo de microorganismo, reemplazando el tradicional agar en placa y buscando economizar tiempo y espacio.

b) Métodos inmunológicos

Los métodos rápidos más ampliamente utilizados en la actualidad son aquellos que se basan en técnicas inmunológicas, pues permiten la identificación de bacterias específicas asociadas a diferentes alimentos. Los microorganismos más frecuentemente detectados mediante estas técnicas son *E. coli* O157:H7, *Listeria* y *Salmonella*.

Todos estos métodos se basan en una reacción antígeno-anticuerpo que forma compuestos coloridos o precipitados que pueden ser detectados.

c) Métodos Moleculares

Son métodos que se basan en técnicas de DNA y RNA para la diferenciación e identificación de microorganismos patógenos en alimentos. Algunas de estas técnicas incluyen PCR, electroforesis, tipificación de plásmidos, etc. Los métodos más difundidos son aquellos que se basan en PCR, pues existen diferentes modificaciones a esta técnica que permiten versatilidad en los métodos.

2 Objetivos

2.1 **Objetivo general:**

Aislamiento e identificación de serotipos patógenos del género *Salmonella*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enterotoxigenica a partir de muestras de carne y queso fresco, obtenidas en mercados y rastros municipales de varios estados del centro del país.

2.2 **Objetivos específicos:**

1. Aislamiento e identificación de bacterias del género *Salmonella* de muestras de carne y queso fresco utilizando medios de pre-enriquecimiento, medios selectivos, medios específicos y diferenciales para obtener colonias de estos patógenos, así como su biotipificación (microsistemas API 20E).
2. *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enterotoxigénica de muestras de carne y queso fresco utilizando medios de pre-enriquecimiento, medios selectivos, medios específicos y diferenciales para obtener colonias de estos patógenos, así como su biotipificación (microsistemas API 20E).
3. Serotipificación de las cepas aisladas empleando antisueros específicos.
4. Estandarización de un PCR convencional para la identificación de serovariedades patógenas: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enterotoxigenica.

3 Justificación

La inocuidad de los alimentos y ETA constituyen un problema de salud pública cada vez más importante. La OMS estima que las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y por el agua provocan en su conjunto la muerte de 2,2 millones de personas al año, de las cuales 1,9 millones son niños. Los brotes de ETA han tenido consecuencias sanitarias y económicas en países desarrollados así como en vías de desarrollo, además de que la presencia de microorganismos patógenos en alimentos se utiliza como una barrera no arancelaria. Desde este punto de vista, en México es frecuente el aislamiento de patógenos entéricos, sobretodo de aquellos productos agropecuarios donde no se aplican buenas prácticas de producción, manejo e higiene. Considerando que el 83% de la carne que se consume en México procede de rastros municipales y que los quesos frescos tipo artesanal se producen con leche no tratada térmicamente, aunado al poco control sanitario del ganado, se plantea este trabajo con el objetivo de determinar la frecuencia de serotipos patógenos del género *Salmonella* y *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enterotoxigenica en carne y queso fresco que se distribuyen en mercados municipales de varios estados del centro de país.

4 Hipótesis

Considerando que las bacterias del género *Salmonella*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enterotoxigénica son microorganismos patógenos que impactan la salud pública y que los puntos de venta y distribución de carne y quesos frescos carecen de buenas prácticas de higiene y manejo, entonces se podrán aislar estas bacterias.

5 Materiales y metodología

5.1 *Materiales:*

Cajas petri de plástico desechables 20 mL	Asa bacteriológica
Asa bacteriológica calibrada 10 µL	Micropipetas de 100-1000 µL Thermolabsystems
Pipeta de graduada de 0.1 mL Pyrex	Vidrio triturado estéril
Pipeta de graduada de 5 mL Pyrex	Tubos falcom 30 mL
Pipeta de graduada de 10 mL Pyrex	Tubos falcom 50 mL
Tubos eppendorf 1 mL	Tubos eppendorf 3 mL
Bisturí	Pinzas de disección
Mechero	Espátula
Balanza analítica Lab-Tech	Balanza granataria OHAUS
Autoclave	Parrilla eléctrica
Matraz 2 L Pyrex	Probetas 1L
Matraz 4 mL Pyrex	Micropipetas de 20-200 µL Thermolabsystems
Matraz 500 mL Pyrex	Micropipetas de 5-40 µL Thermolabsystems
Asa bacteriológica calibrada 1µL	Micropipetas de 0.5-10 µL Thermolabsystems
Termociclador convencional AXYGEN MAXYGENE	Lámpara U.V.

5.1.2 *Medios sólidos y caldos de cultivo:*

Caldo tetrionato BIOXON	Caldo peptonado DIFCO
Agar nutritivo BIOXON	Agar Mac Conkey BIOXON
Agar Bilis Verde Brillante BIOXON	Agar Salmonella Shigella BIOXON
Agar EC coliformes acumedia	Agar Salmonella BIOXON
Medio semisólido Rappaport-Vassiliadis DIFCO	Agar XLD DIFCO
Medio de mantenimiento DIFCO	

5.1.3 Reactivos y soluciones

Antisueros <i>Salmonella</i> BD	Antisueros <i>E. coli</i> BD
<i>Anti sueros Factor m</i>	<i>Antisuero O157:H7</i>
<i>Anti sueros Factor 1, 9, 12</i>	
<i>Anti sueros Poly A-1 Vi</i>	Master mix
<i>Anti sueros Factor S</i>	TAE
<i>Anti sueros Grupo B</i>	Tiras API E20
Agua destilada	Bromuro de etidio
Benzal	Buffer de carga
Alcohol	Agarosa
Fenol	Alcohol isopropilico
Solución salina isotónica	

5.1.4 Cepas de referencia empleadas

Se utilizaron las siguientes cepas control *Salmonella Typhi* ATCC 19430, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) 0157:H7 ATCC 25922 y *E. coli* enterotoxigenica (ECET) ATCC 25922

5.2.1 Metodología

La investigación se llevo a cabo en 3 etapas:

- El primo-aislamiento de enterobacterias
- La identificación de cepas del género *Salmonella*, ECEH y ECET mediante pruebas bioquímicas y serológicas
- Identificación de cepas patógenas mediante el uso de PCR

5.3 Obtención de las muestras

Se realizaron muestreos de carne y queso en varios rastros municipales, mercados y tianguis de diferentes ciudades y municipios del país; Distrito Federal, Estado de México, Puebla, Hidalgo, Guanajuato y Jalisco, analizando 79 muestras de carne y 40 muestras de queso fresco tipo ranchero,

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético nuevas y estériles dentro de un contenedor térmico con refrigerantes (4°C) para evitar la contaminación ambiental y conservación de las mismas, las cuales fueron enviadas en un lapso menor de 24 horas al laboratorio.

5.3 *Preenriquecimiento Selectivo*

En el laboratorio se procedió a realizar el análisis de las muestras, se realizó un corte para obtener una porción central de las muestras tanto de carne como de queso de aproximadamente 5 gramos, y otra de la porción externa. La muestra se colocó en 50 mL de caldo peptonado, se incubó a 37°C durante 18 horas con agitación constante, una vez transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 5 mL con una pipeta y se transfirió a un tubo falcom de 50 mL con 30 mL de caldo tetrionato, se incubó a 37°C durante 18 horas con agitación constante.

5.3.1 *Enriquecimiento Selectivo*

Se tomó una alícuota y se inoculó en medio agar bilis verde brillante y se incubó a 37°C durante 18 horas, en donde se observaron las colonias que tengan la descripción macroscópica y diferenciándolas en base a su capacidad de degradar la lactosa; una vez aisladas las colonias sospechosas, se procedió a tomar una colonia y sembrar en medios específicos y diferenciales para cada bacteria.

5.4 *Aislamiento*

Para *E. coli* se transfirió una colonia del medio agar bilis verde brillante y se propagó en el medio Mac Conkey, se incubó a 37°C durante 18 horas, a partir del desarrollo, se tomó una colonia y se resembró en medio EC, se incubó a 45°C por 18 horas. En cada medio se realizó una comparación macroscópica y microscópica.

Para *Salmonella* sp se transfirió una colonia del medio agar bilis verde brillante y se propagó en el medio Mac Conkey, se incubó a 37°C durante 18 horas, se sembró en agar Salmonella-Shigella se incubó a 37°C durante 18 horas, una vez que se seleccionaron las colonias, se inoculó en medio Rappaport, se incubó a 37°C durante 18 horas. Se realizaron tinciones de Gram para comparar la morfología macroscópica y microscópica con la literatura.

5.5 Identificación por bioquímicas (microsistema API 20E)

Aisladas las colonias sospechosas se procedió a su identificación por medio de pruebas bioquímicas con el kit comercial; microsistema API 20E, para confirmar la identidad y por ende la presencia de estas bacterias, se inocularon las pruebas como se indica en el inserto.

La identificación se obtuvo a partir de un código numérico que se obtiene en la hoja de resultados y se verificó en el software de identificación *apiweb*™, donde se introdujeron los códigos y se obtiene la identificación de la cepa problema.

5.6 Extracción de DNA

Las colonias identificadas como *Salmonella* sp. y *E. coli* se transfirieron a agar nutritivo, se incubó a 37°C durante 18 horas. Del cultivo de 18 horas se realizó la extracción de DNA, empleando un kit comercial, Instagene.

Para la extracción del DNA se colocó 50 µL de Instagene y se suspendió 3 colonias jóvenes, se homogenizó la mezcla con un vortex por 10 segundos, posteriormente se incubó a 56 °C por 30 minutos, se volvió a colocar en el vortex por 10 segundos, se incubó a temperatura de ebullición del agua por 10 minutos en un baño de agua, una vez transcurrido el tiempo se homogenizó con el vortex por otros 10 segundos y se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos. En el pellet se encuentran los componentes celulares y en el sobrenadante se encuentra el DNA. El sobrenadante es separado del pellet en un nuevo tubo eppendorf para su

posterior uso en la mezcla empleada en la técnica del PCR, se conservó en un congelador, mientras que el pellet es desechado

Para la realización de la amplificación de los fragmentos de *Salmonella* sp y *E. coli* se emplearon los primer de *invA* y la subunidad 16S ribosomal para el caso de *Salmonella* sp. El primer utilizado para *E. coli* fueron los genes *eltA* y *eltB* los cuales son los responsables de sintetizar la endotoxina de *E. coli*.

5.7 Preparación y realización de PCR

Se tomó 12.5 µL de master mix taq pol1, el cual es un kit comercial que contiene BaCl, el buffer y la Taq polimerasa 1, con 0.6 µl de los primer y 9. 3 µl de agua para completar un volumen de 23 µL, se adicionó 2 µl de DNA y se mezcló por inversión en un tubo eppendorf.

