



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

**AISLAMIENTO, SEROTIPIFICACIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE
Salmonella spp. EN CARNE DE RES, EN LAS CIUDADES DE MÉXICO Y GUADALAJARA**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
NAYARIT EMÉRITA BALLESTEROS NOVA

TUTORA

Dra. María de la Salud Rubio Lozano
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rubén Danilo Méndez Medina
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química UNAM

MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme vida e inteligencia.

A mis padres, por hacerme quien soy y apoyarme para que pueda cumplir mis metas.

A toda mi familia por creer en mí y brindarme su cariño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por formarme profesionalmente.

A mi asesora, la Dra. María de la Salud Rubio Lozano, por su apoyo y confianza.

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y al Dr. Danilo Méndez Medina, miembros de mi comité tutor, por sus valiosas recomendaciones para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Enrique Delgado Suarez, por sus consejos y asesoría científica.

Al Dr. Oscar Rodas por su apoyo en la realización de mi trabajo experimental. A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.

Al MVZ. Jorge de la Garza, por su apoyo en la realización de la confirmación molecular de mis aislados.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Generalidades sobre <i>Salmonella</i>	15
2.2. División taxonómica de las Salmonelas	16
2.3. Características bioquímicas del género <i>Salmonella</i>	18
2.4. Patogenia de la salmonelosis	21
2.5. <i>Salmonella</i> : mecanismos de patogenicidad y virulencia	23
2.6. Incidencia de la salmonelosis en el mundo	26
2.7. La carne como vector de <i>Salmonella</i>	27
2.7.1. <i>Incidencia de <u>Salmonella</u> en cárnicos en México</i>	28
2.8. Perfil de resistencia a antimicrobianos y riesgos asociados	30
2.8.1. <i>Estudios sobre casos encontrados de <u>Salmonella</u> resistente a antibióticos en carne</i>	34
2.8.1.1. <i>Perfiles de resistencia a antibióticos de Salmonelas aisladas de carne, productos cárnicos y subproductos en México</i>	37
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
4. OBJETIVOS	41
5. METODOLOGÍA	42
5.1. Diseño del experimento	42

5.2.	Selección de puntos de venta	42
5.3.	Criterios generales para la selección de muestras de carne	43
5.4.	Muestreo	43
5.5.	Análisis microbiológico	44
5.5.1.	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	44
A.	Preenriquecimiento	44
B.	Enriquecimiento selectivo	46
C.	Aislamiento selectivo y diferencial	50
D.	Medios para pruebas bioquímicas	53
5.6.	Preparación de las muestras	56
5.7.	Pruebas bacteriológicas	57
5.7.1.	<i>Aislamiento de <u>Salmonella</u> spp.</i>	57
5.7.2.	<i>Problemas de diagnóstico diferencial</i>	65
5.7.3.	<i>Identificación morfológica</i>	68
5.8.	Confirmación molecular	69
5.9.	Preservación de aislados	70
5.10.	Serotipificación	71
5.11.	Resistencia a antibióticos	74
5.12.	Análisis de resultados	77
6.	RESULTADOS	78

6.1.	Identificación de microorganismos del género <u>Salmonella</u>	78
6.1.1.	<i>Muestreo en la Ciudad de México</i>	78
6.1.2.	<i>Muestreo en la Ciudad de Guadalajara</i>	83
6.1.3.	<i>Confirmación molecular</i>	85
7.	DISCUSIÓN	89
8.	BIBLIOGRAFÍA	95

INDICE DE CUADROS

	Página
2.3.1. Descripción de las principales características bioquímicas que diferencian a <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> de otras Salmonelas	19
5.5.1.1. Características de las colonias en medios selectivos y diferenciales	51
5.7.2.1. Caracteres bioquímicos diferenciales entre <i>Salmonella</i> subsp. <i>enterica</i> (I) y <i>Proteus mirabilis</i>	65
5.7.2.2. Caracteres bioquímicos diferenciales entre <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I) y <i>Citrobacter freundii</i>	66
5.7.2.3. Caracteres bioquímicos diferenciales entre <i>Salmonella</i> subsp. <i>enterica</i> IIIa y IIIb y <i>Citrobacter freundii</i>	67
5.7.2.4. Caracteres bioquímicos diferenciales entre <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I), <i>Edwardsiella tarda</i> y <i>Esherichia coli</i> SH2 +	68
5.10.1. Lista de los antibióticos que fueron testados en el experimento	76
6.2.1.1. Perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de <i>Salmonella</i> spp., aislados en la Ciudad de México	81
6.2.2.1. Perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de <i>Salmonella</i> spp., aislados en la Ciudad de Guadalajara	85

INDICE DE FIGURAS

	Página
2.4.1. Modo de transmisión de la salmonelosis	23
2.5.1. Efectores proteicos en el proceso de inducción de invaginación de <i>Salmonella</i>	25
5.5.1.1. Botes lecheros de 500 ml con caldo lactosado	46
5.5.1.2. Agares LIA y TSI en “pico de flauta”	54
5.6.1. Homogeneización de la muestra usando guantes estériles	56
5.7.1.1. Aislamiento e identificación bioquímica de <i>Salmonella</i> spp. en carne molida	58
5.7.1.2. Colonias presuntivas de <i>Salmonella</i> en agar XLD	60
5.7.1.3. Colonias presuntivas de <i>Salmonella</i> en agar SS	61
5.7.1.4. Características bioquímicas de <i>Salmonella</i> en agar TSI	63
5.7.1.5. Características bioquímicas de <i>Salmonella</i> en LIA	64
5.7.1.6. Prueba negativa (sin color) y prueba positiva (rosa mexicano) a la ureasa	64
5.8.1. Preservación de cepas puras en Agar Soya Trypticaseína con aceite mineral estéril	70
5.9.1. Proceso de serotipificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp. por el esquema de Kauffmann- White	72
5.10.1. Susceptibilidad a antibióticos con sensidiscos por el método de Kirby-Bauer	75
5.10.2. Cada antibiótico se probó por duplicado, para tener mayor margen de confiabilidad	75

5.10.3. Medición del halo de inhibición de un grupo de antibióticos en aislados de <i>Salmonella</i> spp.	77
6.2.1.1. Porcentaje de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de carne de res molida en la Ciudad de México	79
6.2.1.2. Porcentaje de cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas en la Ciudad de México, en cada uno de los lugares de muestreo	82
6.2.3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de <i>Salmonella</i> spp., mediante el gen <i>invA</i> . Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 4= S23 (+), 5= S4 (+), 7= S15 (+), 8= S7 (+), 11= S9 (+), 13= S10 (+), 14= S1 (+)	85
6.2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de <i>Salmonella</i> spp., mediante el gen <i>invA</i> . Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 3= Control negativo <i>E. coli</i> (EHEC), 4= S2 (+), 5= S3 (+)	86
6.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de <i>Salmonella</i> spp., mediante el gen <i>invA</i> . Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 3= S22 (+), 4= 18S (+), 7= S13 (+), 8= S8 (+), 9= S19 (+), 10= S17 (+)	87

6.2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de *Salmonella* spp., mediante el gen *invA*. Perfiles: 1= S6 (+), 5= S11 (+), 7= S20 (+), 8= S21 (+), 9= S12 (+), 10= Marcador de Peso Molecular (1 kb), 11= Control + (*Salmonella* spp.), 12= S14 (+), 14= S16 (+), 17= S15 (+), 18= S5 (+), 19= S4 (+) y 20= Control de Reacción (sin ADN)

88

RESUMEN

La carne para consumo humano puede contaminarse con *Salmonella enterica*, al estar en contacto con contenido intestinal durante la matanza. Diversos serotipos de *Salmonella* spp. han desarrollado resistencia a los antibióticos; lo anterior derivado del uso desmedido de antibióticos en animales y humanos, complicando así la terapéutica de la enfermedad. El objetivo de esta investigación es determinar los serotipos de *Salmonella* spp. prevalentes en carne de bovino de las ciudades de México y Guadalajara, así como determinar su susceptibilidad a un grupo de 14 antibióticos. Para ello, se tomaron muestras de carne de res molida en tiendas de autoservicios, mercados públicos y tianguis de las ciudades de Guadalajara y la Ciudad de México. El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó según los procedimientos descritos en la norma oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994. El perfil de resistencia a antibióticos se realizó por el método de sensi-discos de Kirby-Bauer, de acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés). Se confirmó la identidad de *Salmonella* por detección del gen *invA*, mediante PCR. Además, se realizó la serotipificación de los aislados por el esquema de Kauffman-White. Los resultados muestran una prevalencia de *Salmonella* spp. del 16% (16/100) en la Ciudad de México, con el 73.7% de las cepas multirresistentes; y del 8% (4/50) de prevalencia en la Ciudad de Guadalajara, con 25% de las cepas mostrando multirresistencia a los antibióticos probados. El perfil de resistencia que se observó con más frecuencia incluyó a los beta-lactámicos, sulfas, tetraciclinas y aminoglucósidos. Del total de aislamientos obtenidos, 3 de ellos fueron resistentes a 5 grupos de antibióticos o más. Los serotipos encontrados fueron: Derby, Lomita, Javiana, Senftenberg y Cannstatt. Los aislados de *S. Senftenberg* fueron resistentes hasta a 6 grupos diferentes de antibióticos. La prevalencia de *Salmonella* spp. en México fue mayor a la reportada por otros países y similar a otros estudios efectuados en carne cruda en México. La presencia de serotipos de *Salmonella* multirresistentes a los antibióticos probados, evidencia la necesidad de vigilar la

contaminación por *Salmonella* durante toda la cadena productiva. La modificación a la Ley General de Salud (LGS) y a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-061-ZOO-1999 y NOM-004-ZOO-1994) ayudaría a disminuir el riesgo en el país, de seguir desarrollando cepas de *Salmonella* multirresistentes a antibióticos.

Palabras clave: serotipos de *Salmonella*; carne de res; resistencia a antibióticos

ABSTRACT

The meat for human consumption can be contaminated with *Salmonella enterica* during slaughter, if it comes into contact with intestinal contents. Increasing antimicrobial resistance in varied serotypes of *Salmonella* species has been a serious problem for public health worldwide. The above derived from the excessive use of antibiotics in animals and humans. This research is aimed to determine the serotypes of *Salmonella* spp. prevalent in ground beef sold in two major Mexican cities, well as their susceptibility to a group of 14 antibiotics. For this purpose, samples of ground beef were taken in butcher shops, supermarkets, public markets and street markets of Guadalajara city and Mexico City. The isolation of *Salmonella* spp. was performed according to the procedures described in the Mexican official standard NOM-114-SSA1-1994. The antibiotic resistance profile was carried out by the Kirby-Bauer method, in accordance with the interpretation criteria proposed by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Amplification of chromosomal DNA of the isolates using Polymerase Chain Reaction was carried out. There was amplification indicating the presence of *invA* gene at a position of 288 bp. Moreover, we use the Kauffman-White scheme for the serotyping of isolates. The results showed a prevalence of 16% (16/100) of *Salmonella* spp. in ground beef from Mexico City. Of the isolates, 73.7% were multidrug-resistant strains. On the other hand, *Salmonella* spp. prevalence in Guadalajara was 8% (4/50) while 25% of these strains were multi-drug resistant. We observed that the most frequent included beta-lactamics, tetracycline, amynoglucosides and sulfa. The serotypes found were: Derby, Lomita, Javiana, Senftenberg and Cannstatt. Isolates of S. Senftenberg were resistant to up to 6 different groups of antibiotics. The prevalence of *Salmonella* spp. in Mexico was higher than that reported by other countries and similar to other studies in meat in Mexico. The presence of multidrug-resistant *Salmonella* serotypes, highlights the need to monitor *Salmonella* contamination throughout the food production chain. The modification of the General

Health Law and the Mexican Official Standards (NOM-061-ZOO-1999 and NOM-004-ZOO-1994) help to reduce the risk to develop multidrug resistant *Salmonella* strains.

Keywords: *Salmonella* serotypes; ground beef; multidrug resistance

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son un problema de salud pública en todo el mundo y han estado relacionadas con prácticas inadecuadas durante la matanza, procesamiento y empaque de los productos para su venta. La salmonelosis no tifoidea es una de las principales zoonosis transmitidas por alimentos a escala global. La carne cruda es un importante vector para la transmisión de este patógeno, al ser un medio de cultivo que queda expuesto a múltiples microorganismos del tracto gastrointestinal (Forsythe, 2010). En la actualidad, la presencia de cepas de *Salmonella* multirresistentes ha complicado la terapéutica de esta enfermedad, con el alto riesgo que ello implica para la salud pública. Lo anterior se deriva del uso indiscriminado de antibióticos en producción animal, lo que ha provocado el surgimiento de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos, tales como *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* DT104, que son las que se estima han causado más ETA's durante los últimos 20 años en el mundo (Pond et al., 2010).

Los serotipos de *Salmonella* spp. aislados más frecuentemente en México son: Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Gutiérrez, 2000; Hernández, Aguilera y Castro, 2011). Aunque los servicios de salud han reportado estos serotipos como agentes causantes de gastroenteritis, se desconoce el alimento con el que los mismos están asociados, así como su perfil de resistencia a antibióticos. El objetivo de este estudio es generar información, sobre prevalencia y principales serotipos de *Salmonella* presentes en la carne de res que se expende en el mercado mexicano, así como sobre su perfil de resistencia a antibióticos expresado fenotípicamente.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades sobre *salmonella*

Salmonella es un bacilo Gramnegativo perteneciente al grupo III de la clasificación del Manual de Bergey (proteobacterias quimiorganotrófas aerobias o anaerobias facultativas), a la Superfamilia RNAr I (De Ley, 1978) y al género *Salmonella* familia Enterobacteriaceae del grupo de las Gammaproteobacterias (Woese, 1987). 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 (Caffer y Terragno, 2001).

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica, a excepción de *S. Typhi* y los serotipos paratíficos que son especie-específicos para el hombre (Acha y Szyfres, 1997). Dicha enfermedad se manifiesta con un cuadro clínico de gastroenteritis.

Desde el punto de vista epidemiológico *Salmonella* spp. se puede clasificar en tres grupos (Caffer y Terragno, 2001) :

- a) Las que no 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. Se encuentran en los animales, el hombre y el medio ambiente.
- b) Las que infectan sólo al hombre: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* y *Salmonella Paratyphi C*, que se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra; estas no son zoonosis.
- c) Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: *S. Abortusovis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves. Circunstanalmente pueden producir infección en el hombre, entre ellas, *Salmonella* Dublín y *Salmonella Choleraesuis*.

2.2. División taxonómica de las Salmonelas

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo que tiene dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última incluye a seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. Las Salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* y son consideradas serovares. Por lo que la nomenclatura que se está manejando actualmente es *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi, *S. enterica* serovar Typhimurium (Knudsen et al., 2012; Figueroa y Verdugo, 2005). *Salmonella enterica* está dividida en las siguientes subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (subespecies I), *S. enterica* subsp. *salamae* (subespecies II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subespecies IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subespecies IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (subespecies IV), y *S. enterica* subsp. *indica* (subespecies VI). Las cepas de *S. enterica* subsp. I son usualmente aisladas de humanos y animales de sangre caliente (Agasan et al., 2002).

Salmonella enterica se puede diferenciar en más de 2,610 serotipos (Guibourdenche et al., 2010) según el esquema clásico de Kauffman-White basado en las propiedades de aglutinación de antígenos somáticos (antígenos O), antígenos de la cubierta (antígenos capsulares K), antígeno capsular polisacárido Vi (cuya presencia impide la aglutinación de los antígenos O con anticuerpos específicos), antígenos proteicos de superficie (Pili) y antígenos flagelares (antígenos H) (Popoff, Bockemuhl y Gheesling, 2003). El “Esquema de Kauffmann-White”, es publicado por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Referencia e Investigación de *Salmonella* del Instituto Pasteur en París, y agrupa todas las serovariedades de *Salmonella* sp. conocidas (Popoff y Le Minor, 1992; Grimont y Weill, 2007). Los antígenos se identifican con anticuerpos monovalentes y polivalentes disponibles comercialmente, mediante pruebas de aglutinación en lámina. Para identificar los antígenos O, se hace una prueba con antisueros contra los grupos del O1 (A) al O67, luego se prueba el antisuero Vi para

antígeno capsular, y por último se incluyen los antisueros contra los antígenos flagelares H (Jawetz, et al., 2007).

La mayoría de los más de 2,500 serotipos de *Salmonella* pertenecen a *S. enterica* subsp. I (*S. enterica* subsp. *enterica*). Dentro de *S. enterica* subsp. I, los serogrupos "O" más comunes son A, B, C1, C2, D y E. Los serotipos de *S. enterica* subespecie II (*S. enterica* subsp. *salamae*), IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*), IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), IV (*S. enterica* subsp. *indica*), y *S. bongori* por lo general son aislados de animales de sangre fría y del medio ambiente, pero rara vez a partir de seres humanos (Popoff y Le Minor, 1997). La especificidad del factor "O" (somático) de *Salmonella* spp. se determina por la composición y la estructura de la cadena polisacárida "O" del lipopolisacárido.

Hay situaciones epidemiológicas en las que es preciso afinar aún más la diferenciación dentro del serotipo correspondiente, para tal fin se utiliza la fagotipificación, sobre todo para las cepas causantes de epidemias en el hombre (Figueroa y Verdugo, 2005). La utilización de la fagotipificación para propósitos epidemiológicos se basa en asumir que los aislamientos que pertenecen al mismo fagotipo tienen relación epidemiológica entre sí, lo que permite determinar el origen de un brote epidémico (Martínez, Navarrete y Zeckua, 2004). La presencia de cápsula y flagelo en *Salmonella* depende de cada especie en particular, solamente *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi C y *S. enterica* serovar Dublín, presentan cápsula y todas las *Salmonellas* se consideran móviles a excepción de *S. enterica* serovar Gallinarum y *S. enterica* serovar Pullorum (Espinal et al., 2005). La mayoría de cepas de *Salmonella* son móviles por medio de flagelos peritricos, que pueden ser codificados por dos diferentes genes cromosómicos de flagelina (fliC y fljB); regulados por mecanismos de variación de fase. La *Salmonella* bifásica puede expresar ambos genes (Moreno et al., 2009).

2.3. Características bioquímicas del género *Salmonella*

El aislamiento del género *Salmonella* se basa en la capacidad que tiene la bacteria de utilizar o no determinadas sustancias químicas o crecer en determinados sustratos (Cuadro 2.3.1.).

Cuadro 2.3.1. Descripción de las principales características bioquímicas que diferencian a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de otras Salmonelas

Características bioquímicas de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	Otras subespecies de Salmonelas y excepciones en serovares (I)
No fermenta lactosa***.	Las subespecies <i>arizonae</i> y <i>diarizonae</i> son positivas a esta prueba.
No fermenta amigdalina.	
Fermenta melobiosa	A excepción de los serotipos Gallinarum y Pullorum.
No fermenta sacarosa.	
Fermenta ramnosa.	A excepción del serovar Typhi.
Fermenta sorbitol.	A excepción de los serovares Gallinarum y Pullorum.
No fermenta inositol.	
No fermenta manitol.	
Fermenta glucosa.	
Fermenta arabinosa.	A excepción de <i>Salmonella</i> Typhi y Cholerasuis.
No produce indol.	
Fermenta sacarosa.	
Fermenta arabinosa.	
No hidroliza la gelatina****.	
Test de Voges-Proskauer negativo*.	
No produce Triptófano Desaminada (TDA).	

