



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Detección molecular de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli* diarrogénica a partir de huevo**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A:**

**MVZ. SALVADOR EDUARDO ACEVEDO MONROY**

Tutora:

**DRA. CECILIA ROSARIO CORTÉS**

Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; UNAM

Comité tutor:

**DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**

Laboratorio de Microbiología Molecular; Departamento de Microbiología e Inmunología: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; UNAM

**DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**

Unidad Periférica de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas: Departamento de Salud Pública/División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM; Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana; Unidad de Hemato Oncología e Investigación: Hospital Infantil de México Federico Gómez; UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. M.x.

Junio 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“De golosos y tragones,  
están llenos los panteones”*

Refrán popular mexicano

*“Tarda en llegar y al final, al final hay recompensa...  
en la zona de promesas”*

Gustavo Cerati

Dedicatoria:

A mi Dios Yahvé por darme una vez más un reto a superar en la vida.

A ILEANA, LEILANI Y MITZY; mis motores en esta búsqueda incesante, LAS AMO.  
Gracias por toda la paciencia y amor.

A mi mamá BERTHA en muestra de que su esfuerzo y cariño han dado frutos.

A mis hermanos Dulce y Jorge, que son una inspiración de profesionistas y de unidad familiar.

A la Dra. Atlantida Margarita Raya Rivera, porque todos los trabajos de investigación derivan a que personas brillantes como ella salven vidas. Gracias por retornarle su salud a mi hija ILEANA.

A todos aquellos jóvenes que son y fueron mis alumnos.

A todos aquellos para los que este trabajo sea útil.

## Agradecimientos

A la UNAM, mi alma mater por siempre.

A la FMVZ por ofrecerme todas las herramientas profesionales y de vida.

Al CONACYT por el apoyo para la realización de este trabajo

A la Dra. Cecilia Rosario por ofrecerme esta oportunidad y el apoyo otorgado.

Al Dr. Antonio Verdugo, que por tantos años me ha otorgado mucha confianza, apoyo y herramientas para mi desarrollo, no solo profesional también personal.

Al Dr. Carlos Eslava por todo el apoyo otorgado, la confianza y la ayuda que me ha ofertado, incluyendo las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo como controles

Al Dr. Daniel Martínez de la UAM-XOCH por las cepas de *Campylobacter* empleadas como control en este trabajo.

Al Dr. Ulises Hernández Chiñas por el apoyo técnico durante la tipificación de la cepa 18.

Al Dr. Armando Navarro por su apoyo en la serotipificación de las cepas control empleadas en este trabajo.

Al Dr. Evaristo A. Barragán por la asesoría prestada para elaborar un adecuado plan de muestreo.

A la Dra. Cristina Rodríguez por la cepa de *E. coli* usada como control negativo en este trabajo.

A Julio Méndez que a pesar de no figurar como mi tutor, su opinión y orientación ha sido fundamental para muchas decisiones en mi trabajo y vida profesional.

A Leonardo Villavicencio, que me ha estado enseñando paciencia y formación como docente.

A Carlos Vilchis por su gran aporte a este trabajo durante la fase inicial

A Saúl Cruz por todos los consejos que enriquecieron mi trabajo.

A mis compañeros y del laboratorio: Julio, Saúl, Carlos V., Rodrigo, Cloé, Leonardo, Crescenciano, Andrea, Isaac y Dalia por el compañerismo, las opiniones y la amistad incondicional.

A mis compañeros del laboratorio Lázaro, Ninnet, Silvia, Adolfo y Jocelyn por sus consejos para mejorar este trabajo.

A mi jurado, Dr. Juan Carlos del Río, Dra. Inda Marcela Figueroa y Dr. José Quintana por todas las observaciones valiosas a este trabajo.

A la Dra. María Antonieta Mójica que siempre me ha prestado apoyo incondicional como madre y consejera.

Al Dr. Raymundo Iturbe por sus consejos de vida y apoyo personal

A mi primo Armando Ramírez por sus constantes e insistentes palabras de aliento para entregarme a la investigación.

A los Dptos. de Microbiología e Inmunología y Medicina y zootecnia de aves.

A la familia Cantillo Sánchez por seguir tendiéndome la mano en todo momento.

A Mauro, Abraham y Daniel Reyes; amigos inseparables desde mi juventud.

A Vanessa Luviano y su participación imprevista en esta etapa.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>Índice de figuras</b> .....	7
<b>Índice de cuadros</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVO</b> .....	16
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
- Medios de cultivo y cepas bacterianas .....	16
- Extracción de ADN, iniciadores y Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	16
- Curva de crecimiento bacteriana .....	18
- Cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) .....	19
- Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción .....	19
- Cálculo de toma de muestras .....	19
- Aislamiento e identificación bacteriana .....	20
- Extracción de ADN y PCR a partir de las muestras .....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	22
- Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	22
- Iniciadores y PCR .....	22
- Curva de crecimiento bacteriano .....	25
- Conteo de Unidades Formadoras de Colonia a partir de las diluciones en PBS .....	29
- Concentración mínima detectable a partir de las diluciones en PBS .....	29
- Concentración mínima detectable y saturación de la reacción .....	30
- Colección y toma de muestras .....	31
- Aislamiento bacteriológico .....	31
- PCR a partir de las muestras de huevo .....	32
- Enriquecimiento de la muestra previo a la prueba molecular .....	33
- Identificación de la cepa de <i>E. coli</i> aislada de la muestra 18 .....	35
<b>DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>CONCLUSIONES</b> .....	42

<b>PROSPECTIVA</b> .....	43
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	44
<b>Anexo 1. Medios de Cultivo</b> .....	48
<b>Medios de cultivo en caja de Petri</b> .....	48
<b>Medios de cultivo en tubo</b> .....	51
<b>Anexo 2. Soluciones</b> .....	59
<b>Soluciones para electroforesis</b> .....	59
<b>Soluciones para extracción de ADN</b> .....	60
<b>Soluciones y reactivos para la PCR</b> .....	61
<b>Anexo 3 Antibiogramas de cepas aisladas</b> .....	62

## Índice de figuras

Figura 1.	Países consumidores de huevo entero.....	12
Figura 2.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>invA</i> .....	22
Figura 3.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>flaA</i> .....	23
Figura 4.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>bfpA</i> .....	23
Figura 5.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>eaeA</i> .....	23
Figura 6.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>stx1</i> .....	23
Figura 7.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>stx2</i> .....	23
Figura 8.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>sta</i> .....	24
Figura 9.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>lta</i> .....	24
Figura 10.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>ial</i> .....	24
Figura 11.	Alineamiento <i>in silico</i> de primers <i>aggR</i> .....	24
Figura 12.	Productos de la PCR obtenidos a partir de las cepas control; EHEC, EPEC y ETEC.....	24
Figura 13.	Productos de la PCR obtenidos a partir de las cepas control; SE y EAEC .....	25
Figura 14.	Productos de la PCR obtenidos a partir de las cepas control; Cj y Cc..	25
Figura 15.	Productos de la PCR obtenidos a partir de las cepas control; EIEC y Ss.....	25
Figura 16.	Gráfica de crecimiento SE.....	26
Figura 17.	Gráfica de crecimiento EPEC.....	26
Figura 18.	Gráfica de crecimiento EIEC.....	27
Figura 19.	Gráfica de crecimiento EHEC.....	27
Figura 20.	Gráfica de crecimiento EAEC.....	28
Figura 21.	Gráfica de crecimiento ETEC.....	28
Figura 22.	Gráfica de crecimiento <i>C. jejuni</i> .....	29
Figura 23.	PCR a partir de diluciones de SE en PBS .....	30
Figura 24.	Extracción de ADN de cepas control.....	30
Figura 25.	PCR para detección de Salmonella en muestras de huevo .....	33
Figura 26.	PCR a partir de diluciones de SE en caldo Rappaport, a partir extracción con Tiocianato de guanidina.....	34
Figura 27.	PCR a partir de diluciones de SE en caldo Rappaport, a partir de extracción con DNazol.....	35
Figura 28.	PCR a partir de diluciones de SE en caldo Rappaport, a partir de extracción con Kit Qiagen.....	35
Figura 29.	PCR a partir de diluciones de SE en caldo Rappaport, a partir extracción con Tiocianato de guanidina, después de 16 h de incubación.....	35
Figura 30.	PCR a partir de la cepa 18 para determinar filogrupos.....	36

## Índice de cuadros

Cuadro 1.	Iniciadores específicos para cada cepa.....	18
Cuadro 2.	Condiciones para la PCR.....	18
Cuadro 3.	Número y características de las muestras a tomar.....	20
Cuadro 4.	Bioquímicas usadas para la identificación de enterobacterias.....	22
Cuadro 5.	Bioquímicas usadas para la identificación de <i>Campylobacter</i> .....	22
Cuadro 6.	Conteos obtenidos a partir de las diluciones de cada bacteria.....	29
Cuadro 7.	Valores de concentración mínima y de saturación de la reacción.....	31
Cuadro 8.	Muestras obtenidas.....	31
Cuadro 9.	Resultados del aislamiento bacteriológico de las muestras.....	32
Cuadro 10.	Cepas bacterianas aisladas.....	32
Cuadro 11.	Resultados de la PCR de las muestras.....	33
Cuadro 12.	Diluciones realizadas con SE en Rappaport.....	34
Cuadro 13.	Genes empleados para detección de virulencia en la cepa 18.....	36

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
fg	Femtogramo
g	Gramo
h	Hora
kg	Kilogramo
Lb	Libra
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milimetro
μL	Microlitro
min	Minuto
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
pb	Par de bases
pg	Picogramo
pM	Picomolar
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
U	Unidades
v/v	Volumen/volumen
w/v	Peso/volumen
V	Volt
%	Porcentaje

## RESUMEN

### **Detección molecular de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli* diarrogénica a partir de huevo; Acevedo Monroy Salvador Eduardo, Cecilia Rosario Cortés; Antonio Verdugo Rodríguez y Carlos Alberto Eslava Campos**