Se colocó la mezcla en un termociclador convencional para realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) durante 30 ciclos, para el caso de las colonias de *Salmonella* sp. con los genes de la *subunidad 16S ribosomal*, su temperatura de acoplamiento fue de 52 °C, mientras que para los genes *invA* y los genes *eltAB* se trabajó a una temperatura de 43°C.

Una vez transcurridos los ciclos se realizó un corrimiento de una electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio y como marcador de peso molecular se empleó el 2 Log, las bandas observadas deben de corresponder aproximadamente a los siguientes pesos moleculares:

Gen	Peso molecular aproximado pb
<i>invA</i>	500
<i>Sub unidad 16S ribosomal</i>	500
<i>eltAB</i>	completa 1200, <i>eltA</i> 700, <i>eltB</i> 350

Con las cepas que amplificaron se procedió a realizarse las pruebas de serotipificación para la cual se emplearon antisueros comerciales, tanto para *Salmonella* sp. y *E. coli*. Esto nos permite identificar a las cepas en base a sus antígenos somáticos o flagelares.

Para las cepas del género *Salmonella* y *E. coli* se emplearon los siguientes antisueros para realizar su identificación serológica de cada cepa:

<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	Poly A-1 Vi	Factor 1, 9, 12	Factor S	Factor m	Grupo B
<i>E. coli</i>	Anti O157:H7				

6 Resultados:

6.1 Resultados de muestras de carne

Se analizaron 79 muestras de carne en los siguientes estados de la República Mexicana: 17 en el Estado de México, 14 en Hidalgo, 19 en Oaxaca, 11 en Guanajuato, 10 en Puebla y 8 en el Distrito Federal.

Después de haber sido aisladas, identificadas y analizadas las muestras, los resultados se colocaron en la tabla 1, solamente se colocaron aquellas muestras donde se pudo confirmar las cepas con el micro sistemas API20 E.

Con estos datos se pudo observar que la frecuencia de *Salmonella* sp. Es de 41% y *E. coli* correspondió a 29% presentes en las muestras analizadas. Los datos obtenidos son simplificados en la tabla 2 incluyen los muestreos totales en cada estado, así como las colonias confirmadas, con los géneros bacterianos aislados.

En la tabla 1 se observan los aislamientos obtenidos en las muestras de carne en donde se puede apreciar la presencia de las dos bacterias en una misma muestra, mientras que en algunos casos solo se presentó un tipo de microorganismo. En total se aislaron 33 cepas de *Salmonella* sp. y 23 cepas de *E. coli* de un total de 79 análisis lo que representa un 70% de muestras contaminadas con estos microorganismos.

Para el estado de México se analizaron 17 muestras en donde se logró aislar 11 cepas de las cuales corresponden 8 cepas de *Salmonella* sp. y 3 *E. coli*, de estas se confirmaron por PCR 4 *Salmonellas* sp. y 3 *E. coli*.

TABLA1. GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS DE CARNE, EN LOS 6 ESTADOS DEL PAIS.

Clave de la muestra	cepa	Clave de la muestra	cepa
Edo. Mex.		Oax.	
Edo. Mex C-1	<i>E. coli</i>	Oax. C-1	<i>Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-2	<i>E. coli</i>	Oax. C-2	<i>E. coli</i>
Edo. Mex C-4	<i>Salmonella sp.</i>	Oax. C-5	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-5	<i>E. coli</i>	Oax. C-6	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-6	<i>E. coli</i>	Oax. C-7	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-7	<i>Salmonella sp.</i>	Oax. C-8	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-8	<i>Salmonella sp.</i>	Oax. C-9	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-9	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Oax. C-10	<i>Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-11	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Oax. C-11	<i>E. coli</i>
Edo. Mex C-12	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Oax. C-14	<i>Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-13	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Oax. C-16	<i>Salmonella sp.</i>
Edo. Mex C-14	<i>Salmonella sp.</i>	Oax. C-17	<i>E. coli</i>
Edo. Mex C-15	<i>Salmonella sp.</i>	Oax. C-19	<i>E. coli</i>
Edo. Mex C-16	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto.	
Edo. Mex C-17	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. C-1	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo.		Gto. C-2	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-1	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto. C-3	<i>Salmonella sp.</i>
Hgo. C-2	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto. C-4	<i>Salmonella sp.</i>
Hgo. C-3	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. C-5	<i>E. coli</i>
Hgo. C-4	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. C-7	<i>Salmonella sp.</i>
Hgo. C-5	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. C-9	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-6	<i>E. coli</i>	Gto. C-10	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-7	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto. C-11	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-10	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb.	
Hgo. C-11	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb. C-1	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-12	<i>Salmonella sp.</i>	Pueb. C-2	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Hgo. C-13	<i>Salmonella sp.</i>	Pueb. C-3	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
D.F		Pueb. C-5	<i>Salmonella sp.</i>
D.F C-2	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb. C-6	<i>Salmonella sp.</i>
D.F C-4	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb. C-7	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
D.F C-5	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb. C-8	<i>E. coli</i>
D.F C-6	<i>Salmonella sp.</i>	Pueb. C-9	<i>Salmonella sp.</i>
D.F C-7	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Pueb. C-10	<i>E. coli</i>
D.F C-8	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>		

TABLA 2. AISLAMIENTOS, IDENTIFICACION Y PCR DE LAS CEPAS DE CARNE EN CADA ESTADO.

CARNE	muestras	Bioquímicas		PCR	
		<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>
Edo. Mex.	17	8	3	4	3
D.F.	8	5	5	5	3
Gto.	11	5	4	2	1
Hgo.	14	5	5	2	3
Oax.	19	6	5	3	2
Pub.	10	4	1	2	1

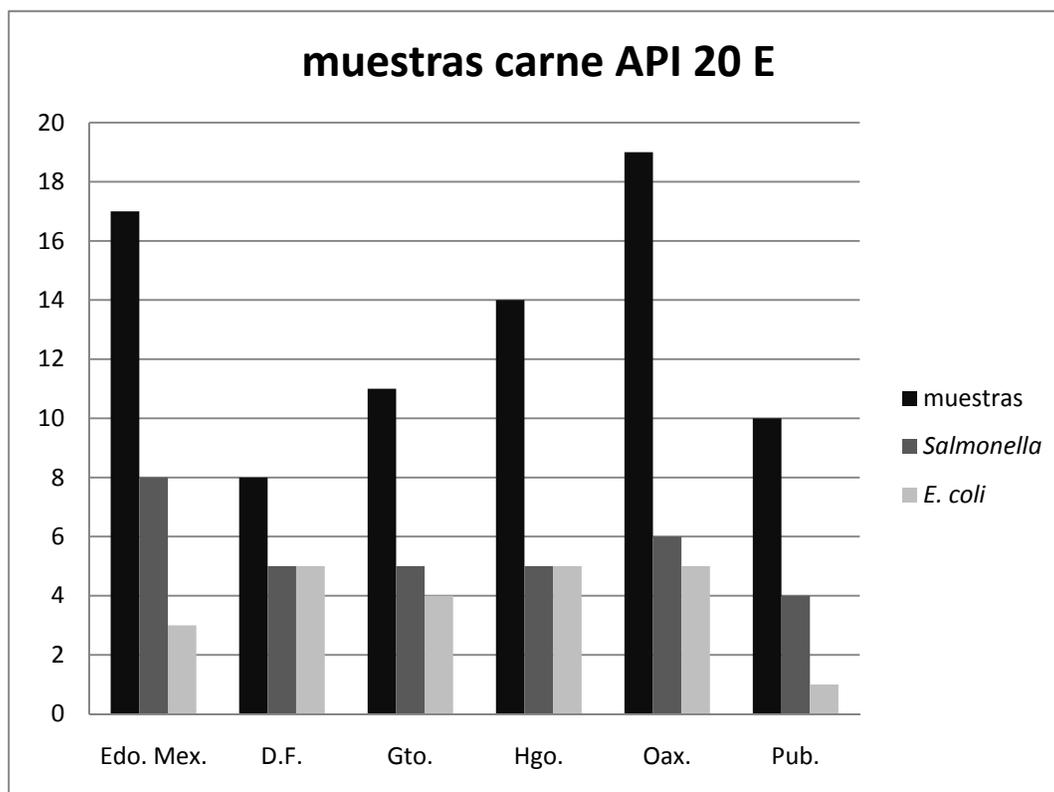
En el Distrito Federal se analizaron 8 muestras de carne y se logró aislar 5 cepas de *Salmonella sp.* y 5 de *E. coli*, con PCR solo disminuyó las de cepas de *E. coli* con 3, siendo el estado con mayor presencia de bacterias patógenas en relación con el número de muestras analizadas. El estado de Guanajuato se pudo aislar 9 cepas; 5 de *Salmonella sp.* y 4 de *E. coli*, PCR amplificaron 2 cepas de *Salmonella ssp.* y 1 de *E. coli*. En Hidalgo se identificaron 10 cepas de 14 muestras de las cuales 5 fueron *Salmonella sp.* y 5 de *E. coli*, con PCR se obtuvo 2 cepas de *Salmonella sp.* y 3 de *E. coli*. En Oaxaca se analizaron 19 muestras de las cuales se obtuvieron 6 aislamientos de *Salmonella sp.* y 5 *E. coli*, mientras que el análisis con PCR se obtuvo 3 amplificaciones de *Salmonella sp.* y 2 amplificaciones de *E. coli*. Finalmente en el estado de Puebla se analizaron 10 muestras y se obtuvieron 5 aislamientos; 4 *Salmonellas sp.* y 1 *E. coli*, en el PCR amplificaron 2 cepas de *Salmonella sp.* y 1 *E. coli*.