No produce ureasa**.	
Produce ácido sulfhídrico (H ₂ S).	
Utiliza el citrato**.	A excepción de <i>Salmonella</i> ser. Gallinarum, Pullorum, Typhi y Paratyphi A.
Produce Ornitina Descarboxilasa (ODC)**.	A excepción de <i>Salmonella</i> Typhi.
Produce Lisina Descarboxilasa (LDC)**.	<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A es negativa a esta prueba.
No produce β-galactosidasa.	La subespecie <i>arizonae</i> es positiva a esta prueba.
No produce Arginina Dihidrolasa (ADH)**.	La subespecie <i>arizonae</i> es positiva a esta prueba. Algunos serotipos de <i>Salmonella</i> spp. pueden ser positivos a esta prueba; al igual que <i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A.
No produce citocromo oxidasa.	
Crece en presencia de selenito de sodio con o sin L-cistina como agente reductor de la toxicidad del selenito.	
Crece en presencia de verde brillante, desoxicolato de sodio, azul de metileno, tetracionato y sales biliares.	
Crece en presencia de verde malaquita, a pH bajo (5,1 ± 0,2) y alta presión osmótica.	

*Lectura a los 2 días; ** Lectura hasta los 4 días; *** Lectura hasta los 7 días; **** Lectura hasta los 30 días

Fuente: BAM, 1998; Manual API 20E (bioMérieux®); Caffer y Terragno, 2001.

2.4. Patogenia de la salmonelosis

Fuente de infección y modo de transmisión

Salmonella es una bacteria que vive en el tracto digestivo de humanos y animales, al salir al exterior en las heces puede causar enfermedad al ingresar al tracto digestivo del hospedero por vía oral. Esta contaminación fecal-oral se puede producir por alimentos o agua contaminada (Figuroa y Verdugo, 2005).

El proceso de extraer el tracto digestivo durante la matanza de los animales puede provocar una contaminación cruzada durante los procesos de manejo, procesamiento, preparación y distribución de los alimentos (Madigan, Martinko y Parker, 2003). Las personas pueden adquirir salmonelosis por el consumo de alimento contaminado o por la convivencia y manejo de animales, el microorganismo puede alcanzar el alimento por contaminación fecal de las personas que lo manipulan (Mead et al., 1999; Plym y Wierup, 2006). Los animales de producción pueden albergar serotipos de *Salmonella* que son patógenos para el hombre y pueden pasar la bacteria a los alimentos como huevos, carnes y productos lácteos (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

La transmisión de *Salmonella* por ingestión de alimentos provenientes de animales infectados, incluye huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carnes y sus derivados; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral (especialmente pollo y pavo). También se han informado brotes por el consumo de frutas, jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas. Otra fuente de contaminación son las mascotas (tortugas, iguanas y pájaros) y los productos farmacéuticos de origen animal no esterilizados. La infección también se transmite a los animales de granja a través de sus alimentos y de fertilizantes elaborados con harinas de carne, de pescado y de huesos contaminados (Caffer y Terragno, 2001).

Síntomas

Las bacterias del género *Salmonella* causan en el hombre una gastroenteritis aguda, con cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación puede ser grave sobre todo en menores de 1 año, ancianos e inmunocomprometidos. Aunque la morbilidad por salmonelosis es elevada, la mortalidad es baja, excepto, en niños de corta edad, ancianos e inmunocomprometidos. La infección que comienza con una diarrea aguda puede continuar hacia una infección focal o septicemia. Tiene un período de incubación de 6 a 72 horas, generalmente entre 12 a 36 horas y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 horas. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^8 microorganismos. La transmisión que oscila entre varios días a varias semanas, ocurre durante toda la evolución de la infección. El estado de portador temporal puede persistir varias semanas, especialmente en lactantes y es raro el de portador crónico (de más de un año) (Caffer y Terragno, 2001). La gastroenteritis (diarrea, dolor abdominal y fiebre) es la presentación clínica más común de la salmonelosis transmitida por alimentos con una duración de 4-7 días, en algunos casos *Salmonella* puede producir infecciones invasivas que pueden derivar en sepsis y muerte (Madigan, Martinko y Parker, 2006).

Ciclo de transmisión

Generalmente es la salmonelosis no tifoidea la que se contagia vía fecal-oral de los alimentos al hombre o a los animales, es una zoonosis y una antropozoonosis.

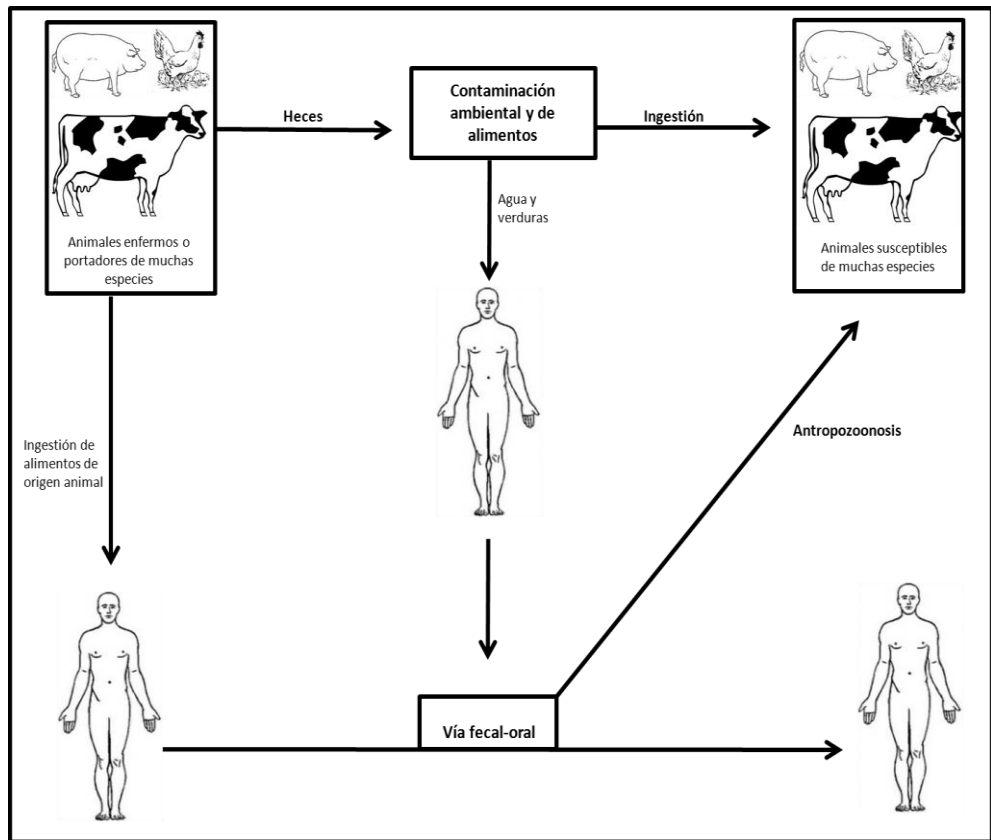


Figura 2.4.1. Modo de transmisión de la salmonelosis
Adaptación de Acha y Szyfres, 1997

2.5. *Salmonella*: mecanismos de patogenicidad y virulencia

Mecanismos de patogenicidad

Salmonella spp. ha ido adaptándose para sobrevivir dentro del huésped, generando una variedad de mecanismos para colonizar, invadir, replicarse y sobrevivir, causando en todo este proceso daño a su portador (Espinal et al., 2005). La bacteria posee información genética que le permite ingresar y sobrevivir en su hospedero. *Salmonella* ingresa al aparato digestivo vía oral, al llegar al estómago e intestinos expresa diversas proteínas (RpoS σ -factor, PhoPQ y Fur) con el fin de

sobrevivir al pH intestinal y a las bacteriocinas de la microbiota normal (Bearson, Wilson y Foster, 1998); al llegar a ciego y colon se adhiere mediante adhesinas, entre las adhesinas más importantes en *Salmonella* están las proteínas (Fim, Lpf, y Pef) asociadas a la fimbria Tipo 1 (Althouse et al., 2003; Darwin y Miller, 1999; Duncan et al., 2005); además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citosinas (Edwards y Puente, 1998; Espinal et al., 2005). *Salmonella* también secreta bacteriocinas, por medio de un sistema de secreción tipo III (TS3S), regulado por la isla de patogenicidad tipo I (SPI-1); con el fin de eliminar parte de la microbiota indígena y poder invadir el epitelio (Foley y Lynne, 2008).

Para invadir los tejidos del huésped, *Salmonella* es capaz de inducir un proceso de invaginación bacteriana por la célula del epitelio intestinal; en este proceso intervienen proteínas efectoras como Sip, Sop y InvJ (Hueck et al., 1995; Kaniga et al., 1995). Los efectores proteicos más importantes son llamados: SipA, SopE, SopE2 y SopB (Figura 2.5.1.); son secretados por el TS3S codificado en el gen *invA* de la SP-1 y se unen a los filamentos de actina de la célula del huésped para facilitar la entrada de *Salmonella*, además atraen a neutrófilos y macrófagos al sitio de infección (Rottner, Stradal y Wehland, 2005; Espinal et al., 2005; Figueroa y Verdugo, 2005).

Al aumentarse la quimiotaxis a polimorfonucleares en el sitio de la infección, la *Salmonella* es fagocitada y escapa de la digestión lisosomal; induce la liberación de proteínas formadoras de filamentos (SIF) codificadas en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) y excretadas por un TS3S, que evitan la formación del complejo fagolisosomal y proveen nutrición a la *Salmonella* dentro de la vacuola, contribuyendo a la replicación intracelular (Foley y Lynne, 2008; Asheg et al., 2003).

Salmonella typhimurium

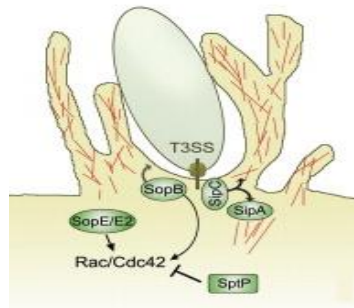


Figura 2.5.1. Efectores proteicos en el proceso de inducción de invaginación de *Salmonella* (Rottner, Stradal y Wehland, 2005)

Mecanismos de virulencia

Las bacterias Gram negativas como la *Salmonella*, presentan factores de virulencia codificados cromosómicamente, el más importante es el lipopolisacárido y principalmente el Lípido A, el cual es endotóxico y causa los síntomas entéricos característicos de la salmonelosis (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

Otros factores importantes de virulencia se encuentran codificados en porciones de ADN extracromosomal conocidos como plásmidos. Entre los plásmidos de más importancia en *Salmonella* se encuentran los plásmidos R que contienen genes de resistencia a antibióticos y a otros inhibidores del crecimiento. La transmisión horizontal de fragmentos de ADN que codifican para factores de virulencia puede ocurrir mediante elementos móviles como islas de patogenicidad, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción (Ochman, Lawrence y Groisman, 2000). Hasta ahora, se han descrito 19 islas de patogenicidad para *Salmonella* spp., algunas de ellas son conservadas por todos los serotipos del género, pero algunas son específicas de ciertos serotipos (Velge, Cloeckert y Barrow, 2005).

2.6. Incidencia de la salmonelosis en el mundo

Durante el 2005, *Salmonella* correspondió al 51.6% de los reportes de zoonosis en los Estados Unidos. Un total de 176,395 casos de salmonelosis humana fueron reportados por 24 estados miembros de la Unión Europea durante el 2005, siendo la carne de ave, cerdo y oveja las más afectadas (Denny et al., 2005). Estudios preliminares del Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en el 2008 muestran que *Salmonella* está contabilizada en el 40% de los casos de ETA's confirmados por laboratorio, basándose en datos de 10 estados norteamericanos (CDCP, 2009; Foley et al., 2011).

Las infecciones por *Salmonella enterica* son un significativo problema de salud pública, con un estimado de 1,028 millones de casos, 19,000 hospitalizaciones y 400 muertes en los Estados Unidos cada año (Scallan et al., 2011; Foley et al., 2011).

Las serovariedades más comunes asociadas con infecciones entéricas en humanos en los Estados Unidos son *Salmonella enterica* serovariedades: Typhimurium, Enteritidis, Newport y Heidelberg (CDC, 2008). El CDC publicó en el 2006 que se aislaron 41,000 casos de salmonelosis, siendo *S. Enteritidis* una de las causas más comunes de enfermedad entérica con un 16.6% de los casos. Más recientemente la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (CDCP, por sus siglas en inglés) reportó que *S. Enteritidis* causó el 19.2% de todas las infecciones de *Salmonella* en el 2009 (CDCP, 2009).

En un estudio realizado en México en el periodo de 1972-1999, se aislaron 24,934 cepas de *Salmonella* recuperadas de pacientes infectados en diversos centros de salud públicos y privados de la República Mexicana. Se identificaron 199 serotipos distintos, dentro de los cuales *S. Typhimurium* se detectó en 3,225 ocasiones, *Salmonella* Newport en 865, *Salmonella* Anatum en 608, *S. Infantis* en 326 y *S. Ohio* en 61 ocasiones (Gutiérrez et al., 2000).

2.7. La carne como vector de *salmonella*

Los productos cárnicos como pasteles de carne, salchichas curadas pero crudas, derivados de carne de pollo y leche, suelen estar relacionados con brotes de *Salmonella* (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

En el 2005 en Dinamarca, se estimó el número de infecciones humanas por salmonelosis, atribuidas a varios productos animales. La carne estuvo implicada en el 20 al 50% de todos los casos humanos de salmonelosis. La carne de cerdos criados domésticamente, tuvo la prevalencia más alta de *Salmonella* spp. (9.0-15.7%), al igual que la carne de gallina importada (8.6-13.4%). En el total de los productos animales, los huevos y productos que contiene huevo representaron el 11% de los casos en un total de 25,760 personas infectadas con salmonelosis en la Unión Europea en el 2005, la carne de cerdo y de pollo representaron un 2.7 y 1.5% respectivamente (Norrung y Buncic, 2008).

En un estudio realizado en Etiopía, acerca de la distribución de serotipos de *Salmonella* de animales de producción, personal del rastro y productos cárnicos de 1997-2002, se encontró que los serotipos predominantes fueron *S. Branderup*, *S. Dublin* y *S. Saintpaul*, seguidos por *S. Typhimurium* y *S. Anatum*. Se encontraron también algunos fagotipos de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Heidelberg*. *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Anatum* fueron aisladas de todas las fuentes, *S. Meleagridis* fue detectada sólo en el ser humano. De los 412 serotipos de *Salmonella* aislados: 37.7% fueron aislados de carne de pollo y menudencias; 28.1% de canales de camello; 19.2% de canales de res y 11.2% de carne de res de supermercados (Molla, Alemayehu y Salah, 2003).

Salmonella enterica serovariedad Muenchen se encuentra en la lista de las 10 serovariedades que causan salmonelosis clínica en estadounidenses, en base a datos del CDC. Esta serovariedad se ha encontrado en ser transferida de cerdos a humanos por contaminación cruzada, de la carne contaminada con heces (Gebreyes y Thakur, 2005).

Las serovariedades de *salmonella* más comunes en los últimos 25 años son *S. enterica* serovariedad Enteritidis y *S. Heidelberg*, estas se encuentran en los dos principales serovariedades encontradas en aves que causan enfermedad entérica en el ser humano (CDCP, 2009). Más recientemente la serovariedad *S. Kentucky* ha sido detectada comúnmente en gallinas, *S. Typhimurium* continua siendo el principal causante de enfermedades en humanos (CDCP, 2009) y es una de las serovariedades más comunes en pollos (Foley, Lynne y Nayak, 2008).

En un estudio publicado en el 2009 (Bosilevac et al., 2009), se analizaron muestras (n = 4,136) de carne molida de res, en siete regiones de los Estados Unidos por dos años. La prevalencia de *Salmonella* fue del 4.2%, la prevalencia de cepas con resistencia antimicrobiana fue del 0.6%. Las serovariedades de *Salmonella* Montevideo, Anatum, Muenster y Mbandaka comprendían la mitad de los aislamientos. El 0.6% de los aislados fueron multirresistentes.

Un estudio en Venezuela, determinó la prevalencia de *Salmonella* en diferentes etapas durante la matanza en tres plantas de faena de res. Se tomaron muestras de pieles, (n=80), heces (n =80) y canales (= 80) en las fases de preevisceración, después de la evisceración y el pre-refrigerador. La prevalencia de *Salmonella* fue mayor en la piel (36.3%) que en las heces (13.8 %) (P < 0.05). Las cepas de *Salmonella* aisladas fueron: *Salmonella enterica* subespecie *enterica* ser. Saintpaul, Javiana y Weltevreden (Narváez et al., 2013).

2.7.1. Incidencia de salmonella en cárnicos en México

En México la distribución de la carne se da en tianguis, comercio informal, carnicerías formales o supermercados; solo en los dos últimos se da la continuidad de la cadena fría junto con la matanza TIF (Tipo Inspección Federal) los cuales son factores importantes para el buen estatus sanitario de la carne en México (Rubio, 2011).

En Monterrey se analizaron 88 muestras de carne molida, se encontró que más del 75% contenían más de 1×10^5 mesófilos totales por gramo y más del 40% tenían más de 1×10^6 coliformes totales por gramo. La mayoría de las muestras presentaron coliformes fecales. Se encontraron diversos microorganismos, como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* (no O157:H7), *Shigella* spp. y *Salmonella* spp., esta última fue encontrada en 11.4% de las muestras (Heredia et al., 2001).

En el 2003 se realizó un estudio sobre la calidad sanitaria de la carne fresca en México (Flores et al., 2003). Se tomaron muestras de carne del norte, centro y sur de México. El porcentaje de ocurrencia para *Salmonella* spp. fue del 8.89%. El menor porcentaje de *Salmonella* spp. se concentró en la zona centro.

En el Estado de Hidalgo (Godínez et al., 2005) analizaron 467 muestras de canales de bovino, cerdo, trabajadores, utensilios, agua del tanque de escaldado y agua de lavar canales, en cuatro rastros municipales. En canales, trabajadores y utensilios el conteo de mesófilos totales fue de $4.5 \log \text{CFU/cm}^2$. La mayor parte de las muestras contenían coliformes y *E. coli*, incluyendo el agua de lavado de las canales. *Salmonella* apareció en el 18% del total de muestras y en el 36% de los trabajadores de la línea de cerdo.