*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli* son bacterias de gran trascendencia en la industria alimentaria. México es el principal consumidor de huevo a nivel mundial debido a los beneficios nutricionales y económicos que este alimento ofrece, sin embargo, en países de la Unión Europea y en Estados Unidos hay frecuentes reportes de Salmonelosis causada por consumo de huevo. En México solo existe un estudio que refieran la presencia de esta bacteria en el huevo, por lo que la población podría estar en riesgo de infección por este microorganismo. Con relación a *Campylobacter* spp. y *E. coli* estudios en diversos países sugieren la presencia de estas bacterias en huevo para consumo, lo que representa un problema de inocuidad alimentaria y un riesgo para la salud de los consumidores. Ante ello el objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. utilizando ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en diferentes presentaciones de huevo comercial, con la finalidad de evaluar su empleo potencial como herramienta de detección rápida. La metodología incluyó realizar la curva de crecimiento de los microorganismos, ajuste de las condiciones de la PCR para los genes representativos de cada patógeno empleando cepas tipo y de referencia (*invA* para *Salmonella* Enteritidis ATCC 49214, *flaA* para *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *bfpA* y *eaeA* para *E. coli* enteropatógena O127:H6, *stx1*, *stx2* y *eaeA* para *E. coli* enterohemorrágica O157H7 EDL 933, *lta* y *sta* para *E. coli* enterotoxigénica O7:H104, *ial* para *E. coli* enteroinvasiva 95079 y *aggr* para *E. coli* enteroagregativa 49766). Se ajustó la concentración mínima detectable de ADN de cada bacteria para el ensayo de PCR, con este dato se procedió a realizar el muestreo de diferentes presentaciones de huevo tomadas de diversos autoservicios. De cada muestra seleccionada se realizó extracción de ADN por el método del tiocianato de guanidina, además se llevó a cabo aislamiento bacteriano empleando la metodología modificada de la NOM-210-SSA-2014 para realizar la validación de campo de la PCR y conocer diferencias en la detección molecular por PCR comparada con el aislamiento bacteriológico. Los resultados obtenidos corresponden a 36 muestras tomadas, en nueve de estas se amplificó ADN de *Salmonella* spp., se aisló una cepa de *E. coli* que al efectuar el análisis de filogenia mostró que pertenece al grupo de cepas comensales. Se puede concluir que mediante ensayos de PCR se pudo identificar la presencia de *Salmonella* spp. en diferentes muestras de huevo por lo que podría ser considerada para su empleo en estudios epidemiológicos. Se considera que es necesario realizar ajustes a la PCR para la detección de *E. coli* ya que incluso en la muestra en la que se realizó el aislamiento de la bacteria la PCR fue negativa. Asimismo, no se logró detectar la presencia de *Campylobacter* spp. por medio de bacteriología ni biología molecular.

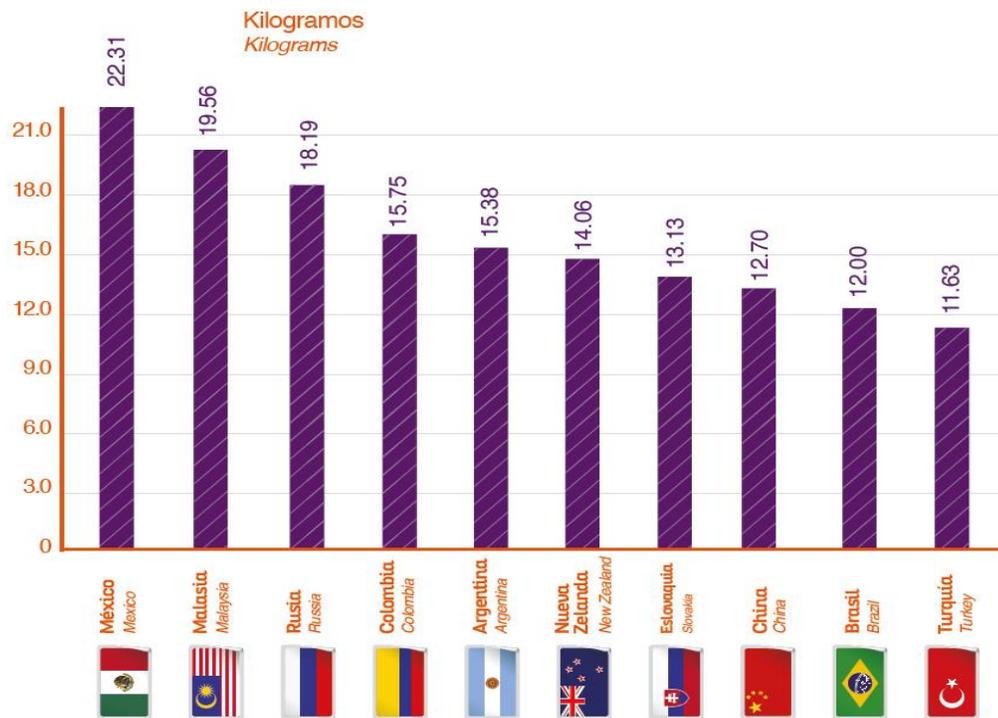
## ABSTRACT

**Molecular detection of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. & Diarrheagenic *Escherichia coli* from hen egg;** Acevedo Monroy Salvador Eduardo, Cecilia Rosario Cortés; Antonio Verdugo Rodríguez y Carlos Alberto Eslava Campos

*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. & *Escherichia coli* are bacteria with a great importance in the food industry. Mexico is the main egg consumer worldwide because to nutritional and economic advantages that this food offers, however in European Union (EU) countries and the United States (US), there are frequent reports of Salmonellosis due to egg consumption. In Mexico, there is only one report that refers the presence of this bacteria in eggs, so Mexican population could be in risk of infection by this microorganism. Likewise, reports in other countries have suggested the presence of *Campylobacter* spp and *E. coli* in eggs for consumption and it represents a problem of food safety and health risk. The aim of this work was the detection of *Salmonella* spp., Diarrheagenic *Escherichia coli*, and *Campylobacter* spp. using assays of polymerase chain reaction (PCR) from miscellaneous presentations of commercial egg, with the purpose to evaluate the potential use as a rapid detection tool. To achieve this goal we determinate the bacterial growth curve and conditions were defined for PCR to detect representatives genes for each pathogen using reference and type strains (*invA* for *Salmonella* Enteritidis ATCC 49214, *flaA* for *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *bfpA* and *eaeA* for Enteropathogenic *E. coli* O127:H6, *stx1*, *stx2* and *eaeA* for enterohaemorrhagic *E. coli* O157H7 EDL 933, *lta* and *sta* for enterotoxigenic *E. coli* O7:H104, *ial* for enteroinvasive *E. coli* 95079 and *aggr* for Enteroaggregative *E. coli* 49766). The minimum concentration of bacterial DNA detectable by PCR was determined; with this data the sampling was performed from different egg presentations, that were took from different supermarkets. For each sample, DNA extraction was performed, using guanidinium thiocyanate protocol. It was also made from bacterial isolation employing the method that the NOM - 210-SSA-2014 establishes. In this way, we contrasted both methods, detection by PCR against bacterial isolation, to detect the presence of these pathogens in eggs that are sold in our country. From 36 samples, we amplified *Salmonella* DNA from nine; we isolated a commensal *E. coli* strain that according to phylogenetic it belongs to commensals group. We demonstrated that the PCR is a more reliable technique for *Salmonella* spp detection, than the classical bacteriology. In addition, we could not detect *Campylobacter* spp. employing bacteriology and molecular biology.

## INTRODUCCIÓN

La avicultura en México es uno de los sectores pecuarios más importantes del país que se encuentra constituido por la producción de carne y huevo; según datos de la Unión Nacional de Avicultores en 2017, México figuró con el primer lugar en el consumo de huevo en el mundo, con un consumo *per capita* de 22.31 kg. Actualmente, existen tres sistemas de producción de huevo que son: el sistema intensivo o tecnificado, con condiciones totalmente controladas el cual se dedica netamente a la producción industrial de huevo; sistema de traspatio, también denominado familiar encaminado al autoconsumo, y el sistema de producción extensivo, que en los últimos años ha tomado mucha fuerza dentro de la avicultura nacional. En 2016, se calculó que había 197 millones de aves de postura en sus diferentes etapas de vida, para la producción de huevo en sistemas tecnificados, las cuales produjeron 2,765,422 toneladas de huevo, que representó el 13.1% de la producción nacional agropecuaria. Jalisco ocupa el primer lugar de producción, con un 55% del total de huevo, seguido por los estados de Puebla, Sonora, Nuevo León y Guanajuato.<sup>1, 2</sup>



**Figura 1.** Países consumidores de huevo entero; Unión Nacional de Avicultores 2017; INDICADORES ECONÓMICOS: Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2017. México.<sup>1</sup>

El consumo del huevo en los últimos años se ha modificado, ya que anteriormente se consumía únicamente como entero fresco, después, con las nuevas tecnologías en los alimentos, se diversificó el consumo de huevo y ovoproductos. Por ello, actualmente se encuentra en diferentes presentaciones como:

Huevo entero fresco, también denominado huevo para plato, es un huevo en cascarón apto para el consumo humano que se encuentra dentro de las clasificaciones de la Norma Mexicana: NMX-FF-079-SCFI-2004, el cual es el de mayor consumo.

Huevo entero líquido refrigerado o congelado: producto obtenido del huevo, sin cascarón y sometido a pasteurización; el cual debe provenir de huevos aptos para el consumo humano, y debe ser conservado en refrigeración o congelación. El consumo actualmente de este tipo de productos está ganando terreno en el mercado, pues ofrece la ventaja de que el comprador puede adquirir lo que le interesa consumir como claras o yemas o el huevo entero sin cascarón; además de que existen presentaciones adecuadas que pueden ser para consumo en el hogar o industrias de alimento como panificadoras, restaurantes, reposteras, comedores industriales, etc.<sup>3</sup>

Huevo entero liofilizado: Es el producto en polvo obtenido del huevo fresco o conservado, estabilizado opcionalmente, adicionado o no de aditivos permitidos por la normatividad, pasteurizado y sometido a un proceso tecnológico de deshidratación; esta presentación es muy empleada sobre todo en empresas de gran consumo como panaderías, reposterías y comedores comunitarios, por lo que el consumo en hogares es nulo.<sup>3</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido al huevo como referencia para otros alimentos debido a su gran aporte proteico, por ello es un producto que tiene gran aceptación a nivel mundial, además de ser un alimento de bajo costo y fácil acceso, conservación sencilla, y la gran variedad de maneras en las que se puede cocinar, incluso algunos autores mencionan otro beneficio, el cual es que posee su propio envase (cascarón).<sup>4</sup>A pesar de lo anterior, no está exento de poder acarrear organismo patógenos como por ejemplo, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. o *Escherichia coli*, por mencionar algunos.

La Salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial causada por bacterias del género *Salmonella* spp. que afecta a mamíferos, aves, anfibios y reptiles. *Salmonella* spp. está clasificada como  $\gamma$ -proteobacteria de la familia *Enterobacteriaceae*; es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelos peritricos y anaerobio facultativo, carente del citocromo oxidasa, no fermentador de la lactosa. Posee dos antígenos principales: H (flagelar) y O (somático). Se ha reportado que *Salmonella* Enteritidis (SE) es capaz de persistir en el tracto intestinal y reproductivo en ausencia de signos clínicos, además de ser un serotipo altamente prevalente en aves de engorda y de postura alrededor del mundo y se considera la principal serovariedad asociada a casos de Salmonelosis en humanos que contraen la enfermedad al consumir alimentos contaminados. Estudios epidemiológicos indican como principales fuentes de infección al huevo y sus subproductos ya que el huevo puede estar contaminado por la parte externa del cascarón o al interior.<sup>11</sup>

Los principales serotipos asociados a enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) son *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) y serovar Typhimurium (ST). En humanos, estos serotipos provocan gastroenteritis que puede ir de media a grave caracterizada por diarrea, fiebre, dolor abdominal y deshidratación. En algunos pacientes se puede presentar bacteremia y septicemia. En aves, causa la llamada paratifoidea que en casos agudos provoca la muerte súbita. En su presentación crónica las aves presentan diarrea fétida de color amarillento, pérdida del apetito, debilidad y disminución en la ganancia de peso y postura de huevo. Las gallinas pueden infectarse con SE vía horizontal (fecal – oral) y por vía vertical ya que esta bacteria puede colonizar el tracto reproductivo e infectar al pollito a través de la contaminación del huevo fértil.<sup>10,14</sup>

La Colibacilosis es la enfermedad infecciosa causada por *Escherichia coli*, que al igual que *Salmonella* spp., está clasificada como  $\gamma$ -proteobacteria, es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelos peritricos y anaerobio facultativo, carente del citocromo oxidasa, fermentadora de la lactosa, sin embargo, se han reconocido cepas diarrogénicas sobre todo aquellas

pertenecientes al patotipo entero-invasivo que no fermentan la lactosa y son inmóviles. Es un organismo que se clasifica por su patogenia, signos clínicos, y la serotipificación, de acuerdo a su antígeno flagelar (H) y somático (O). De esta manera, se han identificado los patotipos; *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Productora de la toxina Shiga (STEC) a la cual pertenece un subconjunto denominado *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), por mencionar únicamente aquéllos involucrados en infecciones entéricas diarreicas más clásicas<sup>17</sup>. Actualmente, se han documentado 174 variantes del antígeno O y 56 del antígeno H, de los cuales, un pequeño grupo es causante de enfermedades que pueden afectar mamíferos y aves. Las manifestaciones clínicas frecuentes son, diarrea con o sin sangre, vómito y deshidratación, esto sin incluir las diferentes manifestaciones clínicas que pueden tener los distintos patotipos de *E. coli*. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la *U. S. Food and Drug Administration* (FDA por sus siglas en inglés) y la *European Food Safety Authority* (EFSA por sus siglas en inglés) la consideran una de las principales causas de ETAs; por ello figuró como una de las 10 principales bacterias causantes de diarrea, en 2015; la EFSA reportó 71 casos confirmados por diversos serogrupos de *E. coli*, durante ese año. Actualmente, el patotipo al que se le ha prestado más atención es EHEC, en especial, al serotipo O157:H7, causante de un cuadro severo de enterocolitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico que puede ser fatal.<sup>5</sup> En México, no existen reportes de la presencia de *E. coli* O157:H7 causante de cuadros clínicos diarreicos, el problema radica en el sub-diagnóstico y sub-notificación de este tipo de enfermedades ya que en escasas ocasiones se realiza el aislamiento y la caracterización del agente involucrado. En el caso de las aves *Escherichia coli* es un organismo que ha adquirido relevancia debido a que se conoce su capacidad de invadir diferentes órganos y tejidos, en particular, el tracto reproductor, esto dependiendo de su patotipo.

Otro agente de gran trascendencia en la industria alimentaria es *Campylobacter*, que es una bacteria clasificada como  $\epsilon$ -proteobacteria, pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*; es un bacilo curvo o sigmoide Gram negativo, móvil por flagelos y microaerofílico, posee las enzimas catalasa y oxidasa, carece de capacidad para fermentar carbohidratos, en el caso de las especies, *C. jejuni* y *C. coli* se les considera termotolerantes debido a que su cultivo puede ser a temperaturas hasta de 42°C, es un organismo exigente de lento crecimiento; y que es causante de la Campilobacteriosis o Vibriosis, que se caracteriza por diarrea profusa, fiebre, dolor articular, mialgia y deshidratación. Las especies más frecuentes para este tipo de cuadros clínicos son *C. jejuni* y *C. coli*, Para el año de 2010 la OMS reportó 21,374 muertes por *Campylobacter* spp.<sup>11, 12</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016 la clasificó como una de las cuatro bacterias más importantes causantes de enfermedades diarreicas. En 2015, la EFSA dio a conocer a *Campylobacter* como el organismo más reportado, con 236,851 casos confirmados de los cuales 25 resultaron en el fallecimiento de los infectados. Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, por sus siglas en inglés) reportaron 324 casos confirmados de Campilobacteriosis relacionados con alimentos en 2014.<sup>11</sup> La importancia de esta bacteria en huevo es debido a que estudios recientes han evidenciado la capacidad de *Campylobacter coli* y *C. jejuni* de invadir órganos reproductivos de aves, y a su vez, pasar a través de ellos al huevo, aunque el mecanismo de esta infección aún no se ha esclarecido y actualmente se encuentra en proceso de investigación para dilucidar dicho evento. La importancia de este patógeno en humanos en nuestro país ha sido poco estudiada, aunque, existen reportes de su participación en cuadros de diarrea como lo reportó Ruiz Palacios *et al.* en 2007. Lo anterior plantea la relevancia de *Salmonella* spp., *Escherichia*

*coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. como causa importante de enfermedad en humanos transmitida por alimentos.<sup>7,8</sup>

## **ANTECEDENTES**

En el mundo existen distintos trabajos que evidencian la presencia de *Salmonella* spp. en huevo para plato, sin embargo, en México el único trabajo en el cual se realizó la búsqueda de *Salmonella* en este alimento fue en 1997 por Del Roble Rodríguez González, quien demostró la presencia de esta bacteria en huevo distribuido por dos diferentes empresas en Monterrey, Nuevo León. Respecto a *Escherichia coli*, en 2009, Ozaki y su grupo de trabajo evidenciaron la capacidad de este microorganismo de invadir órganos reproductores lo cual podría implicar la transmisión de variedades diarrogénicas a través del huevo para plato, sin embargo, aún no ha sido demostrado. En 2005, Cox y colaboradores demostraron que *Campylobacter* puede invadir diversos órganos en las aves, incluyendo los órganos reproductivos, esto sugiere que *Campylobacter* podría estar presente en el huevo. Posteriormente, en 2012 este mismo grupo de trabajo demostró que *Campylobacter* se puede transmitir de manera tanto horizontal como vertical a la descendencia de las aves y, por lo tanto, este hallazgo podría indicar que *Campylobacter* está presente en el huevo para consumo. En México, en 2017 Olivares y Rosario reportaron la presencia de *Campylobacter* spp. por medio de aislamiento y qPCR, en canales de ave, por lo que no se puede descartar su presencia en aves de postura. Todos estos son estudios de gran trascendencia, sin embargo, se requiere un soporte actualizado de las tres bacterias para determinar su posible presencia en el huevo para plato.

## **JUSTIFICACIÓN**

*Salmonella* spp., *Escherichia coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. son patógenos de importancia clínica y epidemiológica, una de las fuentes de transmisión de estos microorganismos por alimentos podría ser el huevo. Aunque, el aislamiento es el estándar de oro para demostrar su presencia en éste y otros productos alimenticios, se requiere el empleo de pruebas sensibles, específicas y rápidas que tengan la validez de la bacteriología clásica. El empleo de métodos moleculares como la PCR, representan una opción ya que ha demostrado su utilidad en muestras clínicas. Por tal motivo, se propone la utilización de esta técnica como herramienta de detección de patógenos en huevo.

## **HIPÓTESIS**

El huevo para consumo en México es un vehículo de transmisión de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. y su presencia se puede evidenciar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

## OBJETIVO

Estandarizar las condiciones de la PCR para detectar la presencia de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. en diferentes presentaciones de huevo comercial con la finalidad de conocer su uso potencial como herramienta de detección y evaluación de futuros trabajos sobre epidemiología.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar con iniciadores específicos para cada una de las bacterias propuestas para el estudio el uso potencial de la prueba de PCR, para la detección de cada patógeno en huevo.
- II. Realizar un muestreo de campo y definir el impacto de la prueba en la detección de cada uno de los tres patógenos propuestos.
- III. Comparar los resultados obtenidos mediante la PCR con los obtenidos por el método tradicional de aislamiento e identificación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Medios de cultivo y cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de referencia de: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 49214, *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 y *E. coli* Diarrogénicas (EPEC [O127:H6], EHEC [O157:H7] DL933, EIEC 95079, EAEC [49766] y ETEC [O7:H104]); además se incluyó *E. coli* ATCC 25922 y *Campylobacter fetus fetus* ATCC 27734 como controles negativos. Estas bacterias se cultivaron en los medios: caldo/agar Luria Bertani (LB), caldo/agar brucella, agar sangre, adicionalmente, se emplearon medios caldo Rappaport-Vassidialis, caldo tetrionato, caldo Bolton y caldo lauril triptosa para el enriquecimiento de cada patógeno. Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se utilizaron los medios agar xilosa- lisina-desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y sulfito bismuto (SB); agar MacConkey (McC) y agar eosina con azul de metileno (EAM) para la aislar *Escherichia coli*, y agar sangre con vancomicina-colistina-cicloheximida-noboviocina (VCCN) para el aislamiento de *Campylobacter* spp.