También se observa la relación de la presencia de *E. coli* y *Salmonella sp* con el número de muestras analizadas mediante pruebas bioquímicas y PCR, en

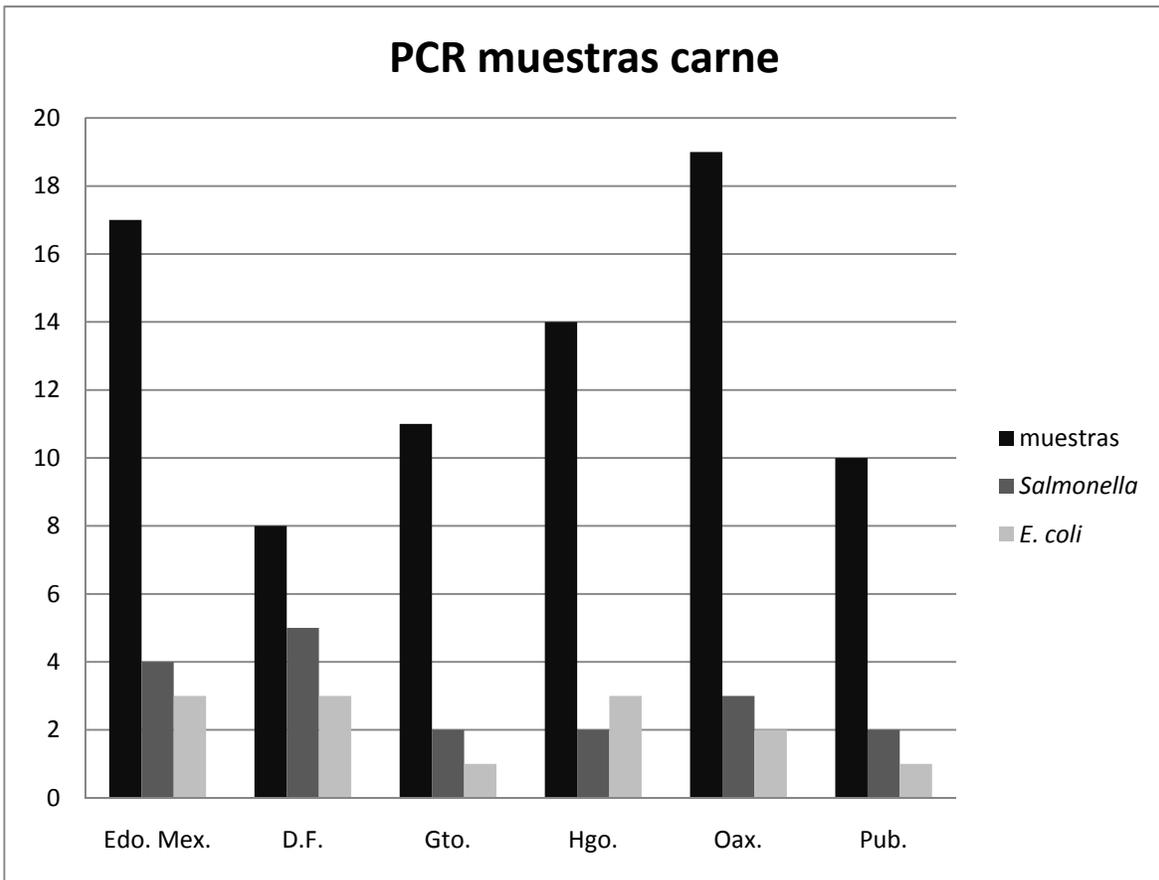
donde se aprecia la variación entre el número de cepas confirmadas con bioquímicas y con PCR.

En la grafica 1 se muestran los aislamientos de carne identificadas por pruebas bioquímicas y en la grafica 2 se ve el número de cepas analizadas por PCR, en ambas graficas se hace una relación de la cantidad de muestras analizadas, así como, las cepas aisladas de *Salmonella* sp. y *E. coli* en cada uno de los estados, se puede observar gráficamente la confirmación de las cepas por PCR, esto se debe a que solo se emplearon genes de interés por lo cual es probable que las cepas que amplificaron sean patógenas.

GRAFICA 1. MUESTRAS DE CARNES ANALIZADAS CON API 20 E EN LOS 6 ESTADOS ESTUDIADOS.



GRAFICA 2. CEPAS DE CARNE ANALIZADAS MEDIANTE PCR



Con estos datos se pudo observar la mayor incidencia de aislamientos y detección de agentes patógenos como es el caso de *Salmonella* sp con una incidencia del 41% (33 cepas) sobre *E. coli* que corresponde a 29% (23 cepas). Por otro lado, la mayor probabilidad de contraer ETA por esta *Salmonella* sp es en el Distrito Federal, lo cual coincide con los datos reportados por la secretaria de salud de esos estados.

6.2 Resultado en muestras de quesos

Se analizaron 43 muestras de quesos procedentes de los siguientes estados de la República Mexicana: 16 muestras en el Estado de Jalisco, 10 del Estado de México, 9 del Estado de Guanajuato, 6 del Estado de Hidalgo y 2 del Distrito Federal, como se observa en la tabla 3.

En la tabla 4, se muestran los resultados obtenidos en quesos frescos, como se indica en la metodología, se procedió a identificar las cepas mediante el empleo de microsistemas API -20E.

Con estos datos se pudo observar que la frecuencia de *Salmonella* sp en quesos es de 39.5% y *E. coli* correspondió a 34.8% presentes en el total de las muestras analizadas. Los datos obtenidos son simplificados en la tabla 3 incluyen los muestreos totales en cada estado, así como las colonias confirmadas, así como de los géneros bacterianos aislados.

La tabla 4, se muestra la frecuencia de *Salmonella* sp y *E. coli* presente en las muestras analizadas, donde relacionan los muestreos en cada estado y los aislamientos identificados con microsistemas API-20E, así como su corroboración por PCR en punto final, utilizando como iniciadores los genes *invA* y *Sub unidad 16S ribosomal* para *Salmonella* sp., para el caso de *E. coli* se empleo el gene *eltAB*.

En la tabla 4 se observan los aislamientos obtenidos en las muestras de queso en donde se puede apreciar la presencia de las dos bacterias en una misma muestra, mientras que en algunos casos solo se presento un tipo de microorganismo. En total se aislaron 17 cepas de *Salmonella* sp. y 15 cepas de *E. coli* de un total de 43 análisis lo que representa un 74.4% de muestras contaminadas con estos microorganismos.

TABLA 3. AISLAMIENTOS OBTENIDOS EN MUESTRAS DE QUESO FRESCO REALIZADO EN 5 ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA

Jal.		Gto.	
Clave muestra	cepa	Clave muestra	cepa
Jal. Q-1	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto. Q-3	<i>Salmonella sp.</i>
Jal. Q-2	<i>E. coli</i>	Gto. Q-4	<i>E. coli</i>
Jal. Q-3	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. Q-5	<i>Salmonella sp.</i>
Jal. Q-6	<i>Salmonella sp.</i>	Gto. Q-6	<i>E. coli</i>
Jal. Q-7	<i>E. coli</i>	Gto. Q-7	<i>E. coli</i>
Jal. Q-8	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Gto. Q-9	<i>Salmonella sp.</i>
Jal. Q-9	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	Hgo.	
Jal. Q-11	<i>E. coli</i>	Hgo. Q-1	<i>E. coli</i>
Jal. Q-12	<i>Salmonella sp.</i>	Hgo. Q-2	<i>Salmonella sp.</i>
Jal. Q-15	<i>E. coli</i>	Hgo. Q-3	<i>E. coli</i>
Jal. Q-16	<i>Salmonella sp.</i>	Hgo. Q-5	<i>Salmonella sp.</i>
Edo. Mex.		Hgo. Q-6	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>
Edo. Mex. C-1	<i>Salmonella sp.</i>	D.F.	
		D.F. Q-1	<i>E. coli</i>
Edo. Mex. C-2	<i>E. coli, Salmonella sp.</i>	D.F. Q-2	<i>Salmonella sp.</i>

En esta tabla 3 se puede observar los aislamientos realizados en cada estado muestreado en la cual se puede observar que en algunas muestras fue posible aislar tanto a *E. coli* como a *Salmonella sp.*, lo que nos dice las condiciones en la cual se venden los quesos en estos lugares. Se analizaron 43 muestras de quesos donde se lograron aislar 17 cepas (39.5%) de *Salmonella sp.* y 15 cepas (34.8%) de *E. coli*.

TABLA 4. RESULTADOS DE MUESTRAS DE QUESO FRESCO ANALIZADAS CON EL SISTEMA API-20E E IDENTIFICADAS POR PCR.

QUESOS	procedencia	Bioquímicas		PCR	
		muestras	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Edo. Mex.	10	2	1	1	1
D.F.	2	1	1	1	1
Jal.	16	7	7	4	3
Gto.	9	3	3	1	1
Hgo.	6	4	3	1	1

En el Estado de México se analizaron 10 muestras de las cuales se aislaron 2 *Salmonellas* sp. y 1 *E. coli*, con PCR se obtuvieron 1 cepas de cada genero bacteriano. En el Distrito Federal se estudio 2 muestras de las cuales se obtuvieron 1 cepa de *Salmonella* sp. y 1 de *E. coli*, estos se mantuvieron con PCR. En Jalisco se analizaron 16 muestras de las cuales se aislaron 7 cepas de *Salmonella* sp. y 7 de *E. coli*, de las cuales 4 cepas de *Salmonella* sp. y 3 cepas de *E. coli* amplificaron con PCR. En el estado de Guanajuato se analizaron 9 muestras en donde se obtuvieron 6 aislamientos; 3 *Salmonellas* sp. y 3 *E. coli*, de las cuales solo amplifico 1 cepa de *Salmonella* sp. y 1 de *E. coli*. En el estado de Hidalgo se obtuvieron 7 aislamientos de los cuales 4 fueron *Salmonella* sp. y 3 *E. coli*, mientras que con el PCR en ambos casos solo una cepa tanto de *Salmonella* sp. y *E. coli* amplificaron.

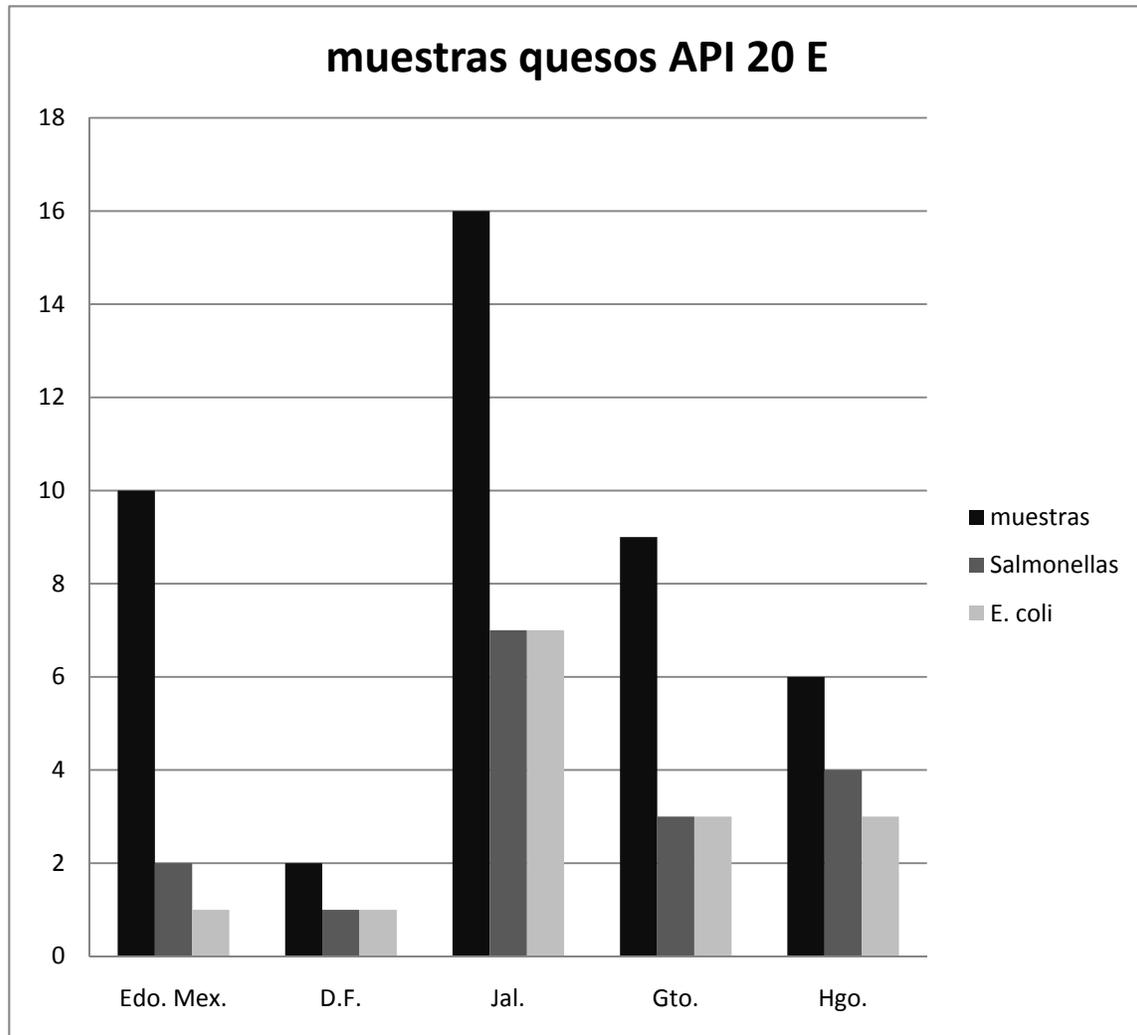
El estado que tiene una mayor incidencia de contener estas bacterias es Hidalgo, seguido de Jalisco, esto se deba a que son estados que se dedican a la producción del queso fresco tipo ranchero.