En Yucatán se realizó un estudio por tres años para determinar la presencia de *Salmonella* en heces de personas con diarrea, heces de niños sin síntomas y muestras de carne compradas en 78 supermercados y carnicerías: cerdo, pollo y res (Zaidi et al., 2006). De las personas con diarrea, el 18.7% fueron positivas a *Salmonella* (116 de 621), *Salmonella* Typhimurium y *S. Agona* fueron los serotipos más comunes. *Salmonella* spp. fue aislada del 58.1% de las muestras de carne de cerdo; 54% de las muestras de carne de res; y 39.7% de las muestras de carne de pollo. Los aislados mostraron resistencia, principalmente a ampicilina (14.6%), cloranfenicol (14.0%), y trimetoprim-sulfametoxazol (19.7%). La electroforesis en

gel de campo pulsado mostró que las cepas encontradas en carne fueron idénticas a las encontradas en niños asintomáticos y pacientes enfermos.

Se determinaron las condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio de bovinos y porcinos, en un rastro municipal del estado de Hidalgo. Se detectaron coliformes y *E. coli* en la mayoría de las muestras, pero fueron más prevalentes en la línea de sacrificio de porcinos que en la de bovinos. *Salmonella* spp. fue encontrada en 31% de las muestras de la línea de porcino y en 11% en la de bovino (Hernández et al., 2007).

En el 2005, en Tamaulipas se muestrearon embutidos, res, pollo, queso y pescados de diferentes mercados. Los resultados mostraron que solo el 2% de las muestras fueron positivas a *Salmonella*, siendo el chorizo el alimento más contaminado (20%). La carne roja presentó una prevalencia del 6.1%; seguida por la carne de pollo con el 4.5%; los embutidos con el 2.3%; los quesos con el 1.1%; y por último, los pescados con sólo el 0.7%. La serovariedad más común fue *Salmonella* Enteritidis, otras serovariedades encontradas fueron Anatum, Agona y Kentucky (Charles et al., 2007).

2.8. Perfil de resistencia a antimicrobianos y riesgos asociados

Desde la década de los ochenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el uso racional de medicamentos y ha recomendado que este aspecto sea integrado en las políticas nacionales de medicamentos. La Asamblea Mundial de la Salud (ASM) de 1998 instó a los países miembros a desarrollar acciones dirigidas a mejorar el uso de los antibióticos. En 1998, la Conferencia Panamericana de Resistencia Antimicrobiana en las Américas hizo recomendaciones clave para los países de la región sobre mejoramiento del uso de antibióticos. En el año 2001, la OMS dio a conocer la Estrategia Global para Contener la Resistencia Antimicrobiana. En su 60a reunión (2006), la AMS reconoció que no es posible aplicar resoluciones sobre resistencia antimicrobiana

sin abordar el problema más amplio del uso irracional de medicamentos en los sectores público y privado, y para ello instó a los países miembros a invertir lo necesario en recursos humanos y financiamiento (Dresler et al., 2008).

Diversos países han implementado leyes para el uso, distribución y comercialización de los antimicrobianos en humanos y animales. En la Unión Europea se advierte sobre los peligros del exceso de uso de antibióticos en personas y en animales. La cadena alimentaria es un importante vector de transmisión de resistencia a antibióticos, ya sea por residuos de antibióticos en carne o por contaminación cruzada de bacterias comensales que han adquirido resistencia (Wattagnet, 2011).

En la Unión Europea la lista de antibióticos usados como promotores del crecimiento en alimentación animal se ha visto reducida desde 1997; en ese año se prohibió la avoparcina y en 1999 se prohibieron los cuatro siguientes: la espiramicina y la bacitracina por tener de uso terapéutico humano y la tilosina por tenerlo también veterinario; la virginamicina por problemas de resistencias cruzadas con otros antibióticos (Cancho, García y Simal, 2000). Así mismo, en humanos la Ley 29 del 2006 en la Unión Europea, promueve el uso racional de medicamentos y la farmacovigilancia.

En España existe el Plan Nacional de Investigación de Residuos, que regula la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano y otros parámetros en los alimentos de origen animal y el Consejo de la CEE (Comunidad Económica Europea) fija los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (Torres y Zarazaga, 1998). La prohibición de uso de antibióticos como promotores del crecimiento en varios países europeos ha permitido disminuir la resistencia a los antibióticos. En Dinamarca y Alemania no sólo en animales de ganadería, sino también en humanos.

La Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EE. UU. también ha avanzado en la regulación del uso de antibióticos en animales y humanos, prohibiendo el uso de ciertos antibióticos en el ganado, los cerdos y las aves de corral. La última restricción incluye el uso indiscriminado de las cefalosporinas ya que son antibióticos usados en terapéutica humana (FDA, 2012). La FDA, mediante el Code of Federal Regulations/ 21 CFR Part 207, regula el uso de antibióticos y farmacovigilancia en humanos.

En México, la Ley General de Salud (LGS) no hace ninguna mención específica sobre antibióticos o resistencia bacteriana. Únicamente el artículo 226 de dicha ley señala la regulación de la venta de medicamentos clasificados como grupo IV (donde se incluyen los antibióticos) con prescripción médica. Respecto a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), solamente la NOM sobre tuberculosis (NOM-006-SSA2-1993) menciona la importancia de actualizar tratamientos de acuerdo con patrones de resistencia bacteriana, y el proyecto de NOM sobre infecciones nosocomiales (PROY-NOM-045-SSA2-2005) incluye la regulación del uso de antibióticos dentro de los hospitales (Dreser et al., 2008). En cuanto al uso de antibióticos en animales, la NOM-061-ZOO-1999 prohíbe el uso de cloranfenicol, en su modalidad de preventivo, en la formulación de productos alimenticios para animales. Por otra parte, la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, regula la cantidad permisible de residuos de antibióticos: estreptomicina, penicilina, tetraciclina, eritromicina, neomicina y sulfonamidas en alimentos cárnicos; prohíbe residuos de cloranfenicol en músculo. En general hay poca regulación en México y la vigilancia epidemiológica es pasiva.

El uso de antimicrobianos en producción animal proporciona amplios beneficios, incluyendo mejorar la salud animal, mayor producción y, en algunos casos, la reducción de patógenos de origen alimentario. Sin embargo, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha contribuido a la prevalencia de bacterias

resistentes a los antibióticos de importancia en salud humana (Mathew, Cissell y Liamthong, 2007).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que puede o no tener implicaciones clínicas, dependiendo de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antibióticos empleados. Los géneros de organismos de mayor importancia, causantes de Eta's y resistentes a antibióticos son: *Salmonella*, *Enterococcus* y *E. coli* resistentes a glucopéptidos. Al haber una similitud estructural entre los antimicrobianos utilizados como promotores del crecimiento y los usados en terapéutica humana, es un gran riesgo que los animales sean vectores de cepas multirresistentes (Phillips et al., 2004).

Los mecanismos más preocupantes de resistencia antimicrobiana, son la integración de genes codificados en plásmidos de virulencia y resistencia, que le van a conferir a *Salmonella enterica* mayores posibilidades de sobrevivir (Fluit, 2005).

Muy comúnmente se prescriben antimicrobianos en el tratamiento de las infecciones transmitidas por los alimentos. Al existir tanta exposición a antibióticos el tratamiento puede resultar inadecuado o nulo. En el tratamiento clínico las resistencias a antibióticos más importantes son a fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplio espectro (como ceftriaxona y cefotaxima), y macrólidos. La ciprofloxacina (una fluoroquinolona) es el tratamiento de primera elección en la gastroenteritis severa en los adultos, mientras que las cefalosporinas de amplio espectro con frecuencia son las elegidas en el tratamiento de pacientes pediátricos con infecciones invasivas de *Salmonella* (Molbak, 2005).

2.8.1. Estudios sobre casos encontrados de Salmonella resistente a antibióticos en carne

Se aislaron serovariedades de *Salmonella* de pechugas de pollo, carne de pavo molida, carne de res molida, y chuletas de cerdo, en Estados Unidos durante el 2002 y 2003. El 6% del total de muestras de carne, estaban contaminadas con *Salmonella*. El 52 % de las muestras positivas correspondía a carne de pavo molida y el 39% a pechugas de pollo. *S. Heidelberg* fue el serotipo predominante, siendo encontrado en el 23% de las muestras, seguido de *S. Saintpaul* (12%), *S. Typhimurium* (11%), y *S. Kentucky* (10%). El perfil de resistencia más prevalente fue hacia tetraciclina (40%), estreptomina (37%), ampicilina (26%), y sulfametoxazol (25%). Doce por ciento de los aislados fueron resistentes a cefoxitina y ceftiofur, y sólo una cepa fue resistente a ceftriaxona. Todos los aislamientos fueron sensibles a amikacina y ciprofloxacina. El 3% de los aislados fueron resistentes al ácido nalidíxico y provenían de carne de pavo (Zhao et al., 2006).

En otro estudio, aislaron serovariedades de *Salmonella* de alimentos de 16 regiones de España en el 2002. La mayoría de las fuentes fueron huevos y sus derivados (21.6% de las cepas), pollo y productos con pollo (16.6%) y productos del mar (16.3%). Se detectaron 51 serotipos, el más común fue *S. Enteritidis* fagotipos PT1 (41.6% de los aislados), PT4 (9.4%), PT6 (9.4%), y PT6a (9.4%), y *S. Typhimurium* fagotipos DTU302 (18.8%), DT104 (15.1%), y DT104B (13.2%). El patrón de resistencia de los serotipos de *Salmonella* Enteritidis fue de 8.3, 3.1, 40.6, 15.6, 7.3 y 0% para ampicilina, estreptomina, ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim-sulfametazol y cloranfenicol respectivamente, con una resistencia múltiple de 6.2% para al menos 4 antimicrobianos. *Salmonella* Typhimurium, presentó un patrón de resistencia antimicrobiana de 69.8, 52.8, 22.6, 71.7, 18.8, 50.9% para los mismos antimicrobianos anteriores, con una resistencia múltiple de 71.7% para al menos 4 antimicrobianos (Valdezate et al., 2007).

El Food Safety and Inspection Service (FSIS) de los Estados Unidos realizó pruebas del año 1998 al 2003 para detectar *Salmonella* en carne de res, pollo y productos con huevo. De 293,938 muestras analizadas, 12,699 (4.3%) fueron positivas a *Salmonella*, y 167 (1.3%) de las muestras positivas correspondieron a *Salmonella* Enteritidis fagotipos PT13 y PT8 principalmente, encontrándose mayormente en carne molida de pollo. Se analizó el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de 148 aislados de *S. Enteritidis*, 136 (92%) fue susceptible a los 16 antimicrobianos probados (White et al., 2007).

En Etiopía se analizó el patrón de resistencia a antimicrobianos de 98 aislados de *Salmonella* de canales y personal del rastro de septiembre del 2003 a febrero del 2004 (Zewdu y Cornelius, 2009). Los resultados mostraron que 32.7% de los aislados de *Salmonella* fueron resistentes a uno o más de los 24 antimicrobianos probados. La resistencia más común fue a estreptomicina (24/32, 75%), ampicilina (19/32, 59.4%), tetraciclina (15/32, 46.9%), espectinomicina (13/32, 40.6%) y sulfisoxazol (13/32, 40.6%). Se aislaron tres cepas de *Salmonella* Kentucky que mostraron resistencia a 8 antimicrobianos. De las 12 cepas de *Salmonella* Braenderup aisladas, 10 (83.3%) mostraron multirresistencia a ampicilina, espectinomicina, estreptomicina, sulfisoxazol, trimetoprim sulfametoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico y trimetoprim. De los 8 aislados de *S. Hadar*, 7 (86.5%) mostraron resistencia antimicrobiana. Todos los 6 aislados de *S. Dublin* fueron resistentes a carbadox (100%). Todos los 6 aislados de *S. Haifa* fueron resistentes a ampicilina, estreptomicina y tetraciclina. El nivel de resistencia a antimicrobianos fue significativamente mayor en los aislados de canales de pollo (18/29, 62.1%) y cerdo (5/22, 22.7%).

Se aislaron cepas de *Salmonella* de carne, mariscos y leche en polvo de nueve ciudades del norte de China en el 2005. *Salmonella* fue aislada de 81 muestras (20.9%, 81/387) y se les clasificó en 23 serotipos. Los aislados fueron con frecuencia resistentes a sulfametoxazol (86.4%), sulfametoxazol-trimetoprim

(48.1%), ácido nalidíxico (30.9%), tetraciclina (19.8%), carboxibencilpenicilina (17.3%), amoxicilina (17.3%) y ampicilina (16.0%). Cuatro de los aislados correspondientes a carne de pollo mostraron un perfil de ACSSuTNx, resistente a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamida, tetraciclina y ácido nalidíxico (Yan et al., 2010).

Se investigó la prevalencia de *Salmonella* en 225 productos cárnicos (carne de aves de corral, carne de res molida y muestras de carne de vacuno) en Turquía. De éstos, 50 (22.2%) fueron positivos a *Salmonella*. El patógeno fue detectado en 22 (29.3%) muestras de carne de aves de corral, 16 (21.3%) muestras de carne de res molida y 12 (16%) muestras de carne de res. El aislamiento más común fue el serotipo de *Salmonella* Typhimurium (9.8%) y *S. Bongori* (8.9%). Ninguna de las cepas tuvieron resistencia a cefotaxima, ciprofloxacina, norfloxacina o levofloxacina. Sin embargo, las tasas más altas de resistencia en los aislados de carne fueron 64% para ampicilina y cefazolina y 56% para amoxicilina-ácido clavulánico. Ninguno de los aislados poseía β -lactamasas (Arslan y Eyi, 2010).

En Botswana se realizó un estudio sobre la prevalencia y susceptibilidad antimicrobiana en diferentes tipos de salchichas con carne cruda, se encontró que 65 (21.7%) de 300 muestras fueron positivas a *Salmonella*, las salchichas que contenían carne de pollo cruda presentaron mayor prevalencia de *Salmonella*. Se identificaron 11 serotipos, *Salmonella enterica* subsp. *salamae* II fue la más relevante en todos los tipos de salchichas. El total de los aislados de *Salmonella* fueron resistentes a por lo menos cuatro antibióticos: amikacina, gentamicina, cefuroxima y tombramicina, *Salmonella* Muenchen fue resistente a los 20 antimicrobianos probados y fue aislada más frecuentemente de salchichas con carne de pollo. Se sugiere que las salchichas elaboradas con carne cruda pueden ser una vía de transmisión de cepas de *Salmonella* con multirresistencia a antimicrobianos (Samaxa et al., 2012).

En India se estudió durante 2008-2009, el patrón de resistencia antimicrobiana de 37 cepas pertenecientes a 12 serotipos de *Salmonella* no tifoidea, aisladas de humanos, animales y carnes. Todos los aislamientos de *Salmonella* probados mostraron multirresistencia. Ninguno de los aislados fue sensible a la eritromicina y a metronidazol. También se observó resistencia contra clindamicina (94.59%), ampicilina (86.49%), cotrimoxazol (48.65%), colistina (45.94%), ácido nalidíxico (35.10%), amoxicilina/ácido clavulánico (18.90%), cefalexina, meropenem, tobramicina, nitrofurantoína, tetraciclina, amoxicilina (8.10% cada uno), esparfloxacina y estreptomina (5.40% cada uno). El análisis del índice de resistencia a los antibióticos múltiples (MARI), indican que aislados clínicos de animales tenían un mayor índice (0.25%), en comparación con aislados de alimentos (0.22%) y humanos (0.21%) (Singh et al., 2012).

Se realizó un estudio en el centro de Tennessee Estados Unidos, para evaluar la resistencia a antibióticos en enterobacterias, en carne cruda de pollo y res. El 95.2% de las muestras analizadas fueron positivas a enterobacterias, con una concentración que varió de 3.26 log₁₀ ufc/g a 4.94 log₁₀ ufc/g. La contaminación fue significativamente mayor (P < 0.05) en la carne molida de res, carne molida de pollo, pechuga de pollo y alas de pavo. El perfil de resistencia a antibióticos más frecuente fue hacia eritromicina, penicilina, y ampicilina a 100, 89, y 65.8 %, respectivamente; sólo el 2.7% de las muestras fueron resistentes a cloranfenicol. (Kilonzo, Rotich y Nahashon, 2013).

2.8.1.1. *Perfiles de resistencia a antibióticos de Salmonelas aisladas de carne, productos cárnicos y subproductos en México*

Se analizaron un total de 35 alimentos preparados expendidos en puestos ambulantes ubicados en la periferia de la FES-Iztacala, UNAM, México. El 51.4% de los alimentos analizados fueron positivos para algún serotipo de *Salmonella*. A partir de los 18 aislados positivos, *Salmonella* Ohio se identificó en el 40% de las muestras, *Salmonella* Anatum en el 5.7%, *Salmonella* Newport y *Salmonella*

Infantis en el 2.8% de los casos. El 100% de los serotipos de *Salmonella* identificados por PCR multiplex fue resistente a la ampicilina, carbenicilina, gentamicina, amikacina y cefalotina (Tellez et al., 2008).

En un estudio realizado en diversos productos del estado de Hidalgo México, *Salmonella* se detectó en el 35.3% de las aves, 30.3% de los quesos, 21.8% de las verduras, el 17.3% de la carne de cerdo y el 15.1% de carne de vacuno. Los aislados de *Salmonella* tenían altos niveles de resistencia a la ampicilina (66.7% de los aislados), tetraciclina (61.3%) y cloranfenicol (64.5%); y bajos niveles de resistencia a la cefotaxima (0%), gentamicina (3.2%), y kanamicina (4.3%). La prevalencia de *Salmonella* fue más alta en alimentos de tiendas al por menor que en los alimentos de los supermercados. La resistencia al cloranfenicol tendió a ser mayor a los datos reportados en otros países (Miranda et al., 2009).

En México, en la ciudad de Hermosillo Sonora, se aislaron cepas de *Salmonella* spp. de vísceras de pollo de abril a octubre del 2002 y se examinó su perfil de resistencia frente a 18 antibióticos. De 152 muestras evaluadas, la resistencia más común se observó en cefalotina (41%), amoxicilina/ácido clavulánico (38%), cefoxitín (36%) y ampicilina (26%). Setenta y un por ciento de los aislados presentaron resistencia al menos a un antibiótico y 17.1% presentaron resistencia al menos a 4 antibióticos (Camacho et al., 2010).

En un estudio realizado en Jalisco se determinó la incidencia y resistencia antimicrobiana de serotipos de *Salmonella*, en canales de res de cuatro pequeños mataderos, durante un período de 10 meses. *Salmonella* fue aislada de 15.4% de las canales de bovinos después del lavado con agua. Los serotipos más frecuentes fueron *Salmonella enterica* (24.4%), *Salmonella* Typhimurium (17.9%), y *Salmonella* Grupo B (14.1%) El 46.2% de los aislados fueron resistentes a estreptomocina, el 23.1% a cloranfenicol, el 21.8% a sulfa-trimetoprim y el 19.2%

fueron resistentes a gentamicina. El 33% de los aislados fueron multirresistentes a los antibióticos probados (Pérez et al., 2012).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no existe una base de datos consistente de los serotipos de *Salmonella* spp. encontrados en carne de res, ni su perfil de resistencia antibióticos. Esta información será de gran utilidad para futuras comparaciones de la prevalencia de *Salmonella* y para el desarrollo de políticas públicas y regulaciones encaminadas a disminuir los riesgos de resistencias microbianas a antibióticos.