- Extracción de ADN, iniciadores y Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron los iniciadores específicos para cada organismo (**cuadro 1**), Previo a la PCR se realizó el procedimiento de extracción de ADN por el método del Tiocianato de Guanidina descrito por Pitcher *et al.* con algunas modificaciones de acuerdo a lo reportado por Navas Valbuena y Acevedo.<sup>18,27,28</sup> *Salmonella* sp. y *E. coli* se crecieron por 16 h en 7.5 mL de medio líquido LB a 37 °C con agitación constante a 100 rpm, *Campylobacter* fue cultivado en caldo brucella 48 h 37°C sin agitación. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10-15 min en centrífuga refrigerada (IEC) transcurrido este tiempo, a la pastilla bacteriana se le agregó 225 µL de solución de lisis (ver anexo 2), se agitó vigorosamente en un agitador de vórtice (Vortex LabNet) durante 30-60 s, hasta que la pastilla se disolvió completamente, después se agregó 125 µL de acetato de amonio (Ver anexo 2); frío y se agitó invirtiendo los tubos por diez ocasiones luego se incubó 10 minutos en hielo, una vez

concluido el tiempo se agregó un volumen de 300  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (ver anexo 2) y se agitó vigorosamente durante 5 s procurando que todo el contenido estuviera homogeneizado; posteriormente, se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 5 min en centrífuga refrigerada (LabNet/Eppendorf), cuando terminó el ciclo de centrifugación se tomó el sobrenadante de cada tubo y se transfirió a un tubo nuevo, al sobrenadante transferido se le agregó 300  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (ver anexo 2) y se agitó vigorosamente durante 5 s y después se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 5 min; transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos, al sobrenadante transferido se le agregó 0.1 volúmenes, con respecto del sobrenadante, de acetato de sodio frío (ver anexo 2) de inmediato se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol frío o 2 volúmenes de etanol absoluto frío, los tubos se agitaron invirtiéndolos por diez ocasiones. En el caso de isopropanol, los tubos deben incubarse mínimo 40 min en hielo, después centrifugar 10,000-13,000 rpm 10 min, con etanol la centrifugación es de inmediato, al terminar la centrifugación el sobrenadante de cada tubo fue desechado y a la pastilla de ADN se le agregó 1mL de etanol al 70% frío y se centrifugaron los tubos 10,000-13,000 rpm 10 minutos al terminar se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla de ADN en baño seco 85°C 15 minutos, la pastilla bacteriana se reconstituyó con 50  $\mu\text{L}$  de agua MiliQ (Milipore®) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para comprobar la integridad y pureza del ADN obtenido se realizó electroforesis del ADN y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop®, apartir del valor obtenido respecto a la concentración del ADN extraído se realizó la dilución del ADN a 100 ng/ $\mu\text{L}$ , con la cual se realizaron los ensayos de PCR empleando los iniciadores enlistados en el **cuadro 1**. Además, considerando el cálculo de las temperaturas de alineamiento respecto a la temperatura de fusión proporcionadas por el fabricante de los iniciadores (Sigma Aldrich®/Invitrogen®) se emplearon los programas con las constantes de temperatura y tiempo como se enlistan en el cuadro 3. Previo a los ensayos de PCR se comprobó por medio de ensayos *in silico* y empleando las herramientas Blast del National Center Biotechnology Information y SnapGene V. 4.1 el alineamiento de los iniciadores y los amplificados.

<b>Cuadro 1. Iniciadores específicos para cada organismo, con sus pesos de los amplificadores</b>				
<b>Organismo</b>	<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Amplificado</b>	<b>Reportó</b>
<b>Salmonella spp.</b>	<i>invA</i> F	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	285 pb	Rahn et al 1992 <sup>19</sup>
	<i>invA</i> R	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3'		
<b>Campylobacter spp.</b>	<i>flaA</i>	5'-ATGGGATTTTCGTATTAAC-3'	458 pb	Oyofó et al. 1992 <sup>20</sup>
	<i>pg50</i>			
	<i>flaA</i>	5'-GAACTTGAACCGATTTG-3'		
<b>EPEC</b>	<i>bfpA</i> F	5'-AATGGTGCTTTCGCGCTTGCTGC-3'	388 pb	Nataro et al. 1998 <sup>17</sup>
	<i>bfpA</i> R	5'-GCTAGGGTGTTAATATCTCT-3'		
<b>EPEC/EHEC</b>	<i>eaeA</i> F	5'-GGCGCTCATCATAGTCTTTC-3'	346 pb	Nataro et al. 1998 <sup>17</sup>
	<i>eaeA</i> R	5'-GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCA-3'		
<b>EHEC</b>	<i>stx1</i> F	5'-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3'	180 pb	Paton et al. 1998 <sup>21</sup>
	<i>stx1</i> R	5'-AGAACGCCCACTGAGATC-3'		
<b>EHEC</b>	<i>stx2</i> F	5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3'	255 pb	Paton et al. 1998 <sup>21</sup>
	<i>stx2</i> R	5'-GGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3'		
<b>EAEC</b>	<i>aggR</i> F	5'-CTAATTGTACAATCGATGTA-3'	324 pb	Morin et al. 2013
	<i>aggR</i> R	5'-ATTCAAGAATTACTTCAG-3'		
<b>EIEC</b>	<i>ial</i> F	5'-CTGGATGGTATGGTGAGG-3'	320 pb	Nataro et al. 1998 <sup>17</sup>
	<i>ial</i> R	5'-GGAGGCCAACAAATTATTTCC-3'		
<b>ETEC</b>	<i>sta</i> F	5'-CTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-3'	189 pb	Bisi-Johnson et al. 2011 <sup>21</sup>
	<i>sta</i> R	5'-AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA-3'		
<b>ETEC</b>	<i>lta</i> F	5'-GTGCTCAGATTCTGGGTCTC-3'	132 pb	Bisi-Johnson et al. 2011 <sup>21</sup>
	<i>lta</i> R	5'-AGCAGGTTTCCCACCGATCACCA-3'		

Se realizó la PCR de cada uno de los organismos, con las condiciones descritas en el **cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Condiciones utilizadas para cada reacción

<i>invA/flaA/bfpA/eaeA/stx1/stx2/aggR/sta/lt</i>		<i>ial</i>	
<b>T°C</b>	<b>Tiempo</b>	<b>T°C</b>	<b>Tiempo</b>
95	5 min	95	5 min
95	30 s	95	30 s
42	45 s	56	45 s
72	30 s	72	30 s
72	5 min	72	5 min

- Curva de crecimiento bacteriana.

Para conocer la curva de crecimiento bacteriano, y de esta manera saber en qué momento la bacteria se encontraba en su fase de crecimiento exponencial, se realizó una cinética de crecimiento. Para *Salmonella* Enteritidis y *E. coli* diarrogénica, se sembró un pre-inóculo de 5 colonias de cada bacteria en caldo LB, después se incubó durante 16 h a 37°C;

posteriormente, de cada medio se tomaron 300  $\mu$ L y se transfirieron a un tubo con 30 mL de medio nuevo caldo infusión cerebro corazón o caldo brucella, y se midió la absorbancia cada hora a partir del momento en el que se inocularon (hora 0), esto se hizo hasta que se determinó que la bacteria declinaba en su crecimiento. La longitud de onda que se utilizó fue de 600 nm. En el caso de *Campylobacter jejuni*, por ser un organismo de lento crecimiento, se creció un inoculo de 36 h en agar sangre, después se sembró un preinóculo con cinco colonias en 10 mL de caldo Brucella y fue incubado a 37°C sin agitación, posteriormente, se sembraron 300 $\mu$ L del preinóculo en 30 mL caldo Brucella y se midió el crecimiento a las 2, 4, 6, 8 y 12 h hasta la hora 60 post-inoculación a una longitud de onda de 600 nm. Al obtener los datos se graficaron para observar la curva de crecimiento, los ensayos se realizaron por duplicado.

- Cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Una vez conocida la fase exponencial de cada organismo, a partir de un cultivo con el tiempo determinado respecto a la fase exponencial, se centrifugó a 2,500 RPM y se lavó con PBS, posteriormente, el cultivo fue estandarizado aproximadamente a  $10^9$  UFC, esto se hizo suspendiendo a la bacteria en PBS y midiendo el valor de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y 100% de transmitancia, una vez que la suspensión de bacteria fue estandarizada al valor de 1.050 se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de PBS para realizar diluciones décuples seriadas. Después de ello, los tubos con diluciones altas fueron sembradas en agar cuenta estándar/agar campylobacter. Se incubó a 37°C /24 h-5 días. Asimismo, se tomó otro mL al cual se le realizó extracción de ADN para saber la mínima concentración de bacteria detectable mediante la PCR. La extracción de ADN se realizó por medio del método del tiocianato de guanidina, como se describió previamente. Al finalizar la incubación de las cajas, se hizo el conteo bacteriano y se calculó el promedio para obtener un aproximado de unidades formadoras de colonia (UFCs). Se realizaron tres ensayos de cada bacteria con dos repeticiones.

- Ensayos de concentración mínima detectable y saturación de la reacción

Una vez evaluados los resultados de las PCRs obtenidos a partir de las diluciones se decidió llevar a cabo diluciones de ADN extraído de las bacterias en las siguientes concentraciones: 100 ng, 50 ng, 5 ng, 1000 pg, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 1000 fg, 500 fg, 50 fg y 5 fg. Empleando los cálculos reportados por Doležel y col. en 2003, se determinó la cantidad de bacterias que se detectan por cada PCR con respecto a la cantidad mínima de ADN detectada. Una vez definida la concentración mínima detectable de cada bacteria, a partir del ADN extraído se realizó el cálculo para conocer la concentración de ADN las reacciones se inhiben empleando las siguientes concentraciones: 100 ng, 500 ng, 1  $\mu$ g, 1.5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 2.5  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 8  $\mu$ g, 16  $\mu$ g y 32  $\mu$ g, empleando la fórmula de J. Doležel y col. desarrollada en 2002 se determinó la cantidad de bacterias las cuales cada reacción puede detectar.