En la tabla 4 se observó los aislamientos realizados en donde se obtuvo un total de 32 cepas; 15 cepas de *E. coli* y 17 de *Salmonella* sp. lo que representa un 74.4% de contaminación por estas bacterias en quesos.

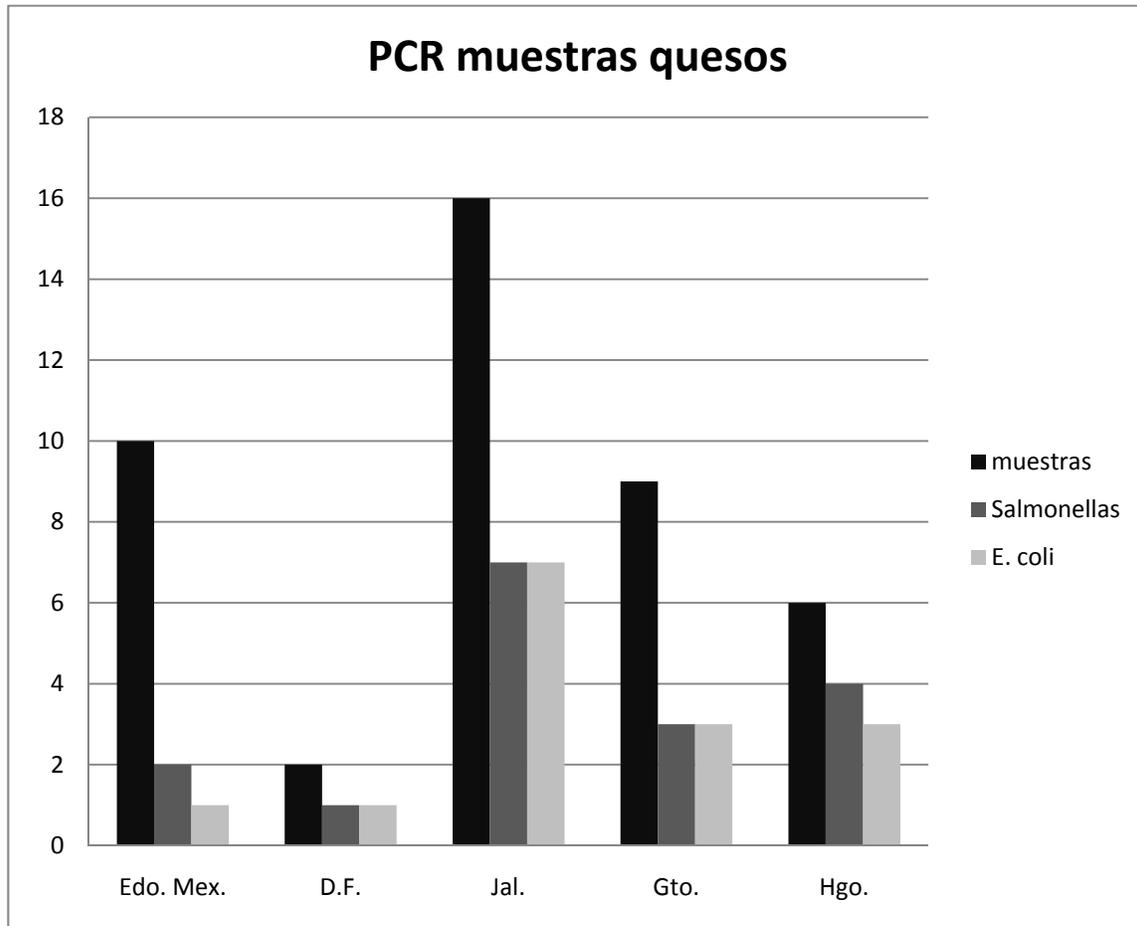
En cuanto al PCR se puede observar que las cepas con patogenicidad detectada por los genes estudiados disminuye cerca de un tercio en el caso de Hidalgo y Guanajuato mientras que en Jalisco fue la mitad, en los demás estados prácticamente no cambió, sin embargo no se puede descartar la patogenicidad de las demás cepas aisladas puesto a que solo se buscaron genes específicos de patogenicidad.

En la gráfica 3 se muestra los datos obtenidos de quesos y en la gráfica 4 se ve el número de cepas analizadas por PCR, en ambas gráficas se relaciona el número de muestras y el número de cepas de *Salmonella* sp. y *E. coli* en cada estado, donde se observó la disminución en el número de las cepas por PCR, por las razones ya mencionadas de los genes estudiados.

**GRAFICA 3. CEPAS PROCEDENTES DE LAS MUESTRAS DE QUESOS
ANALIZADAS E IDENTIFICADAS POR API 20 E**



GRAFICA 4. CEPAS DE QUESO FRESCO ANALIZADAS POR PCR EN LOS 5 ESTADOS EN ESTUDIO



En las graficas 3 y 4 se puede observar que el estado con mayor incidencia es Guanajuato, además de que con PCR se mantuvo la patogenicidad de las cepas lo que corresponde a la literatura ya que según datos de la Secretaria de Salud pública, ese estado es uno de los que más ETA presentó este año, en segundo lugar Jalisco, esto se debe en parte a la gran producción ganadera y producción de quesos que existe en estas regiones. Con estos datos se pudo observar una mayor incidencia de aislamientos y detección de patogenicidad de *Salmonella* sp. (17 cepas) sobre *E. coli* (15 cepas) lo que nos indica una mayor probabilidad de contraer ETA por esta bacteria en los estados muestreados.

6.3 Serología

Los datos de la serología del género *Salmonella* y *E. coli* en muestras de carne se encuentran en la tabla 5 y 6. En ella solo se incluyen los resultados positivos de las serologías realizadas las cuales fueron: poly A-1 Vi, fac 1, 9, 12, fac s, fac m y grupo B para *Salmonella* sp. mientras que para *E. coli* se empleo el anti O157:H7.

En la tabla 5 y 6 aparecen los datos de la serología realizada a las cepas obtenidas a partir de las muestras de carne, las cuales fueron hechas con antígenos comerciales buscando los serotipos de las bacterias patógenas más comunes y causantes de ETA. En la tabla 5 se tienen los resultados de la serogía hecha a las 33 cepas de *Salmonella* sp. en la cual se obtuvieron: 5 *S. Enteritidis*, 4 *S. Typhi*, 1 *S. Typhimurium*; lo cual corresponde en con los datos obtenidos con PCR y se encontraron algunas cepas que no amplificaron con PCR, lo que nos indica que poseen otros factores de virulencia que no se pudo detectar con los genes empleados en PCR. En la tabla 6 aparecen los datos de la serología hecha a las 23 cepas de *E. coli* en la cual 6 cepas aglutinaron con el antígeno, las cepas correspondieron con las 7 que amplificaron con el PCR.

En las tablas 7 y 8 aparecen los datos obtenidos de la serología realizados a las cepas correspondientes a las muestras de quesos. En la tabla 7 aparecen los resultados de la serotipificación de las 17 cepas *Salmonella* sp., los antígenos empleados son para las cepas patógenas más representativas del género *Salmonella* en alimentos. 5 *S. Enteritidis*, 3 *S. Typhi*, 1 *S. Typhimurium*, obteniendo resultados similares a los del PCR, en este caso las *Salmonellas* fueron 9 con la serología mientras que con el PCR fueron 8, las cepas fueron las mismas en PCR y serología. En la tabla 8 aparecen los datos correspondientes a las 15 cepas de *E. coli* obteniendo 6 con serología y 7 con PCR, de igual forma las cepas identificadas con estas pruebas coincidieron, lo que nos indica que las cepas poseen factores que les confieren la capacidad de ser patógenas.

TABLA 5. DATOS DE SEROLOGÍA REALIZADAS A LAS 33 CEPAS DE *Salmonella* sp. PROCEDENTES DE LAS MUESTRAS DE CARNE

Procedencia	serotipificación de <i>Salmonella</i> sp. GRUPO D					
	Cepa identificada	poly A-1 Vi	O: 1,9,12	H: m	H: s	Grup B
ESTADO DE MÉXICO						
Edo. Mex C-1	S. Enteritidis	(+)	(+)			
Edo. Mex C-2						(+)
Edo. Mex C-7	S. Typhi		(+)	(+)		
Edo. Mex C-8	(+)					
Edo. Mex C-12					(+)	
Edo. Mex C-13					(+)	
Edo. Mex C-14				(+)		
DISTRITO FEDERAL						
D.F C-2						(+)
D.F C-4	(+)				(+)	
D.F C-5	S. Enteritidis	(+)	(+)			
D.F C-6	(+)					
D.F C-8	S. Typhi		(+)	(+)		
GUANAJUATO						
Gto. C-1	S. Typhi		(+)	(+)	(+)	
Gto. C-2				(+)		
Gto. C-3	(+)					
Gto. C-7					(+)	
Gto. C-11	(+)			(+)		
HIGALGO						
Hgo. C-3						(+)
Hgo. C-4					(+)	
Hgo. C-5					(+)	
Hgo. C-12	S. Enteritidis	(+)	(+)			
Hgo. C-13	S. Typhimurium			(+)	(+)	(+)
OAXACA						
Oax. C-5	S. Enteritidis	(+)	(+)		(+)	
Oax. C-6				(+)		
Oax. C-10	S. Typhi		(+)	(+)		
Oax. C-14					(+)	
Oax. C-16	(+)					
PUEBLA						
Pueb. C-5						(+)
Pueb. C-6	S. Typhi		(+)	(+)		
Pueb. C-7					(+)	
Pueb. C-9					(+)	

Tabla 5: Serología de *Salmonella*, se decidió emplear estos reactivos debido a que son los más representativos de las cepas patógenas de *Salmonella* sp.. (+) *S. Enteritidis*, (+) *S. Typhi*, (+) *S. Typhimurium*, resto no se pudo definir el serotipo.