4. OBJETIVOS

- Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en carne de res molida en la Ciudad de México y la ciudad de Guadalajara.
- Determinar los serotipos de *Salmonella* spp. que se presentan en la carne de res molida de ambas ciudades.
- Determinar fenotípicamente el perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño del Experimento

En este experimento se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, en dos ciudades de las regiones más pobladas del país: México, D.F. correspondiente a la zona centro; y Guadalajara Jalisco, correspondiente a la zona occidente. Se trabajó con muestras de carne molida de res, que se expenden en tiendas de autoservicios, mercados públicos y tianguis en estas ciudades. Todo el producto fue colectado ≤ 24 horas antes de su procesamiento, manteniéndose a 4°C hasta su análisis en el Laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

5.2. Selección de puntos de venta

Dentro de estas ciudades se seleccionaron establecimientos comerciales que venden carne dentro del mercado formal, como lo son las tiendas de autoservicio. Se realizó un muestreo para determinar los lugares donde se recolectaron las muestras en tiendas de autoservicio, mercados públicos y tianguis.

En el caso de las tiendas de autoservicio, se usó un marco muestral de todas las tiendas de los principales grupos comerciales de este formato, que venden carne en las ciudades de Guadalajara y la Ciudad de México. Según datos de la ANTAD (Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales), existen 4 principales grupos comerciales que agrupan el total de tiendas de nuestro marco muestral: 1) Wal-Mart de México S. de R. L de C. V.; 2) Grupo Comercial Mexicana S. A de C. V.; 3) Organización Soriana S. A. B de C. V.; y 4) Grupo Comercial Chedraui S. A. B. de C. V. Para los mercados públicos y tianguis se usó información estadística estatal.

5.3. Criterios generales para la selección de las muestras de carne

En cada uno de los establecimientos designados se tomó una muestra de 300-400 gramos de carne molida de res. La unidad de observación fue la porción de carne molida de res adquirida en cada punto de venta. La unidad de análisis fue de 25 g, según lo establece la NOM-114-SSA1-1994 para aislamiento de *Salmonella* spp. en alimentos.

5.4. Muestreo

Tamaño de muestra

Para determinar el número de lugares a muestrear, se utilizó la fórmula para determinar el tamaño de muestra para una proporción de una población, cuando no conocemos el número de elementos en esa población.

$n = Z_{\alpha}^2 * p * q / e^2$ donde:

n= tamaño de la muestra

$Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (ya que el nivel de confianza es del 95%).

p= proporción aproximada de la población que presenta la característica estudiada, como no tenemos datos al respecto se utilizó 0.5

q= 1-p

e = margen de error, fijado en 8%

En base a la formula anterior, el tamaño muestral quedó determinado en 150 muestras, al redondear el resultado.

Se tomaron 100 muestras en la Ciudad de México, distribuidas en 50 muestras en tiendas de autoservicio y 50 muestras en mercados, tianguis o carnicerías. En la ciudad de Guadalajara se tomaron un total de 50 muestras, 25 en tiendas de

autoservicio y 25 en mercados, tianguis o carnicerías. En cada grupo, los lugares para la toma de muestras se seleccionaron por un muestreo aleatorio simple (números aleatorios).

En el caso de las tiendas de autoservicio, el número de puntos de venta de cada uno de los 4 grupos comerciales, que participaron en el muestreo, se determinó con base en la probabilidad proporcional al tamaño (número de tiendas) en cada uno de los grupos comerciales. Se tomó una muestra en cada punto de venta que participó en el muestreo.

5.5. Análisis microbiológico

5.5.1. Preparación de medios de cultivo

Antes de muestrear se deben tener todos los medios disponibles para su uso. Las muestras para aislamiento de *Salmonella* spp. deben seguir los pasos de: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento selectivo diferencial e identificación bioquímica.

A. Preenriquecimiento

El preenriquecimiento es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable (NOM-114-SSA-1994).

Se puede usar caldo lactosado o leche baja en grasa (reconstituida) (BAM, 1998).

Leche en polvo descremada (reconstituida)

Leche en polvo descremada	100 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden 100 gramos de leche en polvo descremada en 1 litro de agua destilada. Se agita hasta disolver y se esteriliza 15 min a 121°C en un autoclave (BAM, 1998).

Caldo lactosado

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g
Agua destilada	1 litro

En este trabajo se usó caldo lactosado (Difco). Si se prepara el medio en el laboratorio siguiendo la receta anterior, un litro debe ser dividido depositando 225 ml en cuatro botes lecheros de 500 ml (Figura 5.5.1.1.). Si utilizamos un medio ya preparado, se pesan directamente 2.93 gramos de medio deshidratado en cada bote lechero de 500 ml, posteriormente se le agrega a cada bote 225 ml de agua destilada. Se agita hasta disolver y se esteriliza 15 min a 121°C en autoclave. El pH final debe ser de 6.9 ± 0.2 (BAM, 1998).



Figura 5.5.1.1. Botes lecheros de 500 ml con caldo lactosado

B. Enriquecimiento selectivo

El enriquecimiento selectivo es empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella*, e inhibir otros organismos presentes en la muestra (NOM-114-SSA1-1994).

Se usa el caldo tetrionato y el caldo selenito cistina o el caldo Rappaport Vassiliadis. El caldo selenito cistina esta en desuso, ya que la FDA recomendó el caldo Rappaport Vassiliadis, porque el selenito es un contaminante ambiental. En el presente experimento se utilizó caldo tetrionato y caldo selenito cistina (ambos Oxoid), siguiendo los parámetros de aislamiento de *Salmonella* spp. utilizados por el Laboratorio de Microbiología General, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Caldo selenito cistina

Medio 1 (Modificación de la formulación de Leifson para caldo selenito)

Triptona o polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Selenito de sodio (NaHSeO_3)	4 g
Bifosfato de sodio (Na_2HPO_4)	10 g
L-Cistina	0.01 g
Agua destilada	1 litro

Medio 2 (Modificación de North-Bartram)

Polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Selenito de sodio (NaHSeO_3)	4 g
Bifosfato de sodio (Na_2HPO_4)	5.5 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	4.5 g
L-Cistina	0.01 g
Agua destilada	1 litro

Se calienta la mezcla hasta disolver, no se esteriliza. Posteriormente se distribuye en porciones de 10 ml en tubos de ensayo estériles de 16x150 mm con taparroscas.

El pH final debe ser de 7.0 ± 0.2 . Como el medio no se esteriliza por autoclave, se recomienda usarse el mismo día que se prepare (BAM, 1998).

Caldo tetracionato

Polipeptona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio	10 g
Tiosulfato de sodio	30 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en 1 litro de agua destilada, se calienta y agita hasta disolver (queda en el fondo un precipitado blanco, es normal). No se esteriliza, así que se recomienda guardarlo en refrigeración ($5-8^{\circ}\text{C}$). El pH final deber ser de 8.4 ± 0.2 . (BAM, 1998).

Solución de yodo-yoduro

Yoduro de potasio (KI)	5 g
Yodo molecular (I_2)	6 g
Agua destilada estéril	20 ml

Se disuelve el yoduro de potasio en 5 ml de agua destilada estéril. Se adiciona el yodo y se disuelve toda la mezcla. Posterior a esto, se diluye a 20 ml (BAM, 1998).

Solución verde brillante

Verde brillante estéril	0.1 g
Agua destilada estéril	100 ml

Se disuelve el verde brillante deshidratado en los 100 ml de agua destilada estéril (BAM, 1998).

El día que se usa el caldo tetracionato, se adicionan 20 ml de solución yodo-yoduro y 10 ml de solución verde brillante a un litro base de caldo tetracionato. Suspendemos el precipitado por agitación y asépticamente distribuimos en porciones de 10 ml en tubos de ensayo estériles de 16x150 mm con taparroca. El medio no se debe calentar después de la adición de las dos soluciones (BAM, 1998).

En nuestro experimento adicionamos sólo solución de yodo-yoduro al caldo tetracionato y obtuvimos buenos resultados

Caldo Rappaport-Vassiliadis

Caldo base

Triptona	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
KH ₂ PO ₄	1.6 g
Agua destilada	1 litro

Solución de cloruro de magnesio

MgCl ₂ ·6H ₂ O	400 g
Agua destilada	1 litro

Solución de verde de malaquita oxalato

Verde de malaquita oxalato	0.4 g
Agua destilada	100 ml

Para preparar el medio completo, se combina: 1 litro de medio base, 100 ml de solución de cloruro de magnesio, y 10 ml de solución de verde de malaquita oxalato (el volumen total del medio completo es de 1110 ml). El “medio base” debe prepararse el mismo día en que vaya a prepararse el medio completo. La solución de cloruro de magnesio puede guardarse en una botella ámbar, a temperatura ambiente hasta por un año. La solución de verde de malaquita oxalato puede guardarse en una botella ámbar, a temperatura ambiente, hasta por 6 meses (BAM, 1998).

Posteriormente, se distribuyen volúmenes de 10 ml de medio completo en tubos de ensayo de 16x150 mm; se esterilizan 15 minutos a 115°C. El pH final debe ser de 5.5 ± 0.2 . Se pueden guardar en refrigeración hasta un mes. Este caldo no fue utilizado en el experimento, pero es recomendado para aislamiento de *Salmonella* spp. en carne.

C. Aislamiento selectivo y diferencial

En este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas (NOM-114-SSA2-1994).

Para el aislamiento se utilizan medios diferenciales y selectivos como: agar MacConkey (MC), agar Eosina Azul de Metileno (EMB), agar *Salmonella Shigella* (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HE), agar Verde Brillante (BG) (Caffer y Terragno, 2001) (Cuadro 5.5.1.1.).

Cuadro 5.5.1.1. Características de las colonias en medios selectivos y diferenciales

Medio de cultivo	Selectividad	Aspecto de las colonias
Agar MacConkey	Baja	Incoloras
Agar EMB	Baja	Incoloras
Agar SS	Alta	Incoloras con centro negro
Agar XLD	Alta	Rojas con centro negro
Agar HE	Alta	Verdes-azuladas con centro negro
Agar BG	Alta	Rosadas pálidas

Fuente: Caffer y Terragno, 2001.

En nuestro experimento, empezamos con un medio de baja selectividad (EMB) y dos medios de alta selectividad, XLD y SS (ambos de Oxoid). Al no aislar ninguna colonia presuntiva de *Salmonella* con el agar Eosina Azul de Metileno (EMB), decidimos quedarnos sólo con los dos medios de alta selectividad: XLD y SS.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

Extracto de levadura	3 g	Citrato de amonio férrico	0.8 g
L-lisina	5 g	Tiosulfato de sodio	6.8 g
Xilosa	3.75 g	Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Lactosa	7.5 g	Agar	15 g
Sucrosa	7.5 g	Rojo fenol	0.08 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g	Agua destilada	1 litro

Se disuelve el medio por agitación y calor. No se esteriliza. Se vacía en cajas de petri desechables; al endurecer el agar se guardan las cajas en refrigeración (pueden durar hasta 1 mes). El pH final es de 7.4 ± 0.2 (BAM, 1998).

Agar *Salmonella Shiguelia* (SS)

Proteosa peptona	5 g	Extracto de carne	5 g
Sales biliares	8.5 g	Tiosulfato de sodio	8.5 g
Citrato férrico	1 g	Citrato de sodio	8.5 g
Lactosa	10 g	Agar	15 g
Verde brillante	0.00033 g	Rojo neutro	0.025 g
		Agua destilada	1 litro

Se disuelve el medio por agitación y calor, no se esteriliza. Se vacía en cajas de petri desechables; al endurecer el agar se guardan las cajas en refrigeración (pueden durar hasta 1 mes). El pH final es de 7.0 ± 0.2 (Caffer y Terragno, 2001).

D. Medios para pruebas bioquímicas

Se usaron como medios confirmatorios para las colonias sospechosas de *Salmonella*, agares Triple azúcar Hierro (TSI), Agar hierro Lisina (LIA), (ambos de Oxoid) y Agar Urea de Christensen.

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Según el BAM (Bacterial Analytical Manual) de la FDA pueden usarse cualquiera de estas dos versiones:

Medio 1		Medio 2	
Polipeptona	20 g	Extracto de carne	3 g
NaCl	5 g	Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g	Peptona	15 g
Sucrosa	10 g	Proteosa peptona	5 g
Glucosa	1 g	Glucosa	1 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g	Lactosa	10 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.2 g	Sucrosa	10 g
Rojo fenol	0.025 g	FeSO_4	0.2 g
Agar	13 g	NaCl	5 g
Agua destilada	1 litro	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.3 g
		Rojo fenol	0.024 g
		Agar	12 g
		Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en el agua destilada, con calor y agitación ocasional. Se llenan tubos de ensayo de 13x100 mm con 3-4 ml del medio. Se esterilizan los tubos con el Medio 1 por 15 minutos a 118°C y del Medio 2 por 15 minutos a 121°C. Antes de que el medio solidifique se inclinan los tubos de ensayo para formar un “pico de flauta” (Figura 5.5.1.2.). El pH final del Medio 1 debe ser 7.3 ± 0.2 y para el Medio 2 debe ser 7.4 ± 0.2 (Caffer y Terragno, 2001).



Figura 5.5.1.2. Agares LIA y TSI en “pico de flauta”

Agar Hierro Lisina (LIA)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
Clorhidrato de L-lisina	10 g
Citrato de amonio férrico	0.5 g
Tiosulfato de sodio (anhidro)	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Se calienta con agitación ocasional para disolver los ingredientes. Se depositan porciones de 3-4 ml en tubos de ensayo de 13x100 mm. Se esteriliza 12 minutos a 121°C. Antes de solidificarse se coloca en posición inclinada para formar el “pico de flauta” (ver Figura 5.5.1.2.). El pH final debe ser de 6.7 ± 0.2 (BAM, 1998).

Agar Urea de Christensen

Base

Peptona	1 g
NaCl	5 g
Dextrosa	1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Rojo fenol (6 ml de solución 1:500)	0.012 g
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml

Solución de urea

Urea	20 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelven todos los ingredientes (excepto la urea) en 900 ml de agua destilada. Se esteriliza 15 minutos a 121°C. Se disuelve la urea en 100 ml de agua destilada. La urea no se puede esterilizar por calor, así que se usa la filtración. Se filtra la solución de urea asépticamente al agar base (50-55°C) y se mezcla. Se depositan porciones de 3-4 ml en tubos de ensayo de 13x100 mm estériles. Antes de

solidificarse se coloca en posición inclinada para formar el “pico de flauta” (ver figura 5.5.1.2.). El pH final debe ser de 6.8 ± 0.1 (BAM, 1998).

5.6. Preparación de las muestras

En el laboratorio y bajo condiciones asépticas, la carne de cada muestra se homogenizó (Figura 5.6.1.), previo a la toma de los 25 g que se usarán para el aislamiento de *Salmonella* spp. Se seguirán los parámetros descritos en la NOM-110-SSA1-1994, que describe la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.



Figura 5.6.1. Homogeneización de la muestra usando guantes estériles (un par de guantes por cada muestra)

5.7. Pruebas bacteriológicas

5.7.1. Aislamiento de *Salmonella* spp.

Se realizó según la NOM-114-SSA1-1994. Primero se hizo el aislamiento por el método convencional: pre-enriquecimiento con caldo lactosado; enriquecimiento selectivo con caldo selenito-cistina y caldo tetracionato; aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, agar *Salmonella Shiguelia* y agar Xilosa Lisina Desoxicolato; la identificación bioquímica definitiva se hizo en base a los resultados en Agar Triple Azúcar hierro (TSI, por sus siglas en ingles), Agar Hierro Lisina (LIA, por sus siglas en inglés) y Agar urea de Christensen (Figura 5.7.1.1.). Los aislados que resultaron positivos a *Salmonella* spp., fueron preservados para su confirmación molecular, serotipificación y pruebas de resistencia a antibióticos.

Se depositaron 25 gramos de carne molida en 225 ml de caldo lactosado (preenriquecimiento) y se incubó de 18-24 horas a 37°C. Después de este tiempo, se depositó 1 ml del medio de preenriquecimiento a cada uno de los dos caldos de enriquecimiento selectivo (caldo tetracionato y caldo selenito cistina); el caldo tetracionato fue incubado a 42°C y el caldo selenito cistina fue incubado a 37°C, ambos de 18-24 horas. Posterior al enriquecimiento e incubación, se procedió al aislamiento de las Salmonelas usando medios sólidos: agar *Salmonella Shiguelia* y agar Xilosa Lisina Desoxicolato. Se tomó una asada de cada uno de los medios de enriquecimiento y se sembró por estría cruzada, de manera que se pudieran obtener colonias aisladas. Las cajas fueron incubadas a 37°C de 18-24 horas.

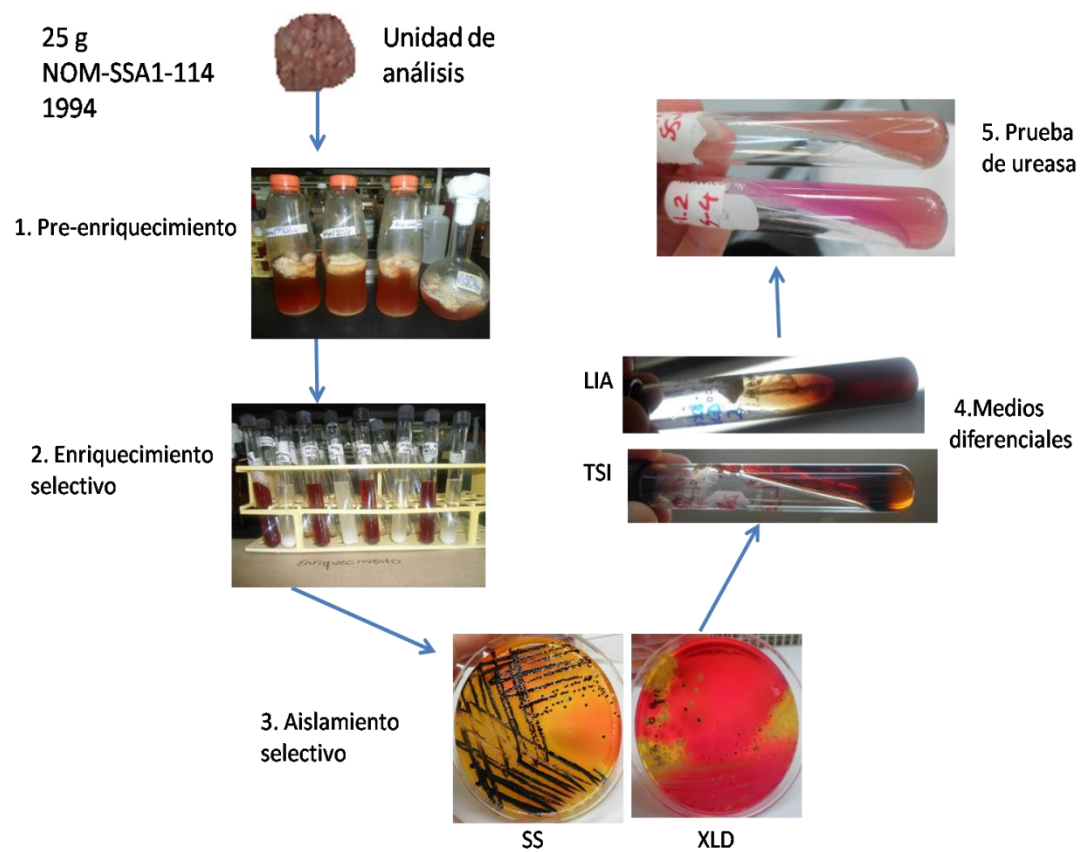


Figura 5.7.1.1. Aislamiento e identificación bioquímica de *Salmonella* spp. en carne molida

PREENRIQUECIMIENTO

Caldo lactosado

El propósito del pre-enriquecimiento es facilitar a las *Salmonellas* presentes la recuperación del estado en el que se encuentran, como resultado de la exposición a condiciones traumatizantes durante la elaboración de los productos. El caldo lactosado no contiene sustancias inhibitorias, por lo que la biota asociada no se ve impedida para proliferar. El crecimiento se observa por turbidez del medio, luego de un crecimiento de 18-24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (ENCB, 2013).