- Cálculo de toma de muestras

Una vez que se definieron los parámetros y constantes de la PCR se realizó un muestreo por conveniencia de 30 muestras de huevo en sus diferentes presentaciones, para lo cual se visitaron diferentes autoservicios de la Ciudad de México (CdMx) y del área metropolitana. Este muestreo se realizó dos veces en diferentes periodos de tiempo de esta manera se obtuvieron un total de 42 muestras, como se muestra en el **cuadro 3**.

**Cuadro 3. Número de muestras a tomar en establecimientos comerciales.**

Muestra	Establecimiento comercial	Presentación
1	A / B / C	Claras líquidas pasteurizadas
2	A / B / C	Claras líquidas pasteurizadas
3	A / C	Huevo para plato/Gallina en jaula
4	D	Huevo para plato (Gallina vegetariana)
5	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
6	A / B / C	Huevo para plato/ Gallina en jaula
7	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
8	A / B / A	Huevo para plato (orgánico de gallina libre)
9	A / B / A	Huevo para plato (orgánico de gallina libre)
10	A	Huevo para plato (orgánico de gallina libre)
11	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
12	D	Huevo para plato/ Gallina en jaula
13	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
14	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
15	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
16	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
17	A	Huevo para plato/ Gallina en jaula
18	B	Huevo para plato de libre pastoreo
19	B	Huevo para plato orgánico de libre pastoreo
20	B	Huevo para plato orgánico de libre pastoreo
21	B / D / E	Huevo para plato de libre pastoreo

- Aislamiento e identificación bacteriana

Se empleó la metodología descrita en la norma oficial mexicana: NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios, métodos de prueba microbiológicos; determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. La cual indica para el aislamiento de *Salmonella* spp. una vez obtenida cada muestra debe ser homogeneizada e incubarse 20 a 24°C durante 96 h, posteriormente se realiza un preenriquecimiento en el cual se transfiere 25 mL ó 25g de la muestra a 225mL de caldo tripticaseína de soya con sulfato ferroso (35 mg/L) y se incuba 1 h a 25°C, después se incuba a 36°C durante 24 h. Después se lleva a cabo el enriquecimiento en los medios Rappaport-Vassidialis (CRV) y tetrionato (CT) adicionado con verde brillante, los cuales fueron inoculados con 0.1 mL y 1 mL, respectivamente y se incubaron; en el caso del caldo RV a 41.5°C durante 24 h; y el caldo CT a 36°C durante 24 h. Concluido el enriquecimiento, a partir de cada caldo de cultivo se sembró en los medios sulfito bismuto (SB), xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y verde brillante (VB) los cuales se incubaron a 37°C durante 24 h después; se realizó la identificación de colonias sospechosas a *Salmonella* y su identificación bioquímica, como lo indican los manuales de Cowan y Steel y el Manual de Hirst, empleando las pruebas: oxidasa<sup>25</sup>, agar triple azúcar hierro (TSI), medio SIM, citrato de Simmons, urea de Christensen, fenilalanina desaminasa (PD), lisina descarboxilasa (LD) y orto-nitrofenil β galacto-piranosidasa (ONPG).<sup>23, 24</sup>

Para el aislamiento de *E. coli* se tomó a partir de la muestra homogeneizada 25 mL ó 25 g y fueron depositados en 225 mL de diluyente de peptonas, posteriormente, a partir de este preparado se transfirió 1 mL a caldo lauril triptosa el cual se incubó a 36°C durante 24 h<sup>25</sup>, una vez concluido el enriquecimiento se sembró en los agares MacConkey (McC) y eosina azul de metileno (EAM) los cuales se incubaron a 37°C durante 24 h; posterior a la incubación, se realizó la identificación de colonias sospechosas a *E. coli* como lo indican los manuales de Cowan y Steel y el Manual de Hirst, empleando las pruebas: oxidasa, TSI, SIM, citrato de Simmons, urea de Christensen, PD, LD, rojo de metilo-Voges Proskauer (MR-VP) y ONPG.<sup>23, 24</sup> Para *Campylobacter* spp. se tomaron 25 mL de la muestra homogeneizada y fueron transferidos a 225 mL de caldo Bolton; posteriormente, se incubaron en atmósfera microaerofílica a 37° C durante 3-4 h, luego se incubaron a 42°C, durante 24-48 h. Una vez concluido el enriquecimiento se sembró en placa de agar *Campylobacter* y se incubó a 42°C durante 72 h en condiciones microaerofílica, transcurrido el periodo de incubación las colonias sospechosas fueron inspeccionadas por medio de tinción de Gram y comprobada su identidad mediante las bioquímicas, oxidasa, TSI, urea y crecimiento en presencia de ácido nalidixico y cefalotina.<sup>26, 23, 24,30</sup>

- Extracción de ADN y PCR a partir de las muestras

A partir de cada medio de enriquecimiento de cada bacteria se tomaron 2 mL y se realizó la extracción de ADN por el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher y colaboradores en 1989<sup>18</sup>, con algunas modificaciones, al ADN obtenido de este procedimiento fue sometido a la PCR para la detección de cada patógeno empleando los iniciadores enlistados en el **cuadro 1**.

## RESULTADOS

- Cepas bacterianas y medios de cultivo.

La identidad de las cepas de referencia de *Salmonella* y *E. coli* sembradas en agar LB, arrojaron el perfil bioquímico esperado,<sup>22, 23</sup> como se observa en el **cuadro 4**, posteriormente, se corroboró su identidad por medio de la PCR. Las serovariedades fueron comprobadas con ayuda del Dr. Armando Navarro del Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina-UNAM empleando los sueros de tipificación SerUNAM®.

Las cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* sembradas en caldo agar sangre fueron corroboradas por medio de bioquímicas y PCR **cuadro 5**.

**Cuadro 4.** Bioquímicas empleadas para la identificación de cepas de enterobacterias

Bacteria	oxidasa	lactosa	TSI	SIM	citrato	Urea	lisina	fenilalanina	ONPG	MR-VP
SE	-	-	2	+/-/+	+	-	+	-	-	+/-
EPEC	-	+	1	-/+/+	-	-	+	-	+	+/-
EHEC	-	+	1	-/+/+	-	-	+	-	+	+/-
EIEC	-	-	3	-/+/+	-	-	-	-	+	+/-
EAEC	-	+	1	-/+/+	-	-	+	-	+	+/-
ETEC	-	+	1	-/+/+	-	-	+	-	+	+/-

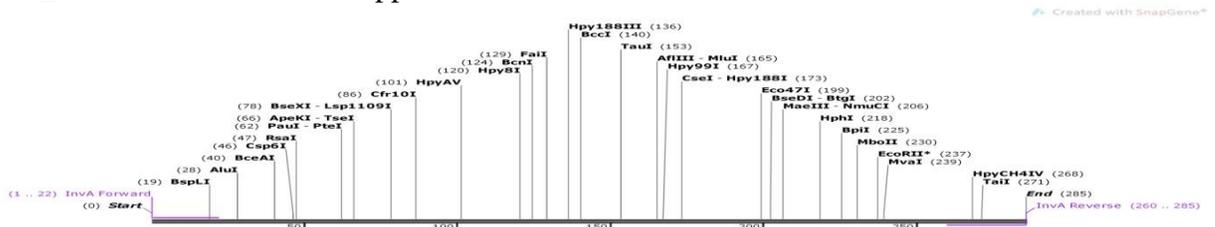
**Cuadro 5.** Bioquímicas empleadas para la identificación de cepas de *Campylobacter* spp.

	oxidasa	cefalotina	Ac. nalidíxico	Crecimiento a 42°C	TSI	catalasa
<i>Cj</i>	+	S	R	+	-	+
<i>Cf</i>	+	R	S	-	-	+

- Iniciadores y PCR

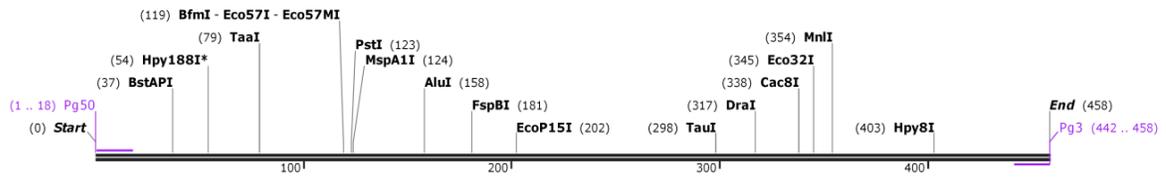
Los iniciadores se alinearon en la plataforma de SnapGene, con la secuencia reportada en el NCBI/GeneBank de cada bacteria como se muestra en las **figuras 2 a 11**.

### NZ\_CP02825.1 *Salmonella* spp. *invA*



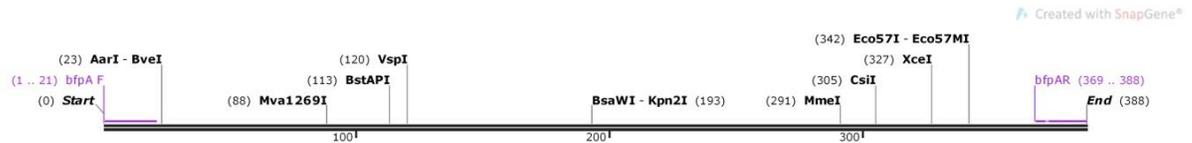
**Figura 2.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *Salmonella* spp.

**NZ\_CP010480.1** *Campylobacter jejuni/coli flaA*



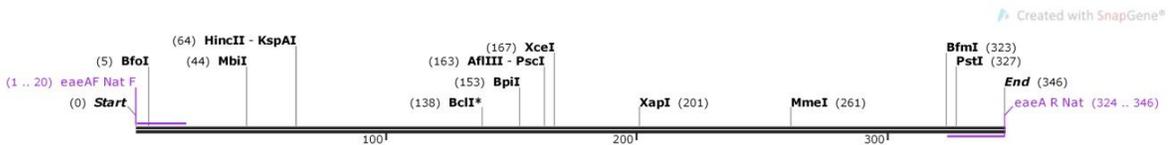
**Figura 3.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *Campylobacter* spp.