TABLA 6. SEROLOGÍA EN LAS 6 CEPAS DE *E. COLI* PROCEDENTES DE LAS MUESTRAS DE CARNE

PROCEDENCIA	anti O157:H7	Cepa identificada
ESTADO DE MÉXICO		
Edo. Mex C-11	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
DISTRITO FEDERAL		
D.F C-7	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
D.F C-8	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
HIDALGO		
Hgo. C-6	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
Hgo. C-11	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
OAXACA		
Oax. C-17	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7

En las tablas 7 y 8 se encuentran la serología realizada a las colonias identificadas de *Salmonella sp.* y *E. coli* a partir de las muestras de quesos, a las cuales se les realizó una prueba serológica para conocer la patogenicidad de las cepas aisladas en los 5 estados estudiados, obteniendo 10 cepas de *Salmonella sp.*, de las cuales; 5 cepas fueron de *S. Typhi*, 3 cepas de *S. Enteritidis* y 1 cepa de *S. Typhimurium*, de las cepas que aglutinaron con los antisueros corresponden con las cepas que amplificaron con PCR, mientras que se analizaron 7 cepas de *E. coli* de las cuales 7 fueron *E. coli* O157:H7, estas cepas fueron las mismas que amplificaron con la técnica de PCR, lo cual nos indica que tanto las cepas de *Salmonella sp.* y *E. coli* aisladas en las muestras de quesos poseen factores que les pueden conferir la capacidad de ser patógenas.

TABLA 7. SEROLOGÍA EMPLEADA EN LAS 10 CEPAS DE *Salmonella* sp. PROCEDENTES DE QUESOS FRESCOS.

Procedencia	Serotipificación de <i>Salmonella</i> sp.				
	GRUPO D				
	Cepa identificada	poly A-1 Vi	O: 1,9,12	H:m	H: s
ESTADO DE MÉXICO					
Edo. Mex. C-1	S.Typhimurium		(+)		(+)
Edo. Mex. C-2	S. Typhi		(+)	(+)	
DISTRITO FEDERAL					
D.F. Q-2	S. Enteritidis	(+)	(+)		
JALISCO					
Jal. Q-1	S. Typhi		(+)	(+)	(+)
Jal. Q-3					
Jal. Q-6	S. Typhi		(+)	(+)	
Jal. Q-8	S. Typhi		(+)	(+)	(+)
Jal. Q-12	S. Enteritidis	(+)	(+)		
GUANAJUATO					
Gto. Q-3	S. Typhi		(+)	(+)	
Gto. Q-9	S. Enteritidis	(+)	(+)		

Tabla 7: Serotipificación de los aislamientos de *Salmonella*. Los antígenos empleados son los para las cepas patógenas más representativas del género *Salmonella* en alimentos. (+) *S. Enteritidis*, (+) *S. Typhi*, (+) *S. Typhimurium*, el resto no se pudo definir el serotipo.

TABLA 8. SEROTIPIFICACIÓN REALIZADA A LOS 7 AISLAMIENTOS DE *E. COLI* PROCEDENTES DE QUESOS FRESCOS

Procedencia	anti O157:H7	Cepa identificada
DISTRITO FEDERAL		
D.F. Q-1	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
JALISCO		
Jal. Q-2	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
Jal. Q-8	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
GUANAJUATO		
Gto. Q-4	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
HIDALGO		
Hgo. Q-1	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
Hgo. Q-3	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7
Hgo. Q-6	(+)	<i>E. coli</i> O157:H7

De un total de 50 cepas de *Salmonella* sp. obtenidas tanto en queso como en carne se logro la identificación mediante serología de 10 cepas (20%) de *Salmonella* Enteritidis, 7 (14%) *Salmonella* Typhi y 2 (4%) *Salmonella* Typhimurium. De 38 cepas de *E. coli* aisladas en carne y queso se identificaron mediante serología 12 cepas (31.6%) de *E. coli* O157:H7

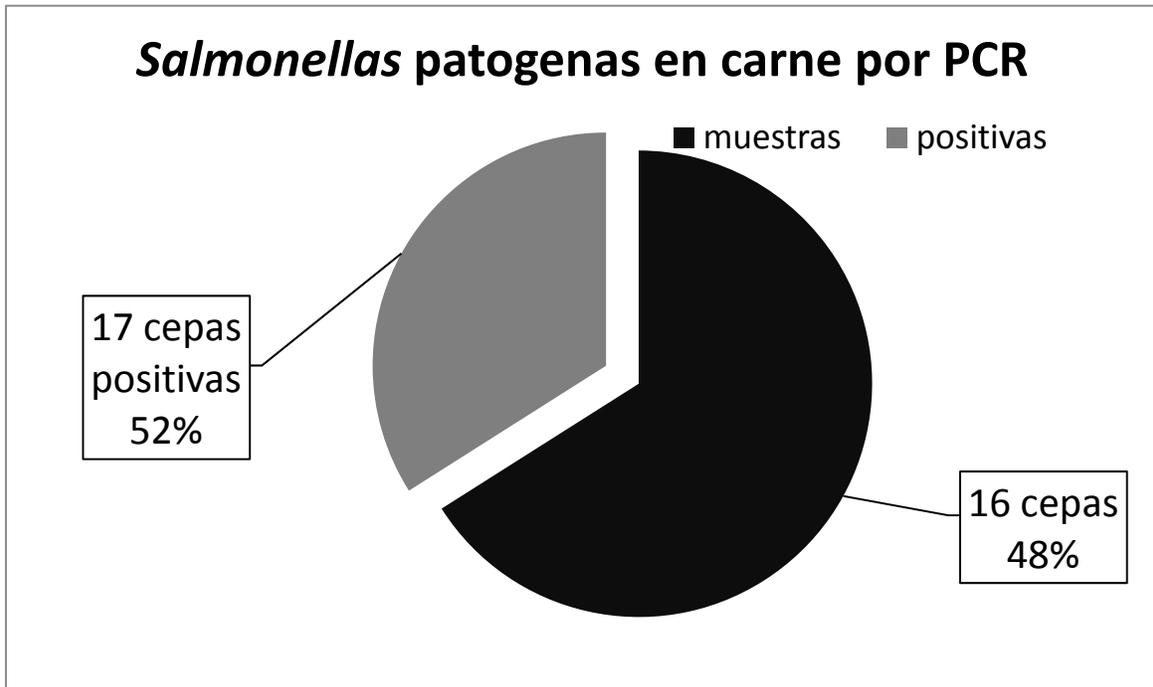
6.4 PCR

En el gráfico 5 se muestran los resultados de las 33 colonias confirmadas de *Salmonella* sp. en carne y a las cuales se les realizo PCR. En el gráfico 6 se encuentran los datos de las 16 cepas *Salmonella* sp. confirmadas por PCR en quesos.

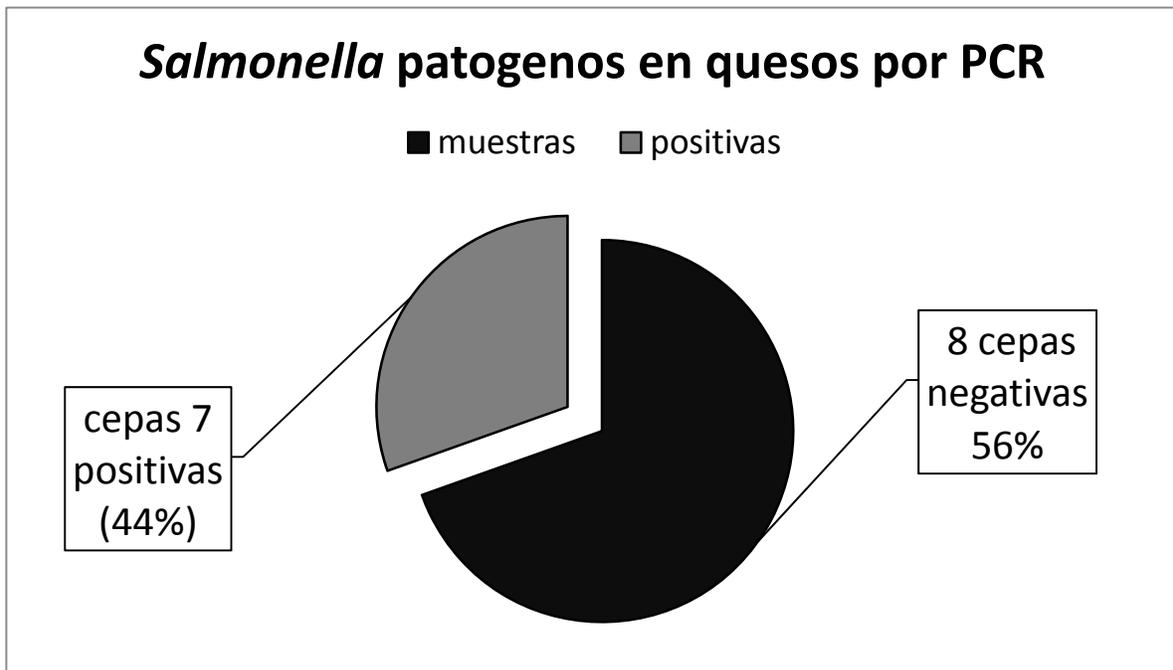
En este trabajo se encontraron serotipos patógenas del género *Salmonella*. y *E. coli*, lo cual implica un gran riesgo en la población. Algunos de los serotipos identificados en este trabajo, están asociados a cuadros diarreicos y cuadros clínicos severos en humanos, y como se muestra en los resultados, de las 79 muestras analizadas de carne; se aislaron 33 cepas de *Salmonella* sp. lo que representa 41% de contaminación por esta bacteria, de esas cepas, 16 amplificaron mediante PCR con los genes *invA* y subunidad 16S ribosomal, lo que significa que 48.5% de las cepas aisladas son patógenas, mientras que para *E. coli* se aislaron 23 cepas o 29%, de las cuales 9 o 39.1% amplificaron mediante PCR con el gene *eltAB*.

Se analizaron 40 muestras de quesos donde se aislaron 15 cepas de *Salmonella* sp. (37.5%), de las cuales 7 son patógenas (44%), en el caso de *E. coli* se aislaron 14 cepas (35%) donde 6 amplificaron con el gen *eltAB* (43%).