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Caldo selenito cistina

Los medios del grupo selenito, contienen una fuente de nitrógeno a base de triptona y peptona. El efecto tóxico del selenito se debe a dos posibles mecanismos: reacción con el grupo sulfhidrilo enzimático o formación de aminoácidos análogos, en los que el selenito ha tomado el lugar del azufre. Contiene también lactosa y fosfatos, los cuales tienen un efecto regulador del pH. La cistina favorece el desarrollo de las Salmonelas, disminuyendo el efecto tóxico del desoxicolato (ENCB, 2013).

Se tomó 1 ml del caldo de preenriquecimiento y lo depositamos en 10 ml de caldo selenito cistina, se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 18-24 horas. El crecimiento se visualizó por turbidez y coloración terracota del medio.

Caldo tetracionato

Los medios del grupo tetracionato, contienen una fuente de nitrógeno orgánico a base de peptona, triptona, extracto de carne o extracto de levadura, adicionado, según sea el caso: de sales biliares para inhibir el desarrollo de bacterias Gram positivas y coliformes, o de novobiocina para inhibir el desarrollo de bacterias Gram positivas y controlar el desarrollo desmedido de *Proteus* spp. (ENCB, 2013). El carbonato de calcio regula el pH, neutralizando el ácido que se va generando. El tiosulfato de sodio se convierte en tetracionato de sodio, al entrar en contacto con la solución de yodo-yoduro. El tetracionato de sodio tiene un efecto tóxico, según se cree, por reacción con grupos sulfhidrilo; afecta a las enzimas involucradas en la síntesis de la membrana y pared celular de las bacterias sensibles (ENCB, 2013).

Antes de usar el medio, agregamos 2 ml de una solución yodo-yoduro por cada 100 ml de caldo. El medio, una vez adicionado de yodo, no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación (NOM-114-SSA1-1994; ENCB, 2013). Tomamos 1 ml del caldo de preenriquecimiento y lo depositamos en 10 ml de caldo selenito cistina, se incubó a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 18-24 horas. El crecimiento se visualizó por turbidez.

AISLAMIENTO SELECTIVO Y DIFERENCIAL

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

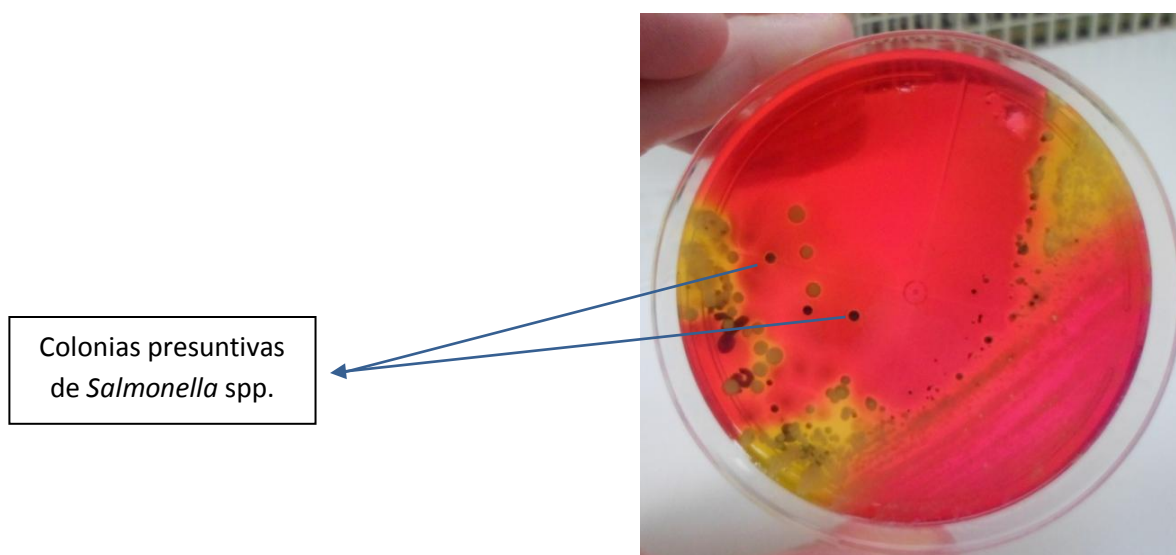


Figura 5.7.1.2. Colonias presuntivas de *Salmonella* en agar XLD

Las muestras incubadas en caldo selenito y caldo tetrionato, se sembraron por estría cruzada en el agar XLD, con el fin de obtener colonias aisladas de *Salmonella* spp. Las cajas con agar XLD (Oxoid) se incuban a 37°C de 18-24 horas.

Observamos colonias rojizas en un fondo rojo con o sin centro negro. Muchas *Salmonellas* producen colonias completamente negras (BAM, 1998) (Figura 5.7.1.2.).

Este es un medio de selectividad moderada a alta que permite ser usado con *Salmonella* y *Shigella*. La degradación de xilosa, lactosa y sacarosa produce acidez que hace virar el indicador al amarillo. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la producción de sulfhídrico. La decarboxilación de la lisina a cadaverina se visualiza por la presencia de un color rojo púrpura por aumento del pH. El desoxicolato inhibe Gram (+). La diferenciación de *Salmonella/Shigella* de otras enterobacterias se basa en tres reacciones: fermentación de xilosa, decarboxilación de lisina y producción de sulfhídrico. La xilosa diferencia *Shigella* de *Providencia* en que no fermenta xilosa o lo hace muy lentamente; la lisina diferencia *Salmonella* de los fermentadores de xilosa no patógenos. La lactosa y la sacarosa en exceso evitan que los coliformes lisina positiva reviertan la condición alcalina de los microorganismos consumidores rápidos de xilosa/lisina. La producción de sulfhídrico ocurre en condiciones alcalinas dando colonias con centro negro; en condiciones ácidas la precipitación negra se inhibe (Caffer y Terragno, 2001).

Agar *Salmonella Shigella* (SS)

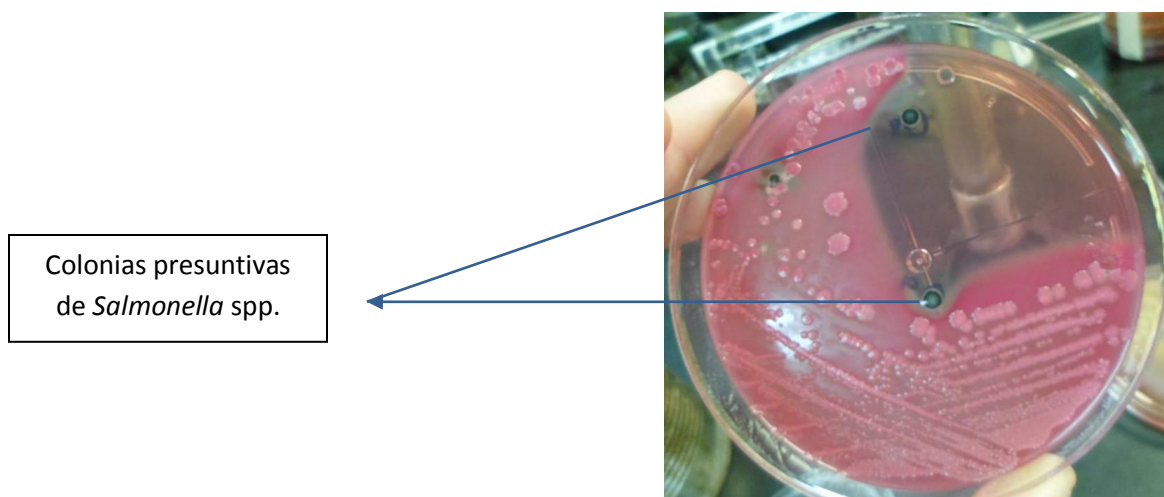


Figura 5.7.1.3. Colonias presuntivas de *Salmonella* en agar SS

Las muestras incubadas en los caldos de enriquecimiento, se sembraron por estría cruzada en el agar SS. Esto es con el fin de obtener colonias aisladas de *Salmonella* spp. Las cajas con agar SS (Oxoid) se incubaron a 37°C de 18-24 horas. Se observaron colonias transparentes, incoloras, en un fondo rosa o amarillo pálido. Pueden tener el centro negro o ser totalmente negras (Caffer y Terragno, 2001) (Figura 5.7.1.3.).

Este es un medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de materia fecal, alimentos y animales; pero no es el ideal para *Sh. dysenteriae* y *Sh. boydii*. Sirve también para *Y. enterocolitica* y para diferenciar fermentadores de lactosa de los no fermentadores. La presencia de verde brillante, bilis de buey, alta concentración de tiosulfato y el citrato inhiben la flora acompañante. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la formación de sulfuro de hierro. La degradación de la lactosa a ácido causa el viraje del indicador rojo neutro a rojo (Caffer y Terragno, 2001).

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Al encontrar colonias con las características de Salmonela en alguno de los dos agares de aislamiento selectivo (XLD y SS), las seleccionamos para realizarles pruebas bioquímicas. Escogimos 1-3 colonias de cada caja, para sembrarlas en los agares LIA y TSI (Difco); se sembraron por picadura y estría y se incubaron a 35±2°C de 18-24 horas. También sembramos las colonias seleccionadas en el agar urea de Christensen, se sembraron por picadura y fueron incubadas a 35±2°C, por el mismo periodo de tiempo.

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

En este agar, después del periodo de incubación, *Salmonella* spp. fue identificada por producir un fondo amarillo, superficie rojiza y alta producción de ácido sulfhídrico (negro) (Figura 5.7.1.4.)

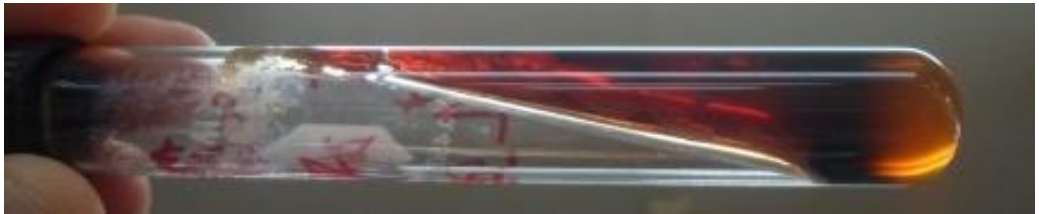


Figura 5.7.1.4. Características bioquímicas de *Salmonella* en agar TSI

Este medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH₂). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH₂. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de SH₂ se manifiesta por un ennegrecimiento del medio (Caffer y Terragno, 2001).

Agar Hierro Lisina (LIA)

Después del periodo de incubación, identificamos a *Salmonella* spp. al observar el medio de color púrpura oscuro; se observó además, producción de ácido sulfhídrico (negro) (Figura 5.7.1.5.).

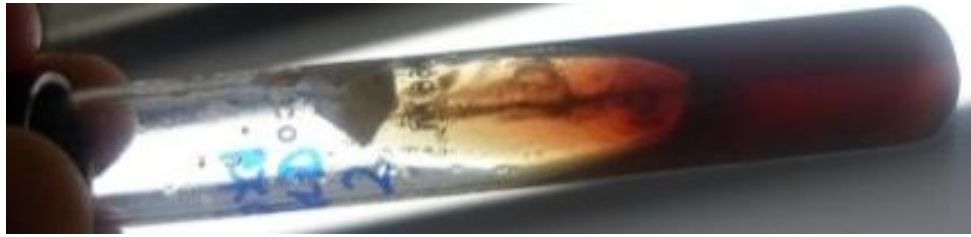


Figura 5.7.1.5. Características bioquímicas de *Salmonella* en agar LIA

La descarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesaria la fermentación previa de la glucosa. Los microorganismos que no descarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio. La formación de SH₂ produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido. Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α -cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis (Caffer y Terragno, 2001).

Agar urea de Christensen

Salmonella es negativa a esta prueba (ureasa -). Confirmamos que se trataba de *Salmonella*, al no observar cambio de coloración en el agar urea de Christensen (Figura 5.7.1.6.).



Figura 5.7.1.6. Prueba negativa (sin color) y prueba positiva (rosa mexicano) a la ureasa

5.7.2. Problemas de diagnóstico diferencial

Algunas cepas de *Salmonella* spp. se pueden confundir con otras enterobacterias productoras de SH2 como *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii* que son comensales del aparato digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, pero que no son enteropatógenos (Caffer y Terragno, 2001). Los géneros *Citrobacter* y *Proteus* son patógenos oportunistas, responsables de una amplia gama de infecciones.

Cuadro 5.7.2.1. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subesp. *enterica* (I) y *Proteus mirabilis*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>Proteus mirabilis</i>
SH2 (TSI)	+	+
Urea (hidrólisis)	-	+
Fenilalanina deaminasa	-	+
Lisina decarboxilasa	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	+
Lactosa (fermentación)	-	-
Dulcita (fermentación)	+	-
ONPG	-	-

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

Fuente: Caffer y Terragno, 2001

Cuadro 5.7.2.2. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I) y *Citrobacter freundii*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>Citrobacter freundii</i>
SH2 (TSI)	+	+
Urea (hidrólisis)	-	d
Lisina decarboxilasa	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	d
Lactosa(fermentación)	-	d
Sacarosa (fermentación)	-	d
Dulcita (fermentación)	+	d
Malonato (fermentación)	-	d
ONPG	-	+

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos;

d: diferentes reacciones

Fuente: Caffer y Terragno, 2001

Las cepas de *Citrobacter freundii* suelen ser identificadas por error como *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa) (serovariedades monofásicas) y *S. enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb) (serovariedades difásicas), (ex-género *arizona*), en razón de compartir caracteres bioquímicos tales como: SH2 (TSI) +, ONPG + y un perfil de fermentación de hidratos de carbono muy parecido (Caffer y Terragno, 2001).

Cuadro 5.7.2.3. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subesp. *enterica* IIIa y IIIb y *Citrobacter freundii*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> IIa y IIb	<i>Citrobacter freundii</i>
Lisina descarboxilasa	+	-
Ornitina descarboxilasa	+	-(con excepciones)
Glicerol (fermentación)	-	+
Malonato (utilización)	+	-
Gelatina (hidrólisis)	+ (lenta)	-

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

Fuente: Caffer y Terragno, 2001

Puede ocurrir también, que cepas de *Salmonella* spp. pueden confundirse con otras enterobacterias productoras de SH₂, como *E. coli* SH₂ + o *Edwardsiella tarda* (Caffer y Terragno, 2001).

Cuadro 5.7.2.4. Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I) , *Edwardsiella tarda* y *Esherichia coli* SH₂ +

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i> SH ₂ +
Indol	-	+	+
Citrato Simmons	+	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+
Arginina dehidrolasa	+	-	-/+
Manita (fermentación)	+	-	+
Dulcita (fermentación)	+	-	+/-
Ramnosa(fermentación)	+	-	+
Xilosa (fermentación)	+	-	+
ONPG	-	-	+

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

Fuente: Caffer y Terragno, 2001

5.7.3. Identificación morfológica

Con el fin de identificar si nuestros aislados eran realmente puros, realizamos tinciones de Gram. Se observaron al microscopio bacilos gram negativos, es decir, de color rojo o rosa, en cultivo puro.

5.8. Confirmación molecular

Con el fin de disminuir la incertidumbre asociada con las pruebas bioquímicas, las cepas fueron confirmadas por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se determinó la presencia del gen *invA*, relacionado con la capacidad de invasividad de *Salmonella* spp. Este gen, de 288 pares de bases (pb), es característico de *Salmonella* spp., codifica para una invasina importante para la entrada a epitelio intestinal y está implicada en el re-arreglo del citoesqueleto.

Extracción de ADN de los aislados de Salmonella

Los aislados puros fueron cultivados en agar LB por 24 hrs a 37°C. Posterior a ese tiempo el medio fue calentado a punto de ebullición por 10 minutos y luego centrifugado a 6,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y utilizado para la amplificación de iniciadores específicos de *Salmonella*, por PCR.

Amplificación por PCR

Los iniciadores específicos para *Salmonella*, S139 y S141 (Rahn et al., 1992) tienen respectivamente la siguiente secuencia de nucleótidos basada en el gen *invA* de *Salmonella*: 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' y 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'. La reacción con estos iniciadores fue llevada a cabo en 2.5 µl de buffer 10X para PCR (500 mM KCL, 200 Mm Tris HCL), 1.25 µl de dNTPs (10Mm), 1.6 µl de MgCl₂, 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 1.5 µl de la extracción de cada aislado. Para la amplificación del ADN, se siguieron las siguientes condiciones: incubación inicial a 94°C por 60 segundos; seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 segundos; alineación a 64°C por 30 segundos; finalmente una elongación a 72°C por 30 segundos, seguida de un periodo de extensión final de 7 minutos a 72°C.

Electroforesis de los productos de PCR

La amplificación de los productos de PCR fue analizada usando geles con 1.2% de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador. La electroforesis se realizó a 120V. Ocho microlitros del producto de PCR más 3 microlitros de buffer de carga 6X fueron depositado en cada pozo. Se utilizó un marcador de peso molecular a 100 pb (Fermentas).

5.9. Preservación de aislados

Se preservaron las cepas en medio TSA (Agar Tripticasa Soya, por sus siglas en inglés) por estría en tubo inclinado, con aceite mineral estéril, conservados en refrigeración (Figura 5.8.1.).