**AAC44040.1** *E.coli* EPEC *bfpA*



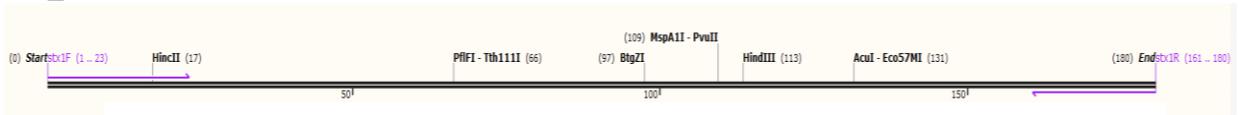
**Figura 4.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EPEC

**NZ\_CP021339.1** *E.coli* EPEC/EHEC *eaeA*



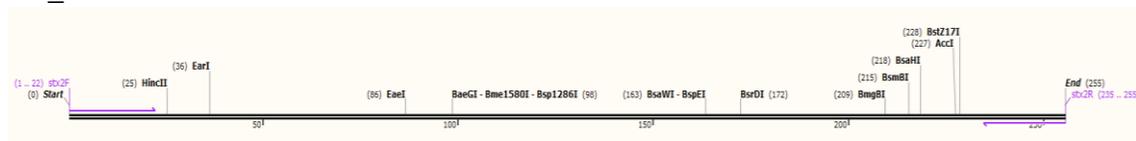
**Figura 5.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EPEC/EHEC

**NZ\_CP008957.1** *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933 EHEC *stx1*



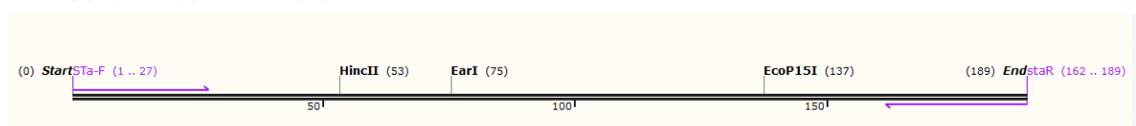
**Figura 6.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EHEC

**NZ\_CP008957.1** *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933 EHEC *stx2*



**Figura 7.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EHEC

**M25607.1** *E.coli* ETEC *sta*



**Figura 8.** Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* ETEC

NC\_013507.1 *E. coli* ETEC *lta*



Figura 9. Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* ETEC

D13663.1 *E. coli* EIEC *ial*

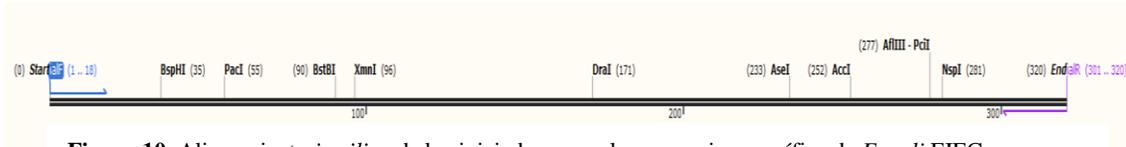


Figura 10. Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EIEC

Z32523.1 *E. coli* EAEC *aggR*



Figura 11. Alineamiento *in silico* de los iniciadores con la secuencia específica de *E. coli* EAEC

En las **figuras 12, 13, 14 y 15** se observan los productos de la PCR con los iniciadores para amplificar los genes en listados en el **cuadro 1**. Obtenidos a partir de la extracción de ADN del cultivo de cada microorganismo.

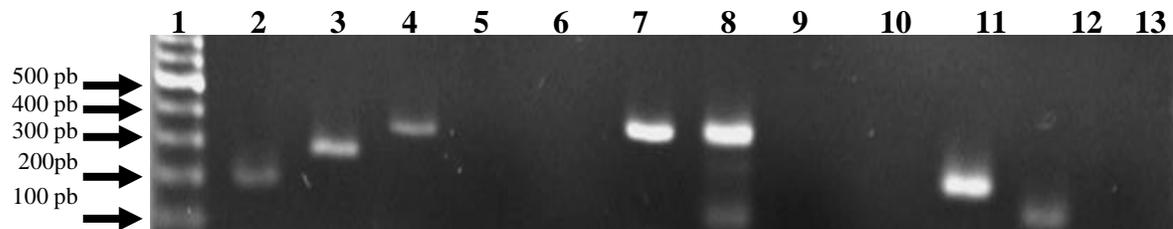


Figura 12. Productos de la PCR obtenidos a partir del ADN de patotipos de *E. coli*; Carriles: 1.- MPM 100pb, 2,3,4 y 5.- *stx1*, *stx2*, *eaeA* y Control negativo; 7, 8 y 9.- *eaeA*, *bfp* y Control negativo, 11, 12 y 13.- *sta*, *lta* y Control negativo.

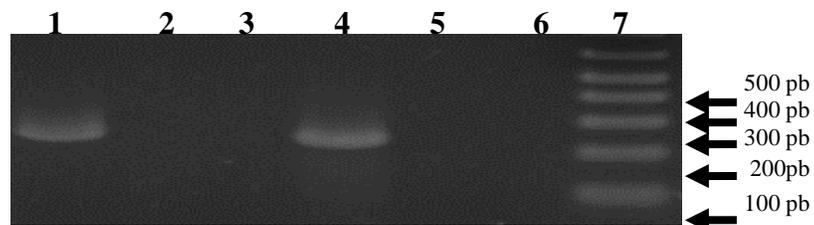
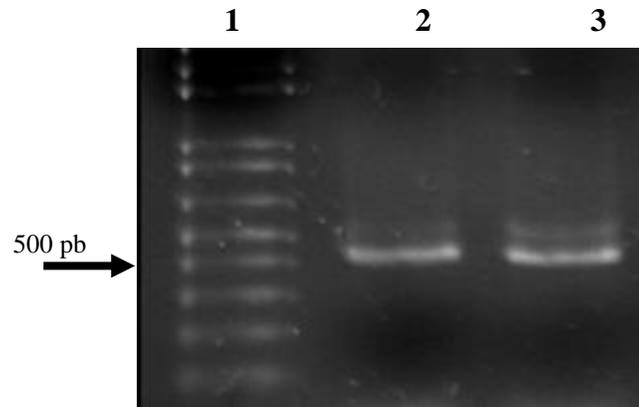
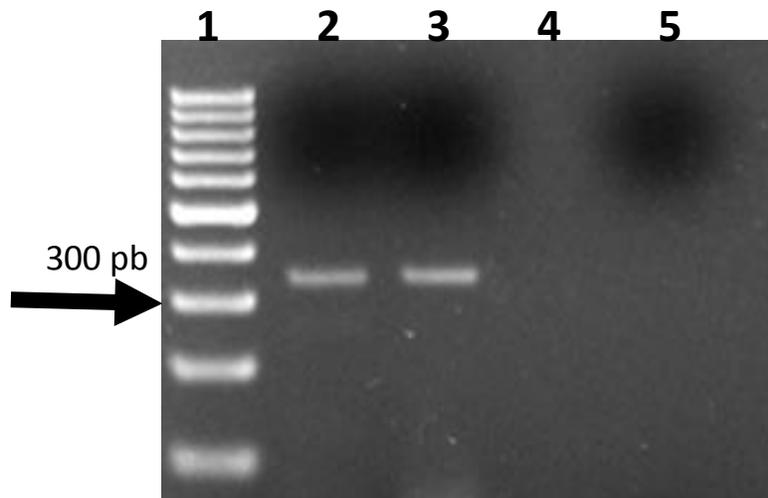


Figura 13. Productos de la PCR obtenidos a partir del ADN de patotipos de *E. coli* y ADN de *S. Enteritidis*; Carriles: 1.- *aggR*, 2.- Control negativo, 4.- *invA*, 5.-Control negativo y 7.- MPM; 100pb



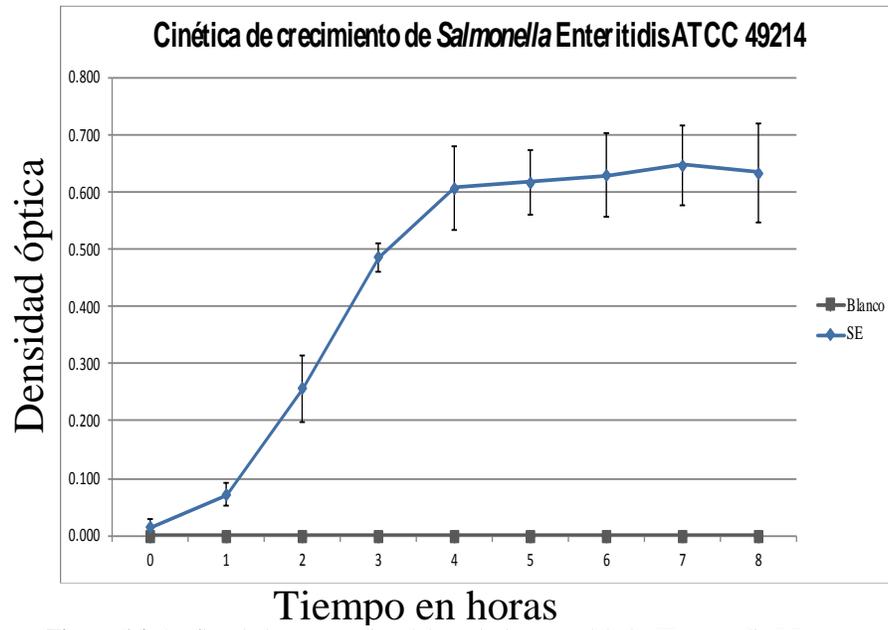
**Figura 14.** Productos de la PCR obtenidos a partir del ADN de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* (CC y CJ) Carriles: 1.- MPM 1kb plus, *flaA* 2.- CJ y 3.- CC