GRAFICA 5. ANALISIS DE LAS 33 CEPAS DE *Salmonella* sp. AISLADAS EN MUESTRAS DE CARNE MEDIANTE PCR

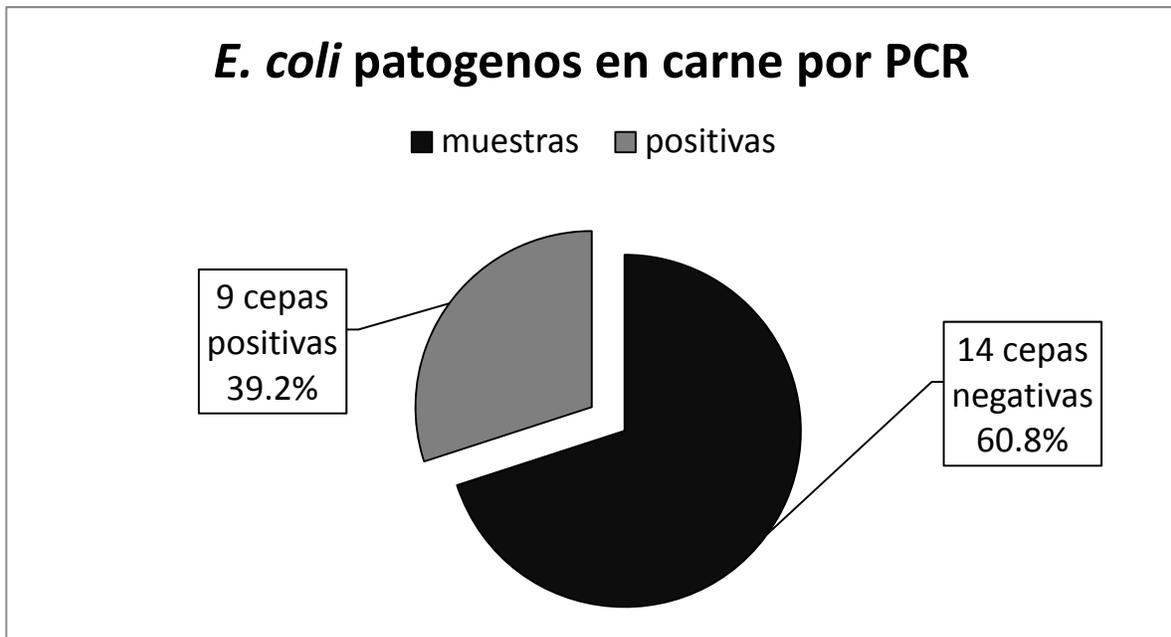


GRAFICA 6. AMPLIFICACIÓN DE LAS 15 CEPAS DE *Salmonella* sp. PROCEDENTES DE LAS MUESTRAS DE QUESO POR PCR



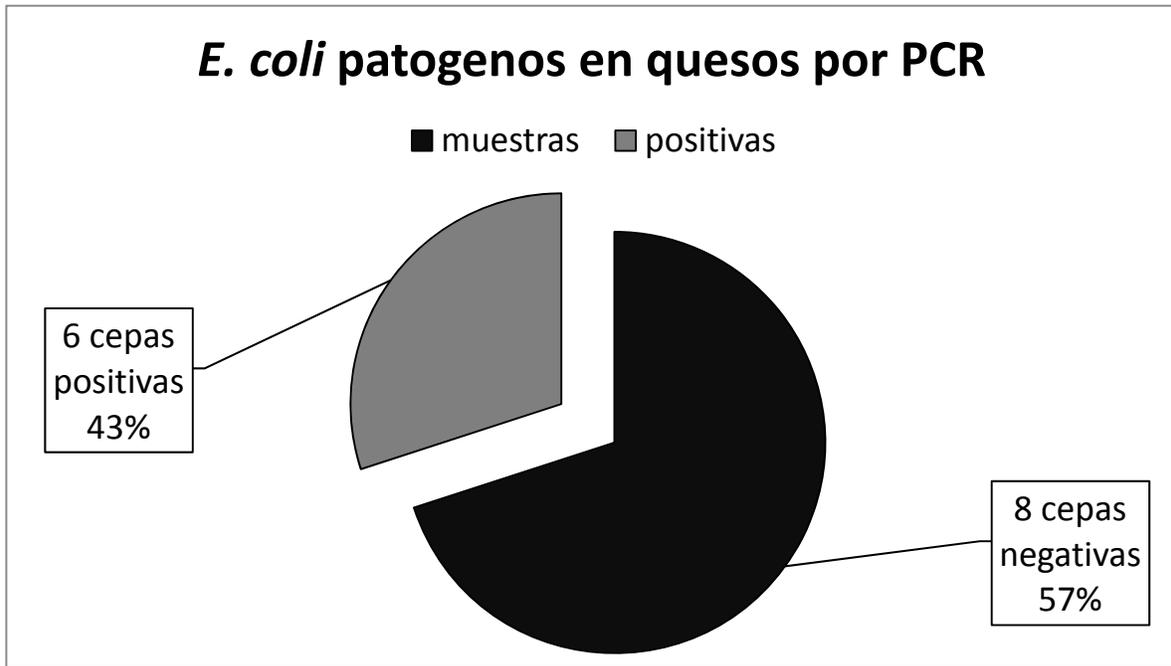
En la grafica 7 se muestran los resultados del análisis de PCR en las 23 cepas de *E. coli* obtenidas en carne, en la cual se observa que 9 cepas amplificaron, lo que representa el 39.2% de patogenicidad

GRAFICA 7. ANALISIS POR PCR DE LAS 23 CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE CARNE



En la grafica 8 se encuentran los resultados de PCR de *E. coli* provenientes de las 14 cepas identificadas en queso, en donde se aprecia que 6 cepas o el 43% de las cepas amplificaron

GRAFICA 8. AMPLIFICARON POR PCR DE LAS 14 CEPAS DE *E. COLI* AISLADAS EN MUESTRAS DE QUESOS FRESCOS



En la figura 1 se muestran las amplificaciones de los genes de *Salmonella* en los cuales se marcan los pesos moleculares aproximados de los genes. En los carriles 2 a 5 se muestran los genes correspondientes a *invA* mientras que en los carriles 6 a 9 son los genes de la sub unidad 16S ribosomal y en el carril 1 y 10 se muestra el marcador de peso molecular 2 log

En la figura 2 se puede observar el gel de electroforesis de *E. coli* en el cual se observa la toxina colérica completa y sus fragmentos *eltA* y *eltB*. En la imagen se marcaron los pesos moleculares de la toxina

FIGURA 1.

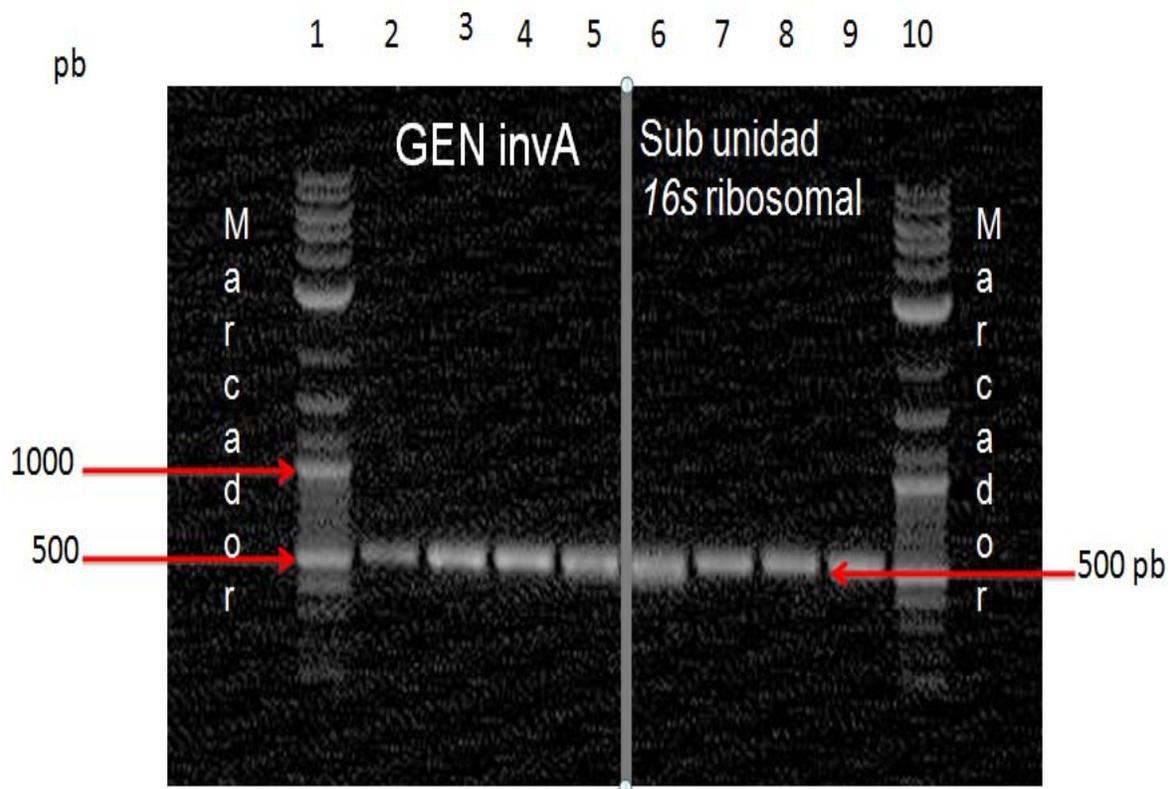


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa para los genes INVA y y RNAr 16S de 8 cepas de *Salmonella*. Donde se muestran los productos amplificados por PCR del gen INVA y RNAr 16S para las cepas de *Salmonella*, en los carriles 2, 3, 4 y 5 se observan los productos amplificados para el gen invA, mientras que en los carriles 6, 7, 8 y 9 se representan los productos amplificados del RNAr 16S. Se puede resaltar que ambos genes con un peso aproximado de 500 pb, en los carriles 1 y 10 se observa el marcador de peso molecular 2 Log

FIGURA 2.