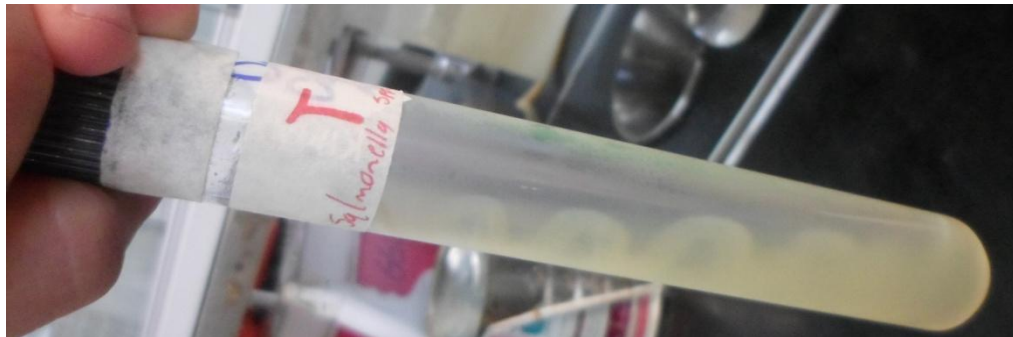


Figura 5.8.1. Preservación de cepas puras en Agar Soya Tripticaseína con aceite mineral estéril

Agar Soya Trypticaseína (TSA)(BAM, 1998)

Trypticase peptona	15 g
Bacto peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

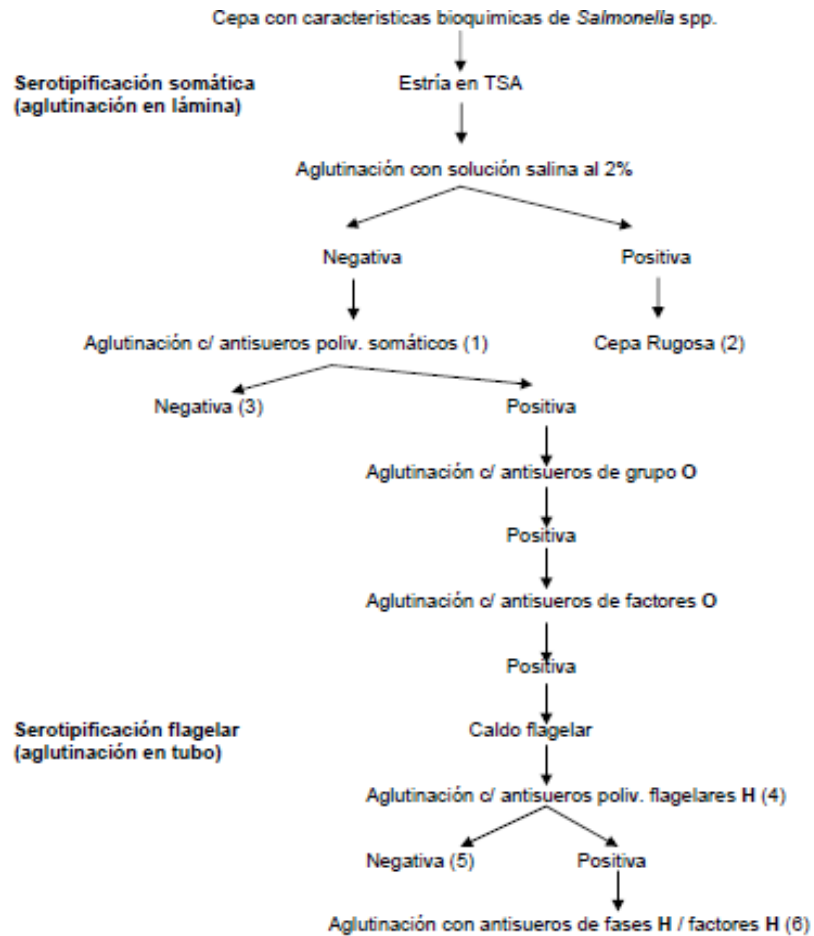
Se calentó la mezcla, con agitación ocasional para disolver el agar. Se depositó en porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 15x160 mm. Se esterilizó 15 min a 121°C; antes de que se solidificara el agar se colocaron los tubos en posición inclinada para formar el “pico de flauta”. El pH final debe ser de 7.3 ± 0.2 (BAM, 1998).

El aislado puro se hizo crecer en estría en un tubo de ensayo con agar TSA inclinado; se incubó a 37°C de 18 a 24 horas. El aceite mineral se esterilizó a 121°C por 40 minutos. Cuando el aceite estuvo a temperatura ambiente, se depositaron aséptica y cuidadosamente en los tubos de TSA con la estría del aislado, el aceite cubrió toda la estría. Se rotuló y guardó en refrigeración.

5.10. Serotipificación

Se tomaron los aislados puros de *Salmonella* spp. preservados y activados en TSA, para su caracterización serológica. La serotipificación se realizó de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White, utilizando sueros somáticos y flagelares producidos por el Laboratorio de Producción de Sueros, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) (Figura 5.9.1.).

En este instituto las cepas recibidas se siembran en agares selectivos y diferenciales, y se confirma que pertenecen al género *Salmonella* por pruebas bioquímicas convencionales. La serotipificación se realizó por aglutinación, utilizando sueros polivalentes y específicos preparados en dicho laboratorio, de acuerdo a los lineamientos para la preparación de antisueros de *Salmonella* (Le Minor et al., 1990).



Fórmula antigénica (O + H) = Serovariedad (Esquema de Kauffmann- White)

(1) OS-A y OS-B

(2) Para revertir una cepa de la forma rugosa a lisa, se realizan subcultivos en agar sangre o Mueller Hinton. Si no es posible revertir la rugosidad, se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar H

(3) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación somática"

(4) HS-1; HS-A; HS-B; HS-C

(5) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación flagelar"

(6) Si la serovariedad de *Salmonella* es difásica y sólo expresa una fase, ver "Método de inversión de fases"

Figura 5.9.1. Proceso de serotipificación de cepas de *Salmonella* spp. por el esquema de Kauffmann- White

Fuente: Caffer y Terragno, 2001

5.11. Resistencia a antibióticos

Para determinar la sensibilidad de los aislados a los antibióticos propuestos, se usaron sensidiscos mediante el Método de Kirby-Bauer. Los halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano se reportaron de acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).

En general, se siguió el mismo procedimiento descrito por Gebreyes et al. (2005). Los antimicrobianos usados para medir la inhibición en el crecimiento bacteriano en las pruebas anteriores, fueron 14: ampicilina (Am; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (Ax; 30 µg), amikacina (Ak; 30 µg), ceftriazona (Cro; 30 µg), cefalotina (Cf; 30 µg), cefotaxima (Ctx; 30 µg), cloranfenicol (Chl; 30 µg), pefloxacina (Pef; 5 µg), gentamicina (Ge; 10 µg), nitrofurantoína (Nf; 30 µg), netilmicina (Net; 30 µg), Trimetoprim sulfametazol (Stx; 250 µg), carbenicilina (Cb; 100 µg) y tetraciclina (Tet; 30 µg) (Cuadro 5.10.1.). Se probó la resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* spp., con muestras de las colonias disueltas en solución salina estéril a una turbidez McFarland 0.5 (aproximadamente 10^8 CFU/ml) en placas de agar Mueller-Hinton incubadas a 37°C con sensidiscos de antibióticos (Figuras 5.10.1. y 5.10.2). Este perfil es utilizado a nivel diagnóstico, además de que en él se incluyen antibióticos que se emplean en México y para los que se ha observado resistencia en cepas de *Salmonella enterica*.

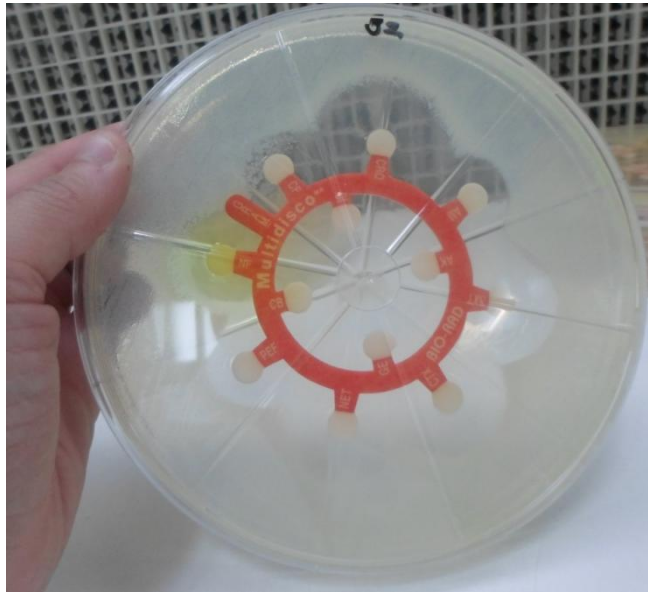


Figura 5.10.1. Susceptibilidad a antibióticos con sensidiscos por el método de Kirby-Bauer

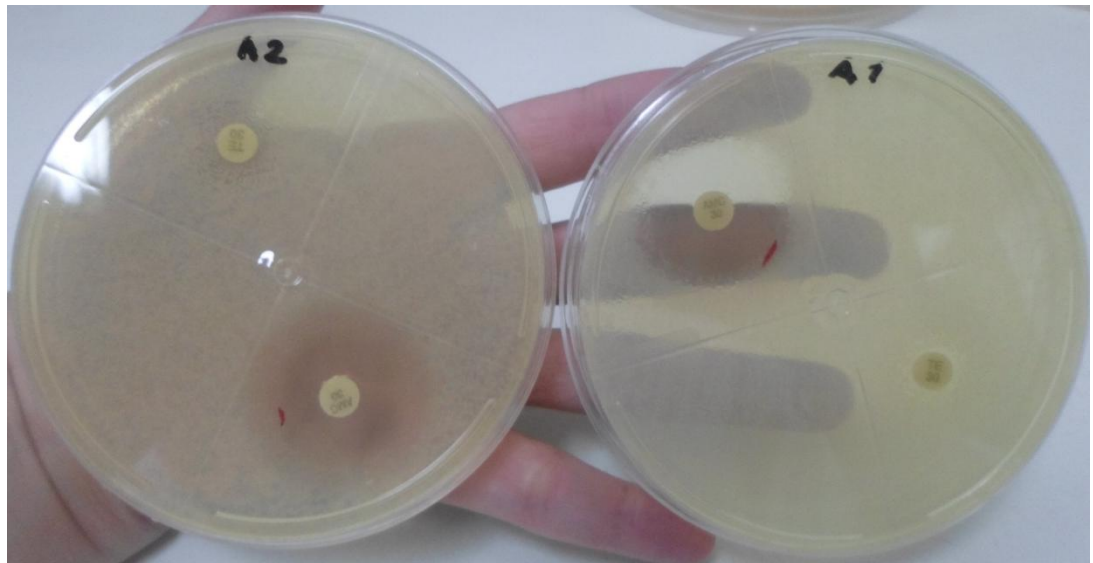


Figura 5.10.2. Cada antibiótico se probó por duplicado, para tener mayor margen de confiabilidad

Cuadro 5.10.1. Lista de los antibióticos que fueron testados en el experimento

ANTIBIÓTICO	SIGLAS	CONCENTRACIÓN (µg)
Ampicilina	Am	10
Amoxicilina/ácido clavulánico	Ax	30
Ceftriazona	Cro	30
Cefalotina	Cf	30
Cefotaxima	Ctx	30
Cefepime	Cp	30
Amikacina	Ak	30
Gentamicina	Ge	10
Netilmicina	Net	30
Cloranfenicol	Chl	30
Pefloxacina	Pef	5
Nitrofurantoina	Nf	30
Trimetoprim-sulfametoxazol	Stx	25
Tetraciclina	Tet	30

Se utilizaron como organismos de control de calidad: *Esherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus. faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Éstos fueron donados por el laboratorio de Microbiología general de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional.

Para medir los halos de inhibición se utilizó una regla (Figura 5.10.3.), contabilizando la distancia (mm) desde el centro del sensidisco hasta donde

empieza a crecer otra vez la bacteria (halo de inhibición). La cifra obtenida se multiplicó por 2 para obtener el valor del diámetro del halo, el cual se comparó con los estándares del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), con el fin de determinar si el aislado era: Resistente (R), Intermedio (I) o Sensible(S), a determinado antibiótico.

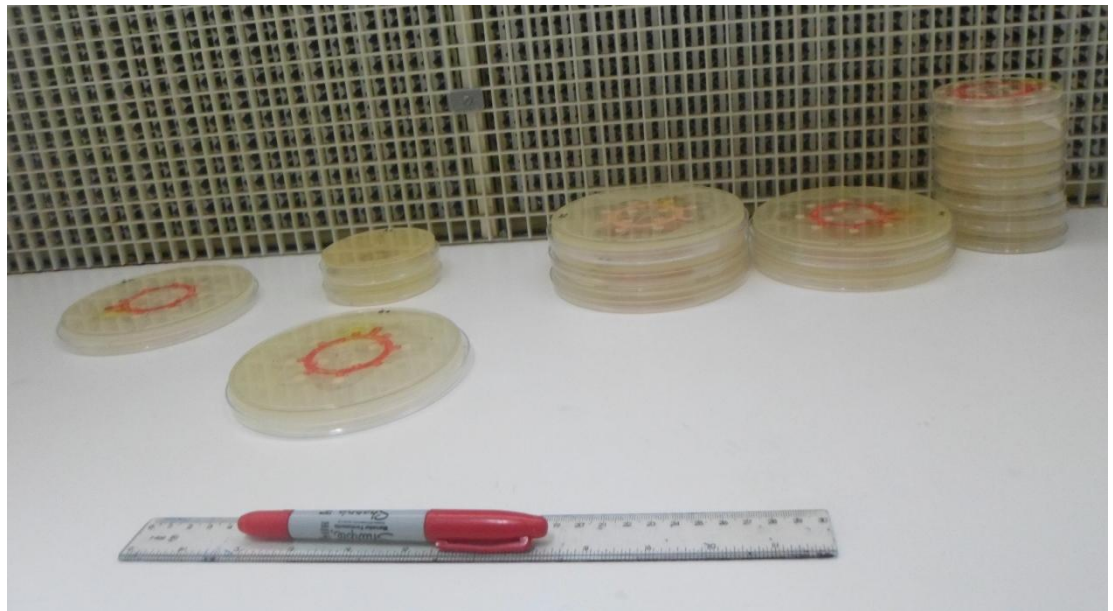


Figura 5.10.3. Medición del halo de inhibición de un grupo de antibióticos en aislados de *Salmonella* spp.

5.12. Análisis de resultados

Para el análisis de los datos obtenidos en este experimento se utilizó estadística descriptiva y se representaron con tablas e histogramas.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación de microorganismos del género *Salmonella*

6.1.1. Muestreo en la Ciudad de México

De las 100 muestras analizadas, 16 fueron positivas a *Salmonella* spp. (16%). En supermercados se encontró una prevalencia de 6% (3/50), en tianguis 40% (2/5), en carnicerías 26.66% (4/15) y en mercados públicos 33.33% (10/30).

De las 16 bandejas de carne molida positivas a *Salmonella* spp., se aislaron 19 cepas puras, a las que se les realizó un antibiograma para los 14 antibióticos propuestos. Las cepas resistentes a más de 3 grupos de antibióticos fueron consideradas como multirresistentes. Todos los aislados fueron resistentes a al menos un antibiótico y se encontraron cepas resistentes hasta a seis antibióticos. De hecho, el 73.7% (14/19) de los aislamientos resultaron multirresistentes.

Se observó que las resistencias más prevalentes fueron: 94.73% (18/19) hacia el β -lactámico ampicilina, así como el 84.21% (16/19) hacia carbenicilina, 78.94% (15/19) hacia tetraciclina, el 68.42% (13/19) hacia sulfa-trimetoprim, el 31.58% (6/19) hacia cefalotina, 31.58% (6/19) hacia gentamicina y el 15.78% (3/19) hacia cloranfenicol y 14.8% (2/19) hacia nitrofurantoína. Encontramos también, 2 cepas resistentes a netilmicina 14.8% (2/19) y una cepa resistente a pefloxacina (Figura 6.2.1.1.).

Las 19 cepas de *Salmonella* spp. fueron identificadas de la siguiente forma: cepas aisladas de tianguis, carnicerías o mercados, designadas S1-S16 (Cuadro 6.2.1.1.); así como 3 cepas aisladas de supermercados, designadas S17-S19. Los serotipos encontrados fueron: Derby, Javiana, Lomita, Senftenberg y Cannstatt. A algunas cepas no se les determinó su serotipo, ya sea porque se contaminaron durante el proceso o porque son cepas no serotificables.