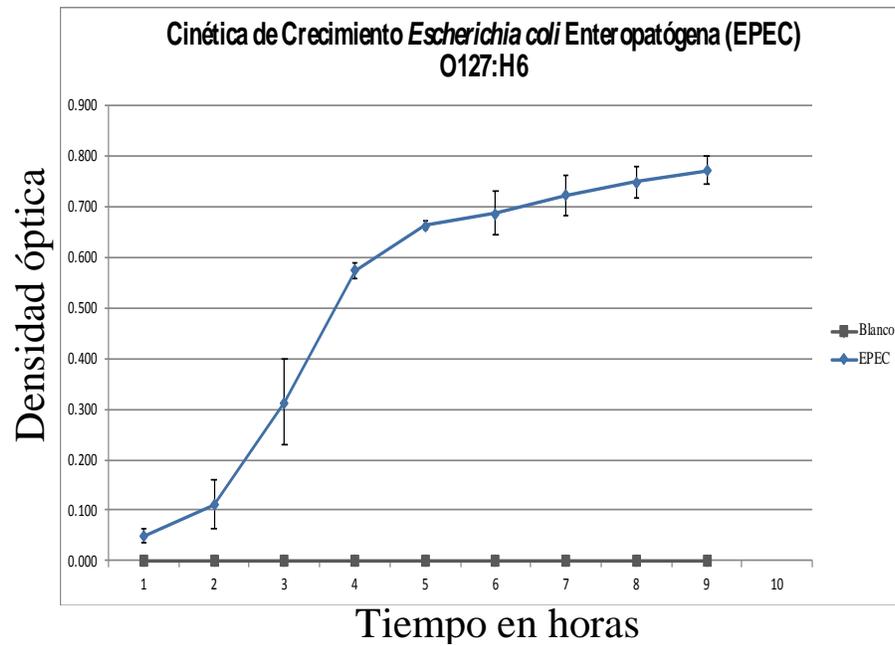
**Figura 15.** Productos de la PCR obtenidos a partir del ADN de EIEC y *Shigella sonnei* (Ss) Carriles: 1.- MPM 100 pb, 2.- *ial*, 3.-Ss y 5.- Control negativo *E. coli* 25922

- Curva de crecimiento bacteriano

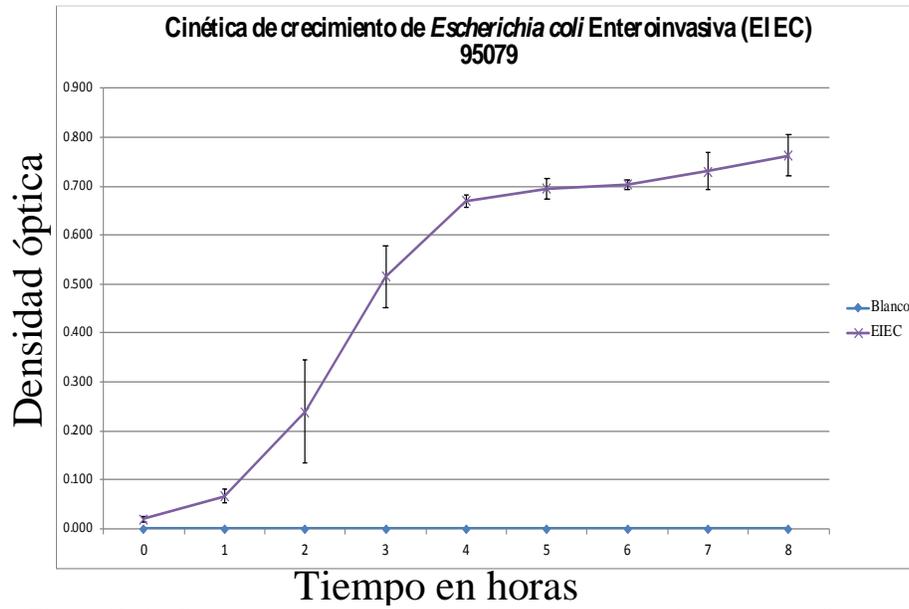
En las **figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22**, puede observarse que *Salmonella* Enteritidis y los diferentes patotipos de *E. coli* alcanzan su fase de crecimiento exponencial aproximadamente a un tiempo de 2.5 y 3 h en la longitud de onda de 420 nm., en el caso de *Campylobacter* esto ocurre en la hora 20.



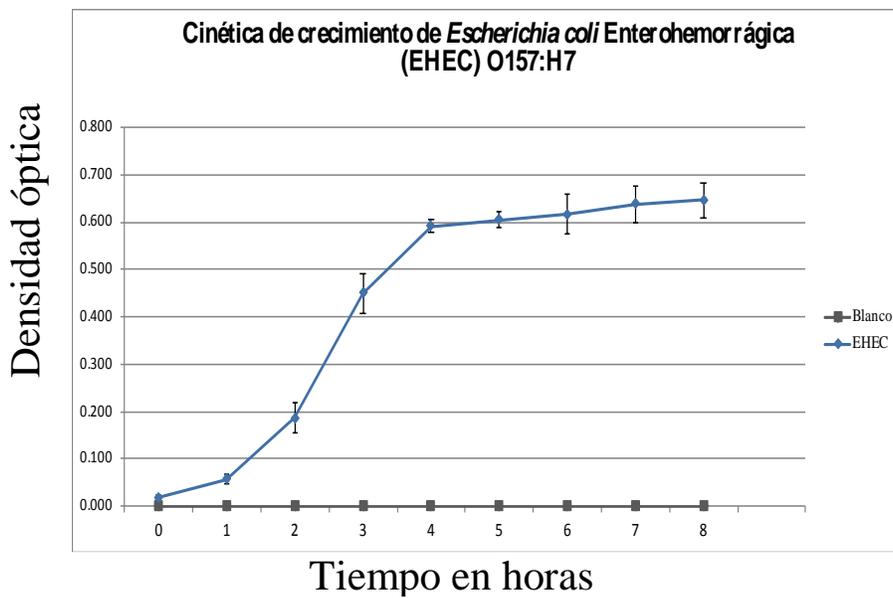
**Figura 16.** Gráfica de los promedios del crecimiento en 8 h de SE en medio LB



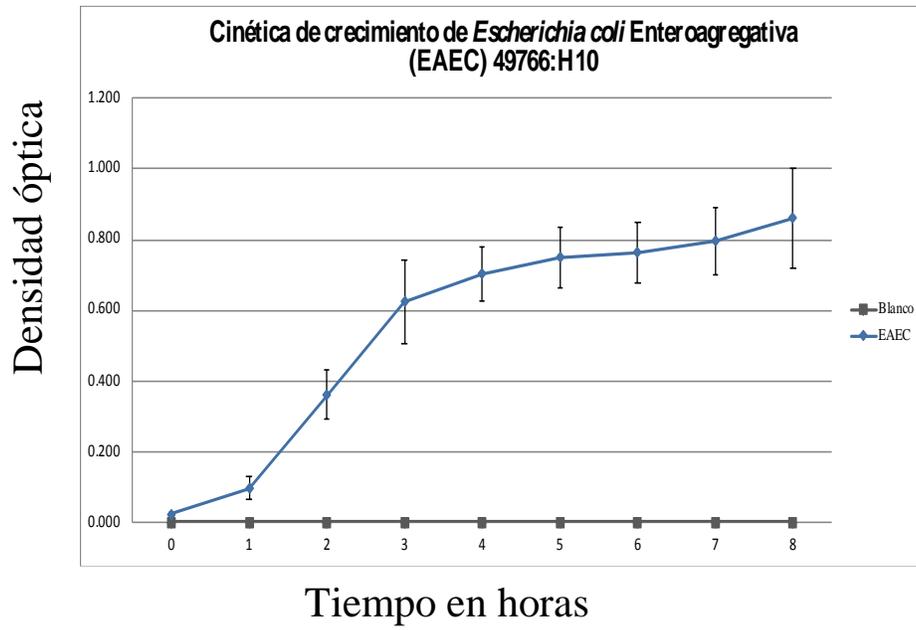
**Figura 17.** Gráfica de los promedios del crecimiento en 8 h de EPEC O127:H6 en medio LB



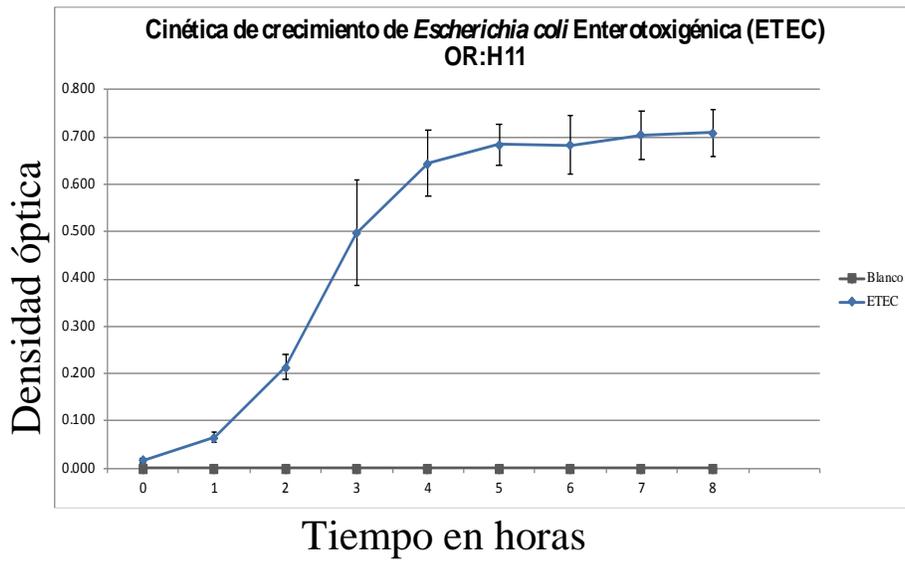
**Figura 18.** Gráfica de los promedios del crecimiento en 8 h de EIEC 95079 en medio LB