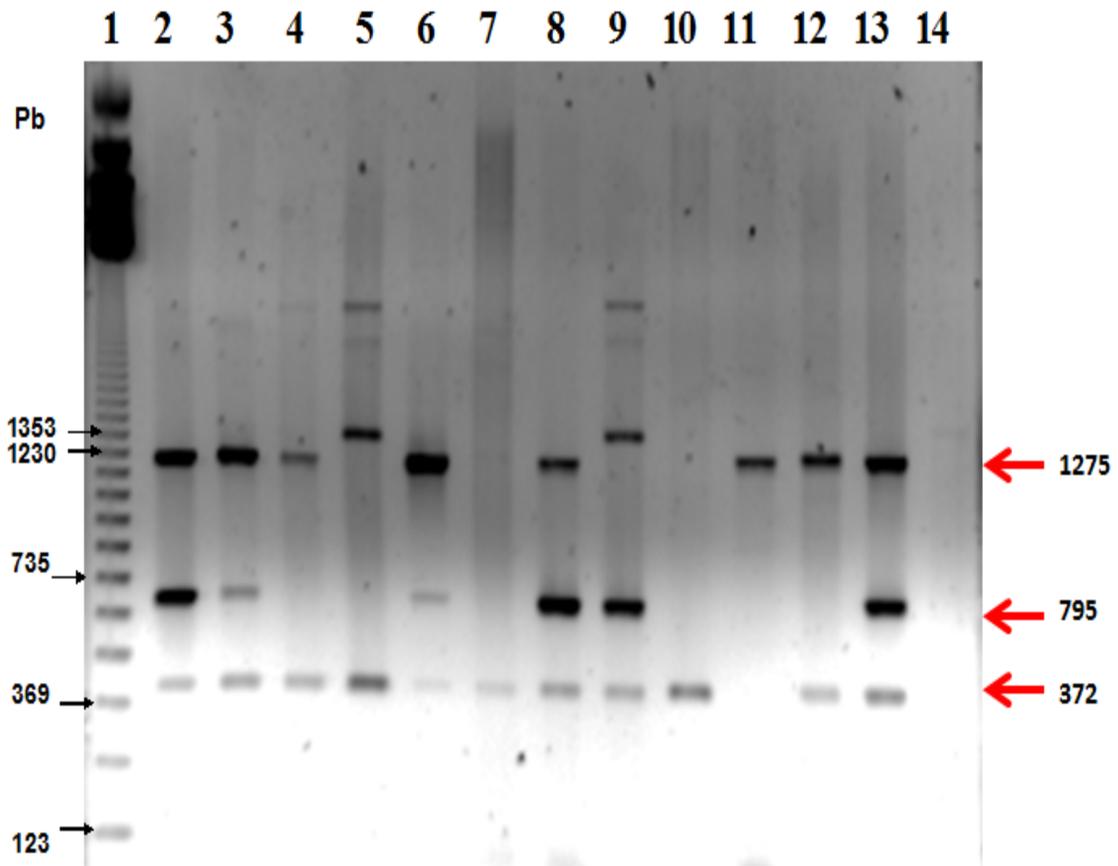


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa para 12 cepas de *E. coli*. Se observa los productos amplificados por PCR del gen elt AB, en los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, y 13 se observa los genes amplificados del gen elt AB con un peso molecular de 1275 Kb, en los carriles 2, 8, 9 y 13 se observa el fragmento eltA con un peso molecular de 795 Kb y en los carriles 2, 3, 4, 5, 8, 9 10, 12 y 13 pertenece al fragmento eltB con un peso molecular de 372 Kb.

7 *Discusión*

En el presente trabajo se busco identificar microorganismos patógenos en muestras de carne y quesos que se distribuyen en mercados de abasto popular en varios municipios de estados varios estados del centro del país. Los resultados obtenidos en este trabajo, servirán para hacer recomendaciones sobre el riesgo de consumir alimentos producidos y manejados inadecuadamente, ya que esto genera las condiciones para la multiplicación de microorganismos patógenos que causan un gran impacto a la salud pública.

En este trabajo se encontraron serotipos patógenas del género *Salmonella* sp. y *E. coli*, lo cual implica un gran riesgo en la población. Algunos de los serotipos identificados en este trabajo, están asociados a cuadros diarreicos y cuadros clínicos severos en humanos, y como se muestra en los resultados, de las 79 muestras analizadas de carne; se aislaron 33 cepas de *Salmonella* sp. lo que representa 41% de contaminación por esta bacteria, de esas cepas 16 amplificaron mediante PCR con los genes *invA* y subunidad 16S ribosomal, lo que significa que 48% de las cepas aisladas son patógenas, mientras que para *E. coli* se aislaron 23 cepas o 29.1%, de las cuales 9 o 39.2% amplificaron mediante PCR con el gene *eltAB*.

Se analizaron 40 muestras de quesos donde se aislaron 15 cepas de *Salmonella* sp. (37.5%), de las cuales 7 son patógenas (44%), en el caso de *E. coli* se aislaron 14 cepas (35%) donde 6 amplificaron con el gen *eltAB* (43%).

Las cepas que no amplificaron no se descarta que sean patógenas, puesto a que en varios casos donde la muestra fueron negativas en el PCR, si presentó aglutinación con los antisueros por lo cual se sospecha la patogenicidad de estas cepas.

La identificación de las cepas se llevaron a cabo con tiras API 20E las cuales fueron muy útiles, ya que nos permitió el ahorro de reactivos, medios de cultivo y tiempo. Las cualidades de estas tiras son la gran confiabilidad en los resultados,

son muy selectivas y específicas en los análisis, al utilizarlas se empleo una prueba estandarizada lo que nos permite tener una mayor seguridad en la confirmación de las cepas.

Con estos resultados se puede mencionar que la calidad y la inocuidad es pobre en los alimentos estudiados por lo que implica un riesgo a la salud pública, ya que prácticamente el 45% de los aislamientos son patógenos significando 21% del total de las muestras analizadas, teniendo una alta probabilidad de generar una ETA.

La Secretaria de Salud Publica informó que en el año 2001 hubo 85 brotes en carne de ETA en México, de los cuales 31 fueron causados por *Salmonella* Entérica y 15 por *E. coli*, esto significa que el 36.4% de las ETA fueron causadas por *Salmonella* Entérica y que el 17.6% fueron provocadas por *E. coli*, estos datos son similares a los obtenidos en este trabajo con 41.7% de las muestras contenían *Salmonella sp.*, mientras que de *E. coli* fue el 29.1%. En quesos se informó de 51 casos de ETA en quesos de las cuales 16 fueron *Salmonella sp* o el 31.4% y 14 *E. coli* o 27.4%, lo cual es similar con los datos obtenidos del análisis de 40 muestras de quesos donde se aislaron 15 cepas de *Salmonella sp.* (37.5%), en el caso de *E. coli* se aislaron 14 cepas (35%). Estas variaciones en la cantidad de aislamientos se pueden deber a la diferencia en los años en que se realizaron los estudios, puesto a que este trabajo se realizo en 2009.

Estudios de Karen J. Vigil, Zhi-Dong Jiang, kathryn L. Palumbo y colaboradores de la Universidad de Texas realizaron un estudio en Guadalajara sobre brotes de diarrea en carnicerías de Guadalajara por coliformes y *Escherichia coli* en junio de 2008, en donde de 49 muestras 47 estaban contaminadas por coliformes y 7 fueron ECET o el 14.3%, en este trabajo se obtuvieron 9 aislamientos de ECET 0 el 11.4%, se puede observar una variación en los resultados obtenidos de 2.9%, esta variación de aislamientos de ECET se debe que mis resultados son generales de los estados analizados.

Otro estudio realizado en quesos por Claudia D. Alcázar Montañez, María Salud Rubio Lozano y colaboradores de la facultad de veterinaria y Zootecnista de la UNAM en 2006, reportaron que de 30 quesos analizados 16 (50.0%) tenían presencia de *Salmonella sp* y 8 (26.6%) eran *E. coli*, en este trabajo se obtuvo; de 40 muestras analizadas 15 cepas (37.5%) de *Salmonellas sp.* y 14 cepas (35.0%) de *E. coli*.

Considerando toda la información reportada por otros investigadores y los datos generados por el COFEPRIS de la Secretaría de Salud y la OMS, en este trabajo se encontró que las 123 muestras analizadas, 79 muestras fueron de carne de bovino, siendo 41.7% positivas a *Salmonella* mientras que el 29.1%, fueron positivas a *E. coli*. Por lo que corresponde a las muestras de queso fresco de vaca el 39.5% fueron positivas a *Salmonella* y el 34.8% fueron positivas a *E. coli*.

Por lo que corresponde a los serotipos de enteropatógenos más frecuentes que se aíslan en México, el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) reporta que los serotipos más comunes del género *Salmonella* son *S. enteritidis* y *S. Typhimurium* y para *E. coli* uno de los principales serotipos es *E. coli* enterotoxigenica (ETEC). Desde este punto de vista, en este trabajo se encontraron los siguientes serotipos: *S. Typhi* (12.1%), *S. Enteritidis* (15.1%) y *S. Typhimurium* (3%) y un 26% fueron positivas a *E. coli* del serotipo O157:H7 en carne de res. En el queso fresco los serotipos del género *Salmonella* fueron, *S. Enteritidis* (29%), *S. Typhi* (17.6%) y *S. Typhimurium* (5.8%), mientras que para *E. coli* se encontró que el 31.6% correspondieron al serotipo O157:H7. Los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con los datos que reporta la OMS, sobre todo en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde enfatiza la tensión sobre la presencia de estos patógenos ya que causan graves problemas de salud pública en de estos países y los gobiernos deben prestar mayor atención al control y vigilancia de estos patógenos.

La detección microbiana en carne y queso fresco es importante, ya que son alimentos que manejados inadecuadamente favorecen la proliferación de estos microorganismos, los cuales pueden sobrevivir por largo tiempo. La higiene y control sanitario empleados durante su proceso de fabricación, juega un papel muy importante en la inocuidad de los alimentos como: leche, carne, huevo, quesos etc., otros factores importantes son las condiciones de distribución y almacenamiento hasta su venta final. Por lo que, la identificación temprana y adecuada de estos patógenos bacterianos pueden disminuir el riesgo para la salud pública.

Gran parte de esta contaminación se pueden atribuir a varios factores, en quesos: El ordeño es manual y el material empleado no se sanitiza correctamente. El personal encargado de la fabricación del alimento no se lava las manos antes de iniciar el proceso y no obedece buenas prácticas de manufactura. Se emplean utensilios de madera, plásticos y/o de aluminio, cuya limpieza y desinfección no se pueden asegurar por completo debido a la porosidad del material. Pasteurización deficiente de la leche. El empleo de tinajas o recipientes sucios para el procesamiento del queso. No contar con controles adecuados de refrigeración para la conservación de la leche y el producto terminado. Falta de aseo y desinfección del lugar destinado a la producción.

En carnes: Sacrificio inadecuado de los animales. No hay un control previo de las enfermedades que portan los animales o inspección *antemortem* y *postmortem*. El personal encargado de la fabricación del alimento no se lava las manos antes de iniciar el proceso y no obedece buenas prácticas de manufactura. Mal manejo de los productos cárnicos troceados y faenado. Mal manejo de los productos durante su distribución y conservación. Mala conservación de la carne durante su venta al público

Este tipo de contaminación se debe al poco control por parte de las autoridades que no vigilan el cumplimiento de las normas oficiales mexicanas las cuales establecen explícitamente las medidas a seguir para garantizar la calidad y la inocuidad de los alimentos que se distribuyen, de igual forma la contaminación se debe a las personas encargadas de procesar, manipular, distribuir, comercializar y almacenar estos productos, ya que aquí es donde existe una gran probabilidad de contaminación con estas bacterias

Con los datos obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la frecuencia de estos patógenos entéricos es alta en productos que se expenden en mercados de abasto popular, donde juega un papel muy importante la falta de buenas prácticas de producción, higiene y manejo en toda la cadena de producción y distribución de estos alimentos.