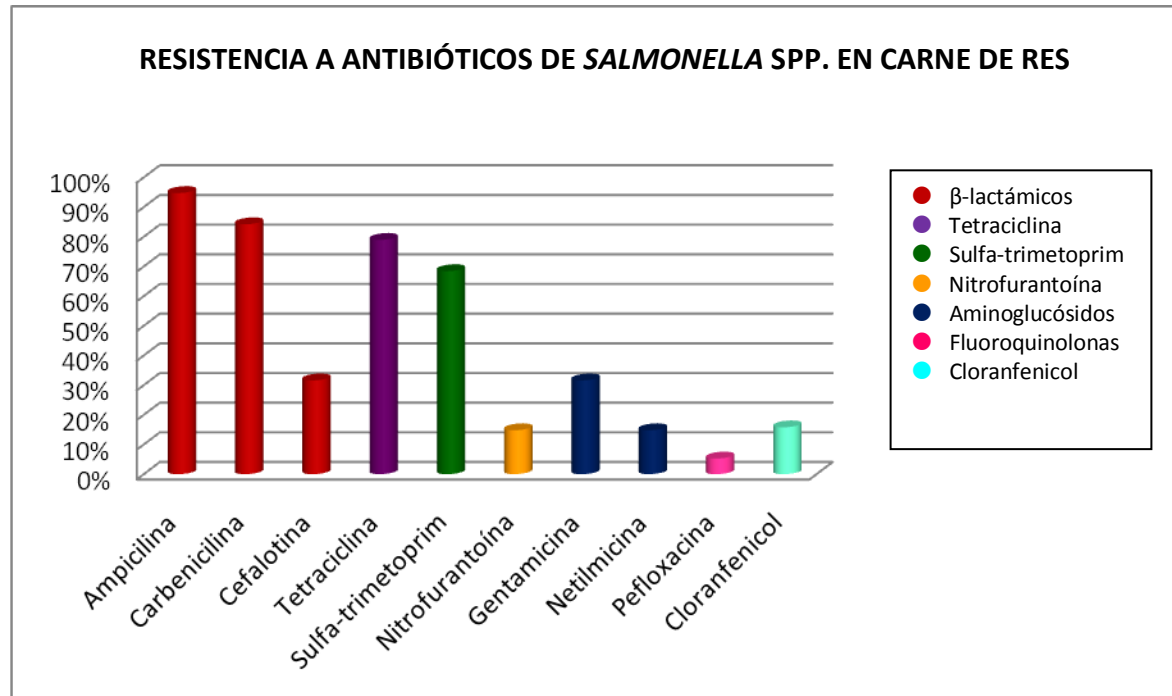


Figura 6.2.1.1. Porcentaje de resistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* spp., aisladas de carne de res molida en la Ciudad de México

Cuadro 6.2.1.1. Perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* spp., aislados de carne molida de res en la Ciudad de México

Identificación de la cepa	Origen	Perfil de resistencia a antibióticos ¹	Resistencia intermedia	Serotipo
S1	Mercado	Am/Cb/Sxt/Tet		Derby
S2	Mercado	Am/Cb/Cf/Chl/Tet	Cro/Ge	Javiana
S3	Mercado	Am/Cb/Cf/Sxt/Ge/Nf/Net/Tet		ND ²
S4	Mercado	Am/Cb/Sxt/Ge/Tet	Nf	ND ²
S5	Mercado	Cb/Nf	Cf/Ge	ND ²
S6	Mercado	Am/Cb/Sxt/Tet		Lomita
S7	Carnicería	Am/Cb/Sxt/Tet		Lomita
S8	Carnicería	Am/Cb/Sxt/Tet		Lomita
S9	Tianguis	Am/Cb/Sxt/Chl/Tet		Senftenberg
S10	Tianguis	Am/Cb/Cf/Sxt/Tet		Lomita

S11	Mercado	Am/Cb/Cf/Sxt/Chl/Ge/Tet	Ak	Senftenberg
S12	Mercado	Am/Cb/Sxt/Pef/Tet	Cf	Lomita
S13	Mercado	Am/Cf/Sxt/Ge/Tet	Cb	Lomita
S14	Mercado	Am/Cf	Cb	Derby
S15	Carnicería	Am	Cb	Derby
S16	Carnicería	Am/Cb		Derby
S17	Supermercados	Am/Cb/Tet		Cannstatt
S18	Supermercados	Am/Cb/Sxt/Ge/Net/Nf		ND ²
S19	Supermercados	Am/Cb/Sxt/Ge		ND ²

¹Am: Ampicilina; Cb: Carbenicilina; Tet: Tetraciclina; Sxt: Sulfa-trimetoprim; Cf: Cefalotina; Nf: Nitrofurantoína;

Ge: Gentamicina; Pef: Pefloxacina; Chl: Cloranfenicol; Net: Netilmicina; Cro: Ceftriaxona; Ak: Amikacina

²ND: No determinado

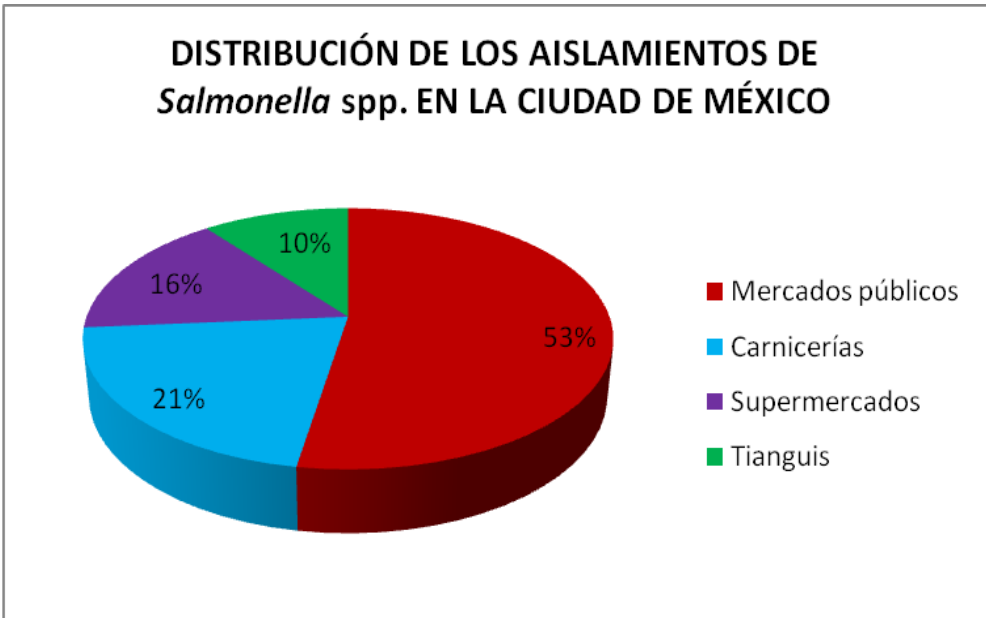


Figura 6.2.1.2. Porcentaje de cepas de *Salmonella* spp. aisladas en la Ciudad de México, en cada uno de los lugares de muestreo. Se aislaron 19 cepas puras de *Salmonella* spp., de las cuales: el 52.63% (10/19) provenía de mercados públicos, el 10.52% (2/19) de tianguis, el 21.05% (4/19) de carnicerías y el 15.79 (3/19) provenía de supermercados

6.1.2. Muestreo en la Ciudad de Guadalajara

Encontramos una prevalencia general de *Salmonella* spp. del 8% (4/50), en carne de res en la ciudad de Guadalajara. No se aisló *Salmonella* de ninguna muestra de carne procedente de tiendas de autoservicio (0/25). Todos los aislamientos obtenidos provenían de mercados (3/20) y de tianguis (1/2). De las 4 muestras positivas a *Salmonella* spp., se aislaron 4 cepas puras, a las que se les realizó un antibiograma para los 14 antibióticos propuestos. Al igual que en la Ciudad de México, todos los aislamientos fueron resistentes a al menos un antibiótico; mientras que uno fue multirresistente.

Se observó que las resistencias más prevalentes fueron: 100% hacia el β -lactámico ampicilina; 75% hacia tetraciclina y 50% hacia cefalotina. Además, el 25% fue resistente a cefotaxima, el 25% a netilmicina y el 25% a carbenicilina (Cuadro 6.2.2.1.).

Cuadro 6.2.2.1. Perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* spp., aislados en la ciudad de Guadalajara

Identificación de la cepa	Origen	Perfil de resistencia a antibióticos¹	Serotipo
S20	Tianguis	Am/Cb/Cf/Tet/Cro/Net	ND ²
S21	Mercado	Am/Cf/Tet	ND ²
S22	Mercado	Am	ND ²
S23	Mercado	Am/Tet	ND ²

¹Am: Ampicilina; Cb: Carbenicilina; Tet: Tetraciclina; Cf: Cefalotina; Net: Netilmicina; Cro: Ceftriaxona

²ND: No determinado

6.1.3. Confirmación molecular

Al inicio del experimento se obtuvieron 31 aislados totales en las ciudades de México, D.F. y Guadalajara, confirmados bioquímicamente como *Salmonella*. Sin embargo, de estos 31 aislados, 23 (S1-S23) fueron confirmados como *Salmonella* por PCR. (Figuras 6.2.3.1. a 6.2.3.4.).

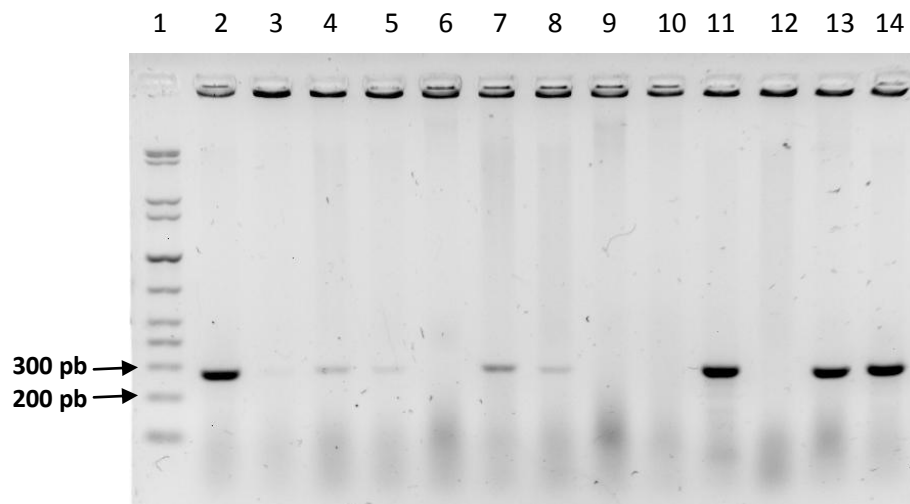


Figura 6.2.3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de *Salmonella* spp., mediante el gen *invA*. Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 4= S23 (+), 5= S4 (+), 7= S15 (+), 8= S7 (+), 11= S9 (+), 13= S10 (+), 14= S1 (+)

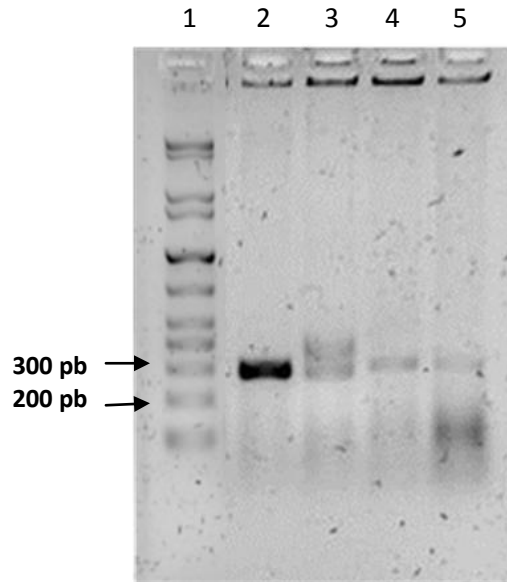


Figura 6.2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de *Salmonella* spp., mediante el gen *invA*. Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 3= Control negativo *E. coli* (EHEC), 4= S2 (+), 5= S3 (+)

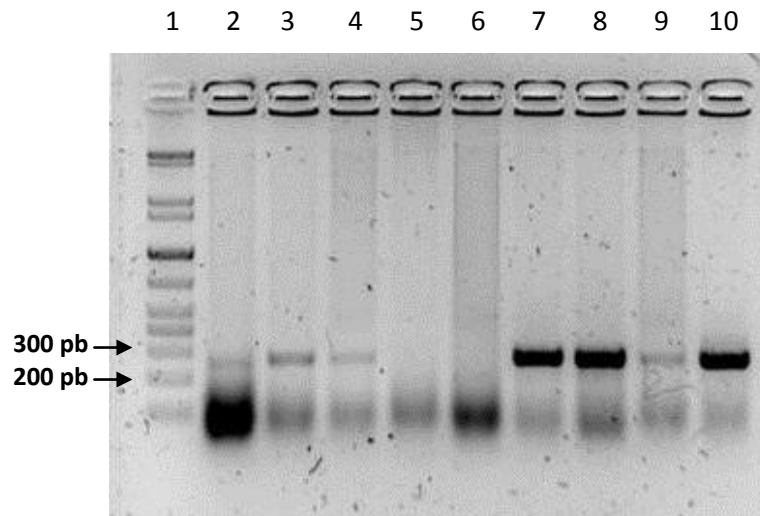


Figura 6.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de *Salmonella* spp., mediante el gen *invA*. Perfiles: 1= Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA ladder; Fermentas), 2= Control +, 3= S22 (+), 4= 18S (+), 7= S13 (+), 8= S8 (+), 9= S19 (+), 10= S17 (+)

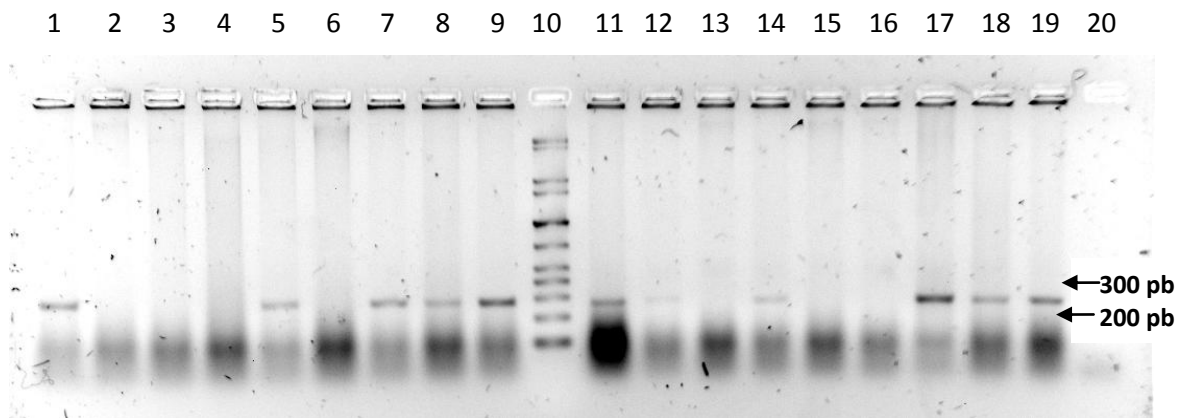


Figura 6.2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio, para identificación molecular de los aislados de *Salmonella* spp., mediante el gen *invA*. Perfiles: 1= S6 (+), 5= S11 (+), 7= S20 (+), 8= S21 (+), 9= S12 (+), 10= Marcador de Peso Molecular (1 kb), 11= Control + (*Salmonella* spp.), 12= S14 (+), 14= S16 (+), 17= S15 (+), 18= S5 (+), 19= S4 (+) y 20= Control de Reacción (sin ADN)

7. DISCUSIÓN

México, a diferencia de los países industrializados, no posee sistemas de vigilancia que permitan saber a ciencia cierta el perfil de resistencia a antibióticos, de los serotipos de *Salmonella* en carne y el riesgo que esto representa en la salud pública. Los límites de tolerancia establecidos para *Salmonella* en carne rastros en México (NOM-194-SSA1-2004), no corresponden a la realidad en el país; nuestro trabajo está enfocado a carne de venta al público, no en rastro, pero consideramos importante hacer esta mención. Además, las normas para controlar el uso de los medicamentos en animales y humanos en México, no están siendo efectivas. La Ley General de Salud (LGS) no hace ninguna mención específica sobre antibióticos o resistencia bacteriana. En cuanto al uso de antibióticos en animales, sólo se prohíbe el uso de cloranfenicol en la formulación de productos alimenticios para animales (NOM-061-ZOO-1999). Por otra parte, la NOM-004-ZOO-1994 prohíbe los residuos de cloranfenicol en músculo, pero permite cantidades residuales de muchos otros antibióticos. En este trabajo se encontró una prevalencia alta de serotipos de *Salmonella* multirresistente en carne molida de res de venta al público. Los serotipos presentaron resistencia a antibióticos usados actualmente en terapéutica humana. Se presentaron resistencias hacia cloranfenicol.

Las infecciones causadas por *Salmonella* requieren frecuentemente tratamiento antibiótico. Sin embargo, la falta de control en el uso de antibióticos en medicina veterinaria y humana, ha generado fenotipos de *Salmonella* resistentes a múltiples fármacos. El seguimiento continuo de la prevalencia y resistencia de las cepas presentes en alimentos, es necesario debido a las implicaciones de la propagación de microorganismos resistentes (Hur, Jawale y Lee, 2012).

En estudios realizados anteriormente en países del primer mundo, se han encontrado bajas prevalencias de *Salmonella* en carne molida. Por ejemplo, Estados Unidos muestra una baja prevalencia de *Salmonella* spp. en carne molida

de res (0.66%) (Vipham et al., 2012), atribuible a su mayor control y regulación en los procesos de matanza y comercialización de proteína animal. Incluso, existen países como Canadá donde no se ha encontrado *Salmonella* en carne de res molida, como lo refiere un estudio en Alberta Canadá (Aslam et al., 2012).

En México, Miranda et al. (2009) encontraron una prevalencia de *Salmonella* del 15.1% en carne de res, de venta en carnicerías y supermercados del Estado de Hidalgo México. Estos resultados son similares a los datos reportados por nosotros en este estudio, nuestro porcentaje de prevalencia fue del 16%.

En nuestro estudio los aislados de *Salmonella* presentaron el 14.81% de resistencia a cloranfenicol en la Ciudad de México, no se encontró resistencia en los aislados de Guadalajara. Aunque la Norma Oficial Mexicana 004 (NOM-004-ZOO-1994), prohibió el uso de cloranfenicol en los animales para abasto, encontramos aislados resistentes a este antibiótico. En el estudio realizado por Miranda et al. (2009), encontraron que el 23.1% de las Salmonelas aisladas de carne de res en el Estado de Hidalgo México, fueron resistentes a cloranfenicol. Ambas regiones, el Distrito Federal y el Estado de Hidalgo, son cercanas entre sí y podrían tener los mismos canales de abastecimiento de carne. Estos centros de producción podrían estar utilizando todavía el cloranfenicol en producción animal. También es posible que se generaran cepas resistentes a este antibiótico, antes de que fuera prohibido su uso y estas cepas aun persistan en el medio ambiente.

En el caso del antibiótico sulfa-timetoprim, se permite su uso en animales para abasto y se acepta una concentración de residuos de hasta 0.100 ppm de sulfonamidas en carne de res (NOM-004-ZOO-1994). En nuestro trabajo, encontramos una resistencia hacia este antibiótico de 59.25% en el Distrito Federal, no se encontró resistencia en la ciudad de Guadalajara. Al observar la alta resistencia de los aislados hacia este antibiótico, sería importante considerar el prohibir el uso de este antibiótico, ya que el mismo se sigue usando activamente

en terapéutica humana para el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Cabe mencionar, que en el estudio de Miranda et al. (2009), también se observa un alto porcentaje (21.8%) de resistencia a este antibiótico.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Es usada en medicina veterinaria y humana en el tratamiento de múltiples infecciones, incluyendo septicemias, meningitis, peste, neumonías, entre otras. Tomando en cuenta su amplio rango de uso en tratamientos infecciosos, se debe vigilar a las cepas resistentes a este antibiótico y su capacidad de transmitir esta resistencia a otras bacterias. En nuestro estudio se encontró una resistencia a gentamicina del 29.62% de los aislados, en la Ciudad de México. También aislamos en la Ciudad de México, dos cepas resistentes a netilmicina (Net), una proveniente de un mercado público y la otra de supermercado. Este antibiótico aminoglucósido es usado como alternativa terapéutica en el tratamiento de bacterias resistentes a gentamicina. El que hayamos aislado en este estudio a *Salmonelas* resistentes a gentamicina y a netilmicina es alarmante, pues sugiere que el control en el uso de medicamentos es deficiente, lo que puede tener consecuencias graves para la salud pública.

En la Ciudad de México, se obtuvieron tres aislados de *Salmonella* resistentes a nitrofurantoína. Este medicamento se utiliza para tratamiento de infecciones urinarias y es considerado un “Medicamento esencial (ME)” según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En los aislados obtenidos en la ciudad de Guadalajara, se encontró resistencia principalmente a: ampicilina (Am), carbenicilina (Cb), cefalotina (Cf) y tetraciclina (Tet). Un aislado proveniente de tianguis, fue resistente además a netilmicina y ceftriaxona. Los aislados obtenidos en la ciudad de Guadalajara, fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos probados. Lo anterior obedece al parecer, a un mayor control sanitario en la producción y comercialización de la carne, así como en la distribución de los medicamentos. Por otro lado, el número de muestra en la

ciudad de Guadalajara fue menor al de la Ciudad de México, esto se vio reflejado en los pocos aislados obtenidos en la ciudad de Guadalajara (4/50). Ninguno de los aislados de la ciudad de Guadalajara fue serotipificado. Lo anterior se debió a contaminación en el proceso de serotipificación o a la presencia de *Salmonellas* no serotificables.

Los serotipos encontrados en la Ciudad de México fueron: Derby, Javiana, Lomita, Senftenberg y Cannstatt. *Salmonella* Derby es uno de los principales serotipos aislados de muestras humanas y de alimentos en México (Gutiérrez et al., 2000; Zaidi et al., 2006). El perfil de resistencia a antibióticos de este serotipo fue principalmente AmCbCf, pertenecientes al grupo de los betaláctámicos; fenómeno bastante común, ya que para tratar la salmonelosis se recetan principalmente medicamentos de este grupo. Un aislado de *Salmonella* Derby fue multirresistente, mostrando el patrón de resistencia AmCbSxtTet. Este patrón es común en serotipos aislados de carne de res, carne de cerdo y aves, e infecciones nosocomiales (Zaidi et al., 2006).

Otro de los serotipos aislados fue *Salmonella* Javiana. En el estudio realizado por Gutiérrez et al. (2000) se aisló a *Salmonella* Javiana de alimentos y enfermos con diarrea, aunque no fue de los serotipos más prevalentes. Por otro lado, en Estados Unidos, *S. Javiana* es uno de los principales serotipos implicados en salmonelosis en humanos (CDCP, 2010). Está relacionada con síntomas típicos de salmonelosis, incluyendo a veces complicaciones como meningitis, abscesos hepáticos y colecistitis (CDCP, 2010; Mezal et al., 2013). En nuestro estudio obtuvimos un aislado de *Salmonella* Javiana resistente a betaláctámicos (AmCbCf) cloranfenicol y tetraciclina. También manifestó resistencia intermedia a ceftriaxona y gentamicina. Este patrón de resistencia se ha observado en otros serotipos aislados de carne de res y otras fuentes en México (Zaidi et al., 2006).

Salmonella Lomita correspondía a una gran mayoría de los aislados encontrados en nuestro estudio. Este serotipo no ha sido reportado en trabajos anteriores en

México, en infecciones nosocomiales o en alimentos. En el mundo, este serotipo es conocido como un patógeno causante de fiebre entérica y transmitido por alimentos (Osman et al., 2014). *Salmonella* Lomita se encuentra referida en estudios enfocados a aves, las palomas parecen ser un importante vector, y los roedores actúan como reservorios de la bacteria, manteniéndola en las poblaciones de palomas (Osman y Marouf, 2014). Las palomas y roedores son una fuente de contaminación al dispersar bacterias de importancia en salud pública como *Salmonella*, que puede llegar a contaminar los alimentos. La mayoría de los aislados de *S. Lomita* presentaron un patrón de resistencia común AmCbCfSxtTet. Un aislado además presentó resistencia a pefloxacina y otro a gentamicina. La vigilancia de cepas resistentes a pefloxacina es de gran importancia, ya que las fluoroquinolonas son el tratamiento común utilizado para tratar casos de salmonelosis entérica en adultos (INFOSAN, 2005).

Por otro lado, *S. Senftenberg* y *S. Cannstatt* han sido reportados en servicios de salud en México en fuentes humanas y provenientes de alimentos, aunque *S. Cannstatt* en baja proporción (Gutiérrez et al., 2000). En México se ha aislado a *S. Senftenberg* de canales de cerdo, provenientes de Michoacán y sacrificados en el Estado de México (Talavera et al., 2011). El aislado de *S. Senftenberg* mostró además de la resistencia común de la mayoría de los aislados (AmCbCfSxtTet), resistencia hacia cloranfenicol. En el estudio realizado por Talavera et al. (2011) en canales de cerdo, se identificó la resistencia de *S. Senftenberg* hacia cloranfenicol, mediada por el gen *cmlA/tetR*.

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella* y las principales serovariedades de *Salmonella* asociadas a alimentos específicos, así como su perfil de resistencia a antibióticos. Carecemos de infraestructura y un sistema de vigilancia interdisciplinario entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario. Al no tener esta información, no se puede verificar que las intervenciones microbiológicas realizadas durante toda la cadena de obtención de

proteína animal, hasta su llegada al punto de venta, estén realizándose adecuadamente (Zaidi et al., 2006). La vigilancia de los perfiles antimicrobianos de las diferentes serovariedades de *Salmonella*, debe ser de alta prioridad debido al riesgo que representan para la población las cepas multirresistentes a antibióticos. La presencia de serotipos de *Salmonella* multirresistente en carne de res molida de venta al público en México, evidencia la necesidad de vigilar la contaminación por *Salmonella* durante toda la cadena productiva. En base a nuestros resultados y los resultados encontrados en trabajos anteriores, se debería modificar la actual Ley General de Salud (LGS), para que haga menciones específicas que ayuden a disminuir las resistencias a antibióticos. En cuanto al uso de antibióticos en medicina veterinaria, las actuales NOM-061-ZOO-1999 y NOM-004-ZOO-1994, son insuficientes. La NOM 061 (NOM-061-ZOO-1999) debería prohibir muchos otros antibióticos en formulaciones para animales, además del cloranfenicol. La NOM 004 (NOM-004-ZOO-1994), debería de la misma forma, prohibir residuos de antibióticos como sulfas, aminoglucósidos y tetraciclina. Todo lo anterior ayudaría disminuir el riesgo en el país, de seguir desarrollando cepas de *Salmonella* multirresistentes a antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acha NP, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2nd ed. Organización Panamericana de la Salud, 1997.
2. Agasan A, Kornblum J, Williams G, Pratt C, Fleckenstein P, Wong M, *et al.* Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Subspecies I) Serotype 4,5,12:i:- Strains Causing Food-Borne Infections in New York City. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 1924-1929.
3. Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE. Type 1 Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bind to Enterocytes and Contribute to Colonization of Swine In Vivo. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6446-6452.
4. Antad. (12 del 10 del 2012). *Antecedentes: Antad, A.C.* Obtenido de sitio web de Antad: <http://antad.net/>
5. Arslan S, Eyi A. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *J Food Prot* 2010; 73(9): 1613-1617.
6. Asheg AA, Levkut M, Revajova V, Sevcikova Z, Kolodzieyski L, Pistl J. Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. *Acta Veterinaria Brno* 2003; 72(3): 359-364.
7. Aslam M, Checkley S, Avery B, Chalmers G, Bohaychuk V, Gensler G, *et al.* Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiol* 2012 12 Oct ; 32(1): 110-117.
8. Bacteriological Analytical Manual BAM. 8th Edition. Revision A, 1998.
9. Bauer AW, Kirby E, Sherris EM, Turk M. Antibiotic by standarized single disk method. *Am J Clin Path* 1966 Apr; 45: 493-496.
10. Bearson LB, Wilson L, Foster JW. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. *J Bacteriol* 1998 Jul; 180(14): 3734.
11. Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. 9th Edition, 1984.

12. Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Koohmaraie M. Prevalence and Characterization of Salmonellae in Commercial Ground Beef in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2009; (7): 1892-1900.
13. Caffer MI, Terragno R. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio de Enterobacterias; 2001.
14. Camacho OR, Acevedo RL, Moreno IG, Sánchez MR, Castellón CL, Navarro NM. Detección de *Salmonella* resistente a antibióticos en vísceras de pollo. *BIOtecnica* Enero-abril 2010; Vol. XII, N°1.
15. Cancho GB, García FMS, Simal GJ. El uso de antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc Tecnol Aliment* 2000; 3(1): 39-47.
16. Centers for Disease Control and Prevention CDC. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. U.S. Department of Health and Human Services, 2008, CDC, Atlanta, GA.
17. Centers for Disease Control and Prevention CDCP 2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 States, 2009. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA.
18. Charles-Hernández GL, Medina-Solís CE, Hernández-Romano J. Prevalencia de *Salmonella* spp. en alimentos en el estado de Tamaulipas durante el año 2005. *Rev Invest Clin* 2007; 59(6): 437-443.
19. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. *Clin Lab Standards Instit* 2006; 26(3).
20. Darwin KH, Miller VL. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999 July; 12(3): 405-428.
21. De Ley J, Seger SP, Gillis M. Intra- and intergeneric similarities of *Chromobacterium* and *Janthinobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *JSEM* 1978 April; 28: 154-168.

22. Denny J, Boelaert F, Borck B, Heuer OE, Ammon A, Makela P. Zoonotic infections in Europe: trends and figures-a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Eurosurveillance* 2007; 12(51).
23. Dreser A, Wirtz VJ, Corbett KK, Echániz G. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Púb Mex* 2008; 50(4): 480-7.
24. Duncan MJ, Mann EL, Cohen MS, Ofek I, Sharon N, Abraham SN. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. *J Biol Chem* 2005; 280: 37707–37716.
25. Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *T in Microbiol* 1998; 6(7): 282–287.
26. Espinal LP, Prieto E, Otero V, Máttar S. Presencia del gen de invasividad *invA* en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cub Salud Púb* 2006; 32(2): 115-120.
27. FDA. (8 del 11 del 2012). Food and Drug Administration. FDA to protect important class of antimicrobial drugs for treating human illness. Obtenido de sitio web de FDA: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm285704.htm>
28. Figueroa OI, Verdugo RA. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Review article. *Rev Latinoam Microbiol* 2005; 47(1-2).
29. Flores CE, Núñez EJF, Rubio LMS, Alcázar MC, Reynaga OJ, Vite RH. Calidad sanitaria de la carne fresca de bovino nacional e importada en los supermercados de tres ciudades mexicanas. XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 2003 del 27 al 31 de octubre, México DF.
30. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 1–11.
31. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 2008; 86: E149–E162.

32. Foley SL, Nayak R, Hanning I, Johnson TJ, Jing H, Ricke SC. Population Dynamics of *Salmonella enterica* Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. Minireview. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(13): 4273-4279.
33. Forsythe JS. The microbiology of safe food. Second Edition. Wiley Blackwell, 2010.
34. Gebreyes AW, Thakur S. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Muenchen from Pigs and Humans and Potential Interserovar Transfer of Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2): 503-511.
35. Godínez G, Reyes JA, Zúñiga A, Sánchez I, Castro J, Román AD, *et al.* Condiciones microbiológicas en cuatro rastros municipales del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Centro de Investigaciones Químicas; Ciudad Universitaria; 42076 Pachuca, Hidalgo, México.
36. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th ed. Paris: World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, 2007.
37. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoletit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PAD, *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann Le Minor Scheme. *Research in Microbiology* 2010; 161: 26-29.
38. Gutiérrez-Gogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Públ Mex* 2000; 42: 490-495.
39. Hernández CC, Aguilera AMG, Castro EG. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol* 2011; 31(4): 137-151.
40. Hernández SS, Zúñiga EA, Sánchez OI, Castro RJ, Román GA, López SE. Microbiological conditions during the slaughter process at a municipal slaughterhouse in Hidalgo, Mexico. *Vet Méx* 2007; 38(2): 187-195.
41. Heredia N, Garcia S, Rojas G, Salazar L. Microbiological condition of ground meat retailed, in Monterrey, Mexico. *J Food Prot* 2011; 64(8): 1249-51.

42. Hueck CJ, Hantman MJ, Bajaj V, Johnston C. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. *Molec Microbiol* 1995; 18(3): 479–490.
43. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Res Int* 2012; 45(2): 819-83.
44. Red Internacional de Autoridades en Inocuidad de los Alimentos INFOSAN. Resistencia antimicrobiana a *Salmonella*. Nota de Información INFOSAN. 13 de abril del 2005.
45. Jawetz, Melnick, Adelberg's. Medical microbiology. In: Geo FB, Karen CC, Janet SB and Stephen AM. Pp 270-273, 24th ed. McGraw Hill International edition, 2007.
46. Kaferstein FK, Motarjemi Y, Bettcher DW. Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg Infect Dis* 1997 Oct-Dec; 3(4): 503–510
47. Knudsen GM, Nielsen MB, Grassby T, Danino-Appleton V, Thomsen LE, Colquhoun IJ, *et al.* A third mode of surface-associated growth: immobilization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates the RpoS-directed transcriptional programme. *Environ Microbiol* 2012 August; 14(8): 1855–1875.
48. Kaniga K, Tucker S, Trollinger D, Galán JE. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol* 1995; 177(14): 3965-3971.
49. Le Minor L, Popoff MY, Bockemühl J. Supplement 1989 (n° 33) to the Kauffmann-White scheme 1990; 141(9): 1173–1177.
50. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 8ª edición. Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. Pearson Education, 2003.
51. Martínez MA, Navarrete VJ, Zeckua HA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella* Enteritidis obtenidos de aves en México. *Tec Pecu Méx* 2004; 42(2): 287-294.
52. Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* 2007; 4(2): 115-33.

53. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, *et al.* Food related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 607-625.
54. Mezal HE, Stefanova R, Khan AA. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 2013; 164: 113–118.
55. Miranda JM, Mondragon AC, Martinez B, Guarddon M, Rodriguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* 2009; 72(5): 966-71.
56. Molbak K. Human Health Consequences of Antimicrobial Drug—Resistant *Salmonella* and Other Foodborne Pathogens. *Clin Infect Dis* 2005; 41(11): 1613-1620.
57. Molla B, Alemayehu D, Salah W. Sources and distribution of *Salmonella* serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personnel and retail meat products in Ethiopia: 1997-2002. *Ethiopian J of Health Develop* 2003; 17(1): 63-70.
58. Moreno SA, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:- Foodborne Pathog Dis 2009; 6(4).
59. Narvaez-Bravo C, Miller MF, Jackson T, Jackson S, Rodas-Gonzalez A, Pond K, *et al.* *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in Mexico. *J Food Protect* 2013; 5: 744-918.
60. Norma Oficial Mexicana. NOM-004-ZOO-1994. Bienes y Servicios. “Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo”.
61. Norma Oficial Mexicana. NOM-061-ZOO-1999. Bienes y Servicios. “Especificaciones zosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal”.
62. Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

63. Norma Oficial Mexicana. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos”.
64. Norma Oficial Mexicana. NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. “Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos”.
65. Norrung B, Buncic S. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Sci* 2008; 78(1–2): 14–24.
66. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacteria innovation. Review article. *Nature* 2000; (405): 299–305.
67. Osman MK, Marouf HS. Comparative dendrogram analysis of OMPs of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis with Typhimurium, Braendurup and Lomita isolated from pigeons. *Int J Adv Res* 2014; 2(1): 952-960.
68. Osman MK, Marouf HS, Mehana OA, Alatfeehy N. *Salmonella enterica* serotypes isolated from squabs reveal multidrug resistance and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2014; 33(3).
69. Pérez-Montaña JA, González-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* 2012 May; 75(5): 867-73.
70. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, *et al.* ¿Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemoth* 2004; 53: 28–52.
71. Plym LF, Wierup M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech* 2006; 25: 541–554.
72. Pond A. 2010. *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 prevalence and generic *E. coli* quantitative baselines in raw, pork and beef at retail outlets in Mexico. Animal and Food Sciences thesis. Texas Tech University–Lubbock.

- 73.** Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Res microbiol* 2003; 154(3): 173-174.
- 74.** Popoff MY, Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 1992 6th revision. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris.
- 75.** Popoff MY, Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 1997 7th revision. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris.
- 76.** Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Prob* 1992; 6: 271-279.
- 77.** Rottner K, Stradal TEB, Wehland J. Bacteria-Host-Cell Interactions at the Plasma Membrane: Stories on Actin Cytoskeleton Subversion. *Develop Cell* 2005; 9(1): 3–17.
- 78.** Rubio LM. Matanza y procesamiento TIF vs. rastro municipal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- 79.** Samaxa RG, Matsheka MI, Mpoloka SW, Gashe BA. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from a variety of raw meat sausages in Gaborone (Botswana) retail stores. *J Food Prot* 2012 Apr7; 5(4): 637-42.
- 80.** Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 7–15.
- 81.** Sibhat B, Molla ZB, Zerihun A, Muckle A, Cole L, Boerlin P, *et al.* *Salmonella* Serovars and Antimicrobial Resistance Profiles in Beef Cattle, Slaughterhouse Personnel and Slaughterhouse Environment in Ethiopia. *Zoonoses Public Hlth* 2011; 58(2): 102–109.
- 82.** Singh S, Agarwal RK, Tiwari SC, Singh H. Antibiotic resistance pattern among the *Salmonella* isolated from human, animal and meat in India. *Trop Anim Hlth Prod* 2012 Mar; 44(3): 665-74.

83. Talavera RM, Varela GJA, Reyes RNE, Lagunas BS, Valladares CB, Uxua M, *et al.* Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. strain genotypes isolated from pigs slaughtered at abattoirs in the Estado de México. *Vet Méx* 2011; 42(4).
84. Téllez-Moreno AL, Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Gómez-Almazán SE, Vaca-Pacheco S. Resistencia múltiple a antibióticos de *Salmonella* spp. detectada en alimentos por PCR multiplex. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Laboratorio de Análisis Clínicos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala*, 2008, UNAM.
85. Torres C, Zarazaga M. Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. *Rev Esp Quimioterapia* 1998; 11: 29-35.
86. Valdezate S, Arroyo M, González-Sanz R, Ramiro R, Herrera-León S, Usera MA, *et al.* Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain. *J Food Prot* 2007 Dec; 70(12): 2741-8
87. Velge P, Cloeckeaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res* 2005; 36: 267-288
88. Vipham JL, Brashears MM, Loneragan GH, Echeverry A, Brooks JC, Chaney WE, *et al.* *Salmonella* and *Campylobacter* baseline in retail ground beef and whole-muscle cuts purchased during 2010 in the United States. *J Food Prot* 2012; 75(12): 2110-5.
89. WATTAGNET, Nuevo reglamento de control para el uso de antibióticos en UE prevenir Comité de Agricultura de la Unión Europea establece un nuevo reglamento con una serie de medidas para el exceso de uso de antibióticos. Consulta electrónica, abril del 2012.
90. White PL, Naugle AL, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Rose BE, Pritchard KM, *et al.* *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. *J Food Prot* 2007 Mar; 70(3): 582-91.
91. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987 June; 51(2): 221–271.

92. Yan H, Li L, Alam MJ, Shinoda S, Miyoshi S, Shi L. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China. *Int J Food Microbiol* 2010 Oct 15; 143(3): 230-4.
93. Zaidi MB, Mcdermott PF, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, *et al.* Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatán, México. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 21-8.
94. Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteric Serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(21): 6656-6662.
95. Zewdu E, Cornelius P. Antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* serotypes isolated from food items and personnel in Addis Ababa, Ethiopia. *Trop Anim Hlth Prod* 2009 Feb; 41(2): 241-249.