8 Conclusiones

1. Se logro el aislamiento de 23 cepas de *Escherichia coli* y 33 cepas de *Salmonella ssp.* en muestras de carne
2. Se logro aislar 17 cepas de *Salmonella sp.* y 15 cepa de *Escherichia coli* en muestras de queso
3. Se logro la identificación de *Escherichia coli* y de *Salmonella sp.* empleando las tiras API 20E las cuales son muy especificas y selectivas.
4. Se identificaron los serotipos de los microorganismos que se aislaron en este trabajo, con antisueros somáticos y flagelares para los patógenos de mayor importancia y los serotipos: fueron encontrados: 5 *S. Enteritidis*, 4 *S. Typhi*, 1 *S. Typhimurium* y 6 cepas de *E. coli* ECEH carne. En quesos se identificaron 5 *S. Enteritidis*, 3 *S. Typhi*, 1 *S. Typhimurium* y 6 cepas de *E. coli* ECEH.
5. En las muestras de carne se encontró que la presencia de enterobacterias es alta del 70%, donde el 41% era *Salmonella sp.* y el 29% de *E. coli*, la frecuencia de *Salmonella* fue del 34% y del 28% para *E. coli*.
6. En las muestras de quesos se encontró que el 73% de las muestras analizadas fueron positivas a enterobacterias, donde el 38% fueron *Salmonella sp.* y el 35% son *E. coli*.
7. La frecuencia de estos patógenos entéricos es alta en productos que se expenden en mercados de abasto popular, donde juega un papel muy importante la falta de buenas prácticas de producción, higiene y manejo en toda la cadena de producción y distribución de estos alimentos.

9 *Perspectivas*

Realizar la búsqueda de toxinas Termoestable y termoresistente de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) directamente de la muestra.

Realizar la estandarización de un PCR multiplex para detectar *E. coli*, *Salmonella tiphy*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus*.

Capacitar y orientar a los productores, distribuidores y comerciantes de carne y queso sobre los cuidados y medidas a tomar para garantizar la inocuidad de sus productos para así disminuir la incidencia de ETA.

Referencias

1. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP, González AMC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*; pg. 42:490-495. 2000
2. SAGARPA Campañas Zoosanitarias, Campaña Nacional contra Hitchins, A.D.; et-al. *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. En Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual*. AOAC International, 8ª Edición, Revisión A, Estados Unidos, pág. 4.01-4.06, 4.11-4.13. 1998.
3. Hitchins, A.D. *Listeria monocytogenes*. En Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual*. AOAC International, 8ª Edición, Revisión A, Estados Unidos, pág. 10.01-10.11. 1998.
4. Begum, Y. A., K. A. Talukder, G. B. Nair, F. Qadri, R. B. Sack, and A. M. Svennerholm. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. *J Clin Microbiol* 43:3582-3. 2005.
5. Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, R. Thompson-Bonilla, M. Abonce, D. Lopez-Hernandez, J. I. Santos, J. L. Rosado, H. L. DuPont, and K. Z. Long. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 47:93-98. 2009.
6. Food and Drug Administration (FDA). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Enterotoxigenic Escherichia coli*. 2009.
7. Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-40. 2004.
8. Lothigius, A., A. Janzon, Y. Begum, A. Sjoling, F. Qadri, A. M. Svennerholm, and I. Bolin. Enterotoxigenic *Escherichia coli* is detectable in water samples from an endemic area by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 104:1128-36. 2008.

9. Nguyen, T. V., P. Le Van, C. Le Huy, K. N. Gia, and A. Weintraub. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 43:755-60. 2005.
10. Sjolting, A., G. Wiklund, S. J. Savarino, D. I. Cohen, and A. M. Svennerholm. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. J Clin Microbiol 45:3295-301. 2007.
11. Torres V. Ma. Agentes patogenos transmitidos por alimentos volume 1 ultima edición. Universidad de Guadalajara 2003. Pg 65-86, 175-178, 185-200
12. Abigail A. and Dixie D. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach 2° ed. ASM PRES. Pg. 381-392, 407-411, 411,412, 416, 417. 2002.
13. Vázquez N. Tesis Clonación y caracterización de los genes que expresan una enterotoxina similar a LT en *Salmonella gallinarum*. pg. 5-12 2003
14. Lennete E.. La salmonelosis aviar. México D.F. 2003. Microbiología Clínica . 3^{era} edición . Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1982
15. Koneman, E. Allen, V.; Dowel, V.; Sommers H.(ed); Diagnostico Microbiológico 3^a edición Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana. 1998
16. Guerra H. Microbiología Mecanismos de las enfermedades infecciosas Enfoque mediante resolución de problemas. 2da Edición. Editorial medica panamericana. Pg.284-301. 1994
17. Clarke C. Patogénesis of bacterial infections in animals. 2^a edition Ed. University Press/HMES , USA pg. 134-150. 1995
18. ACHA N. "Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales". 2° Edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington pg. 158-165. 1990
19. Howard Ochman, Genes lost and genes found. Evolution of bacteria pathogenesis and symbiosis science 292:5519. may11 2001
20. Groisman EA, Blnac-Potard AB, UchiyaK. Pathogenicity island and the evolution of salmonella virulence. Pathogenicity islands and other mobile

virulence elements Edited by Kaper and Hacker . AMS, Washington , D.C. pg. 127-150. 1999

21. Tenover FC, Robert A. Arbeit Md. Guerin RV. How to select and interpret Molecular Strain Methods for Epidemiological Studies of bacterial Infections :An Review for Health Care Epidemiology and Control and Hosp. Epidemiology; pg426-439. 1997
22. Swaminathan B. Matar GM. Molecular typing Methods: definition applications and advantages, in Persing DH , Smith TF , Tenover FC, White TJ, eds Diagnostic Molecular Microbiology Principles and applications Washington DC. American Society for Microbiology; pg. 26-50. 1993
23. WHO Global Salm-Surv South America Working Group, WHO Global Salm-surv. A WHO global salm-surv Retrospective study Examining Salmonella serotypes in South America, 2000: Dominance of Salmonella serotype Enteritidis International conference of Emerging Infectious Diseases , Atlanta, 2000.
24. Adams, M.R. y Moss, M.O. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, 2ª Edición, Reino Unido, págs. 370-373, 377-380. 2005
25. American Proficiency Institute, Folder con Instrucciones Generales para el: Food Microbiology Proficiency Testing Program 2007 1st Test Event
26. Andrews, W.H., et-al. *Salmonella*. En Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. AOAC International, 8ª Edición, Revisión A, Estados Unidos, págs. 5.01-5.15. 1998.
27. Food Safety Magazine. Food Safety Insider: Solutions in Rapid Microbiology; The Real Cost of Testing for *Salmonella*. Food Safety Magazine. Junio/Julio 2006: 44. 2006.
28. Jay, J.M.; Loessner, M.J.; y Golden, D.A. Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and *Shigella*, Salmonellosis. En Jay, J.M.; Loessner, M.J.; y Golden, D.A. Modern Food Microbiology, Food Science Text Series, 7ª Edición, Estados Unidos, págs. 619-631. 2005.
29. Calva, E. Microbios. In UNAM. (ed.), *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. 2009.

30. Terragno R., Caffer M., Bruno S. Manual de procedimientos *Salmonella* Aislamiento, identificación y serotipificación. Global Salm-Surv of the World Health Organization, Department CSR. 2005
31. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número Más Probable.
32. NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método Para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.
33. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método Para la Determinación de *Salmonella* en Alimentos.
34. NOM-033-ZOO-1995 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres Bienes y servicios. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Especificaciones sanitarias.
35. NOM-120-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
36. NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, maduros y procesados. Especificaciones sanitarias.
37. NOM-091-SSA1-1994 Leche pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias.
38. NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
39. Organización Panamericana de la salud Organización Mundial de la Salud, XI reunión interamericana de salud animal a nivel ministerial, 1999

Anexos

AGAR NUTRITIVO

Formulación en gramos por litro de agua destilada

Agar	15.0g
Extracto de carne de res	3.0g
Peptona de gelatina	5.0 g

pH 6.8±0.2

AGAR DE MAC CONKEY

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	13.5	Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0	Peptona especial	3.0
Cristal violeta	0.001	Peptona de gelatina	17.0
Lactosa	10.0	Rojo neutro	0.03

pH 7.1 ± 0.2

AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	13.5	Peptona especial	5.0
Citrato férrico de amonio	1.0	Rojo neutro	0.025
Citrato de sodio	8.5	Sales biliares	8.5
Extracto de carne	5.0	Tiosulfato de sodio	8.5
Lactosa	10.0	Verde brillante	0.00033

pH 7.0 ± 0.2

BASE DE CALDO TETRATIONATO

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Carbonato de calcio	10.0	Sales biliares	1.0
Peptona especial	5.0	Tiosulfato de sodio	30.0

SOLUCION DE YODO

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

AGUA PEPTONADA AMORTIGUADA

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Cloruro de sodio	5.0	Fosfato dipotásico	1.5
Peptona	10.0	Fosfato disódico	9.0

pH 7.2 ± 0.2

AGAR XLD

(XILOSA – LISINA – DESOXICOLATO)

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	13.5	L-Lisina	5.0
Citrato férrico de amonio	0.8	Rojo de fenol	0.08
Cloruro de sodio	5.0	Sacarosa	7.5
Desoxicolato de sodio	2.5	Tiosulfato de sodio	6.8
Extracto de levadura	3.0	Lactosa	7.5
Xilosa	3.5		

pH 7.4 ± 0.2

AGAR EC
FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Cloruro de sodio	5.0	Lactosa	5.0
Fosfato dipotásico	4.0	Sales biliares	1.5
Fosfato monopotásico	1.5	Peptona biotriptasa	20.0
Agar	13.5		

pH 6.9 ± 0.2

AGAR RV
(RAPPAPORT Y VASSILIADIS)
FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Cloruro de magnesio hexahidratado	29.0	Peptonade caseína	4.0
Cloruro de sodio	8.0	Peptona de soya	1.0
Fosfato monopotásico	0.4	Agar	13.5
Verde de malaquita	0.036		

pH 5.2 ± 0.2

MEDIO DE MANTENIMIENTO

Fórmula por litro de agua

Componente	gramos	
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

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 bromofenol .0.05%

EDTA 12Mm

pH 8

GEL DE AGAROSA 1%

Agarosa 1.0g

TAE 1X 100ml