**Figura 19.** Gráfica de los promedios del crecimiento en 8 h de EHEC O157:H7 en medio LB



**Figura 20.** Gráfica de los promedios del crecimiento en 8 h de EAEC 49766 en medio LB



**Figura 21.** Gráfico de los promedios del crecimiento en 8 h de ETEC en medio LB

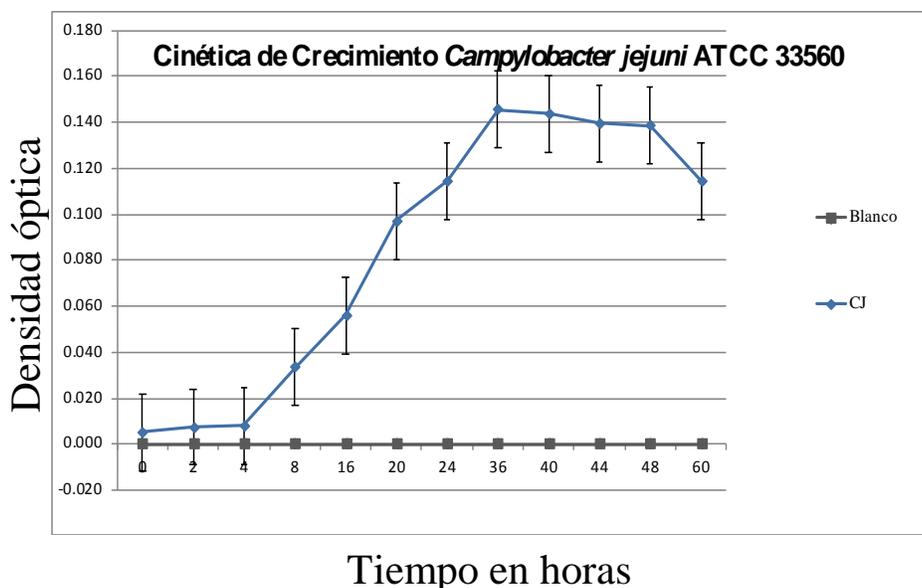


Figura 22. Gráfico de los promedios del crecimiento en 60 h de *C.jejuni* en medio brucella

- Conteo de Unidades Formadoras de Colonia a partir de las diluciones en PBS

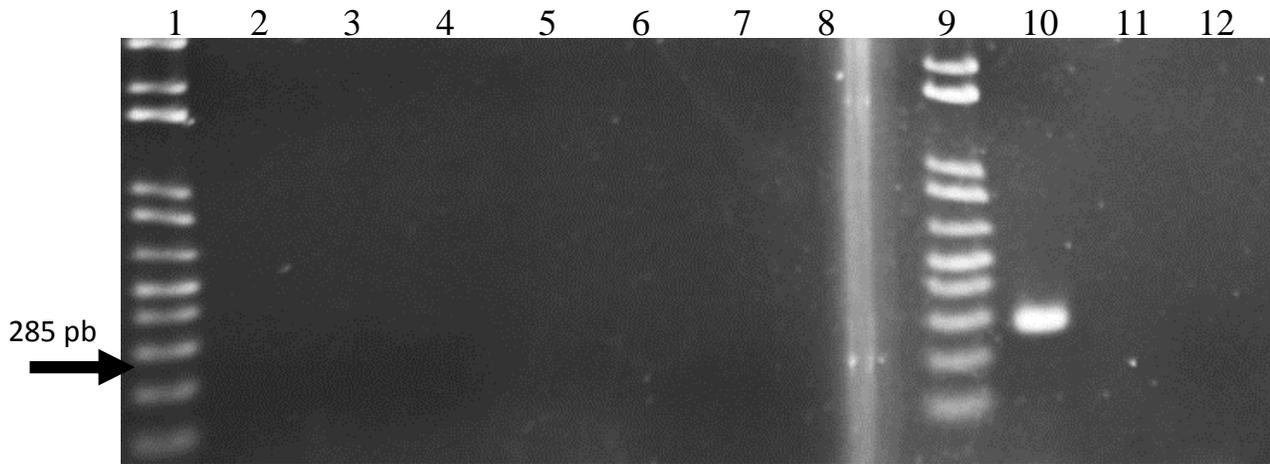
En el **cuadro 6** se muestran los promedios obtenidos del conteo de colonias de cada microorganismo Cj, SE, EPEC, EHEC, ETEC, EAEC y EIEC en las diluciones más altas. Se observa que en la dilución -10 es posible contabilizar colonias bacterianas a diferencia de la dilución -4 en donde no se pudo determinar la cantidad de bacterias.

**Cuadro 6.** Resultado del promedio de conteos de UFC de cada bacteria, valores por mililitro

Dilución	EHEC	EPEC	EAEC	ETEC	EIEC	SE	Cj
-10	0	0	0	0	0	0	0
-9	0	0	0	0	0	0	0
-8	3	3	2	2	3	3	5
-7	40	57	30	40	30	30	45
-6	382	168	242	328	242	485	617
-5	1969	1649	1591	2248	4075	2060	3005
-4	INCONTABLES						

- Concentración mínima detectable a partir de las diluciones en PBS

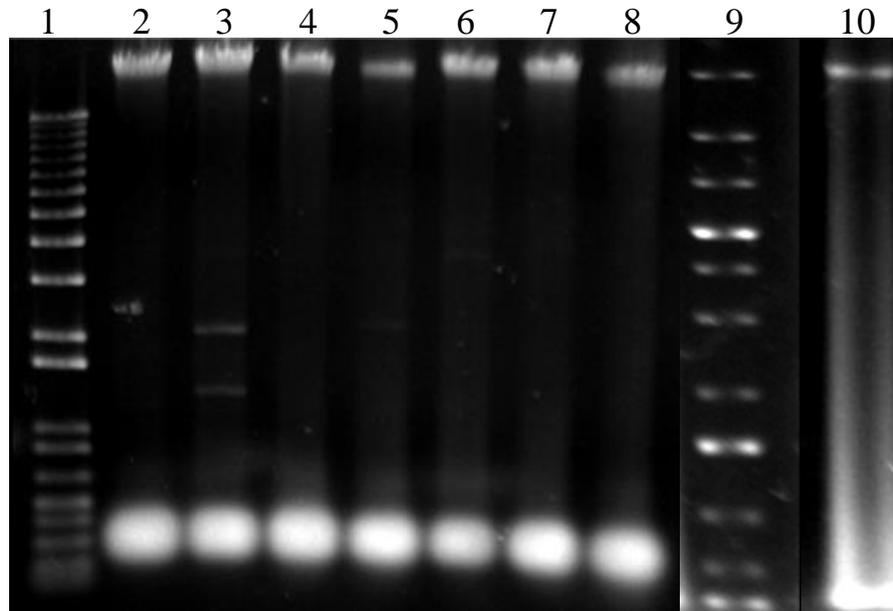
El ADN extraído de 1 mL de las diluciones realizadas en PBS se sometió a la PCR para cada gen, sin embargo, en ninguna de las diluciones se pudo recuperar ADN necesario para una amplificación. Se muestran en **la figura 23** los resultados de la PCR realizada a partir de la extracción de las diluciones de *Salmonella*.



**Figura 23.** Productos de la PCR obtenidos a partir de diluciones de SE ATCC 49214 en PBS, Carriles: 1 y 9.- MPM 1kb plus, 2.- ( $10^{-10}$ ), 3.- ( $10^{-9}$ ), 4.- ( $10^{-8}$ ), 5.- ( $10^{-7}$ ), 6.- ( $10^{-6}$ ), 7.- ( $10^{-5}$ ), 8.- ( $10^{-4}$ ), 10.- Control positivo SE(inóculo) 12.- Control negativo *E.coli* ATCC

- Concentración mínima detectable y saturación de la reacción

Se muestra ADN de cada bacteria (**Figura 24.**) empleado para diluciones y se utilizaron las concentraciones como se muestra en el **cuadro 7** los resultados obtenidos los valores fueron obtenidos según la fórmula de J. Doležel y col 2002.<sup>31</sup>



**Figura 24.** Productos de extracción de ADN; carriles 1 y 9.- MPM 1kb plus, 2.- SE ATCC 49214, 3.- *E.coli* ATCC 25922, 4.- EIEC 95079, 5.- EHEC O157:H7, 6.- EPEC O126:H6, 7.- ETEC O7:H104, 8.- EAEC 49766 10.- Cj ATCC 33560

**Cuadro 7.** Valores de concentración mínima detectable de bacterias con respecto a ADN y valores de concentración de ADN suficiente para saturar la reacción.

<b>Bacterias</b>	<b>Concentración mínima detectable</b>	<b>Bacterias detectadas</b>	<b>Saturación de la reacción</b>	<b>Gen detectado</b>
SE	500 fg	104	> 32 µg	<i>invA</i>
EHEC	1000 pg	176903	> 4 µg	<i>stx1</i>
EHEC	1000 pg	176903	> 8 µg	<i>stx2</i>
EHEC	500 pg	88452	> 8 µg	<i>eaea</i>
EPEC	500 pg	102035	> 8 µg	<i>eaea</i>
EPEC	500 pg	102035	> 16 µg	<i>bfpA</i>
ETEC	1000 pg	189776	> 8 µg	<i>lta</i>
ETEC	1000 pg	189776	> 8 µg	<i>sta</i>
Cj	1000 fg	596	> 32 µg	<i>flaA</i>
EAEC	500 pg	91311	> 16 µg	<i>aggr</i>
EIEC	500 pg	98837	> 16 µg	<i>ial</i>

- Colección y toma de muestras

La cantidad de muestras tomadas en diferentes puntos comerciales se muestran en el **cuadro 8**. Predominó el huevo para plato de gallina enjaulada, seguido del huevo de gallina libre y al final un subproducto pasteurizado.

**Cuadro 8.** Muestras empleadas en este estudio clasificadas de acuerdo a su denominación comercial. Las muestras marcadas con asterisco (\*) incluye huevo de gallina libre, campero, huevo de gallina libre orgánico y *cage free*

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Huevo para plato de gallina libre*	14	38.89
Huevo para plato de gallina en jaula	18	50.00
Claros líquidas	4	11.11
<b>Total de muestras (n)</b>	<b>36</b>	<b>100</b>

- Aislamiento bacteriológico

A partir de 36 muestras de huevo se obtuvo un aislado de *Escherichia coli* proveniente de la muestra 18, ninguno de *Salmonella* spp. o *Campylobacter* spp., en el **cuadro 9** se muestran los resultados.

**Cuadro 9.** Resultados del aislamiento bacteriológico enfocado a *Salmonella* spp. *E. coli* y *Campylobacter* spp. a partir de las muestras de huevo en sus diferentes presentaciones. Las muestras marcadas con asterisco (\*) incluye huevo de gallina libre, campero, huevo de gallina libre orgánico y *cage free*

Muestra de huevo	Positivos a <i>Salmonella</i> spp. por aislamiento	Positivos a <i>E.coli</i> por aislamiento	Positivos a <i>Campylobacter</i> spp. por aislamiento
Gallina libre*	0	1	0
Gallina en jaula	0	0	0
Claros Líquidas	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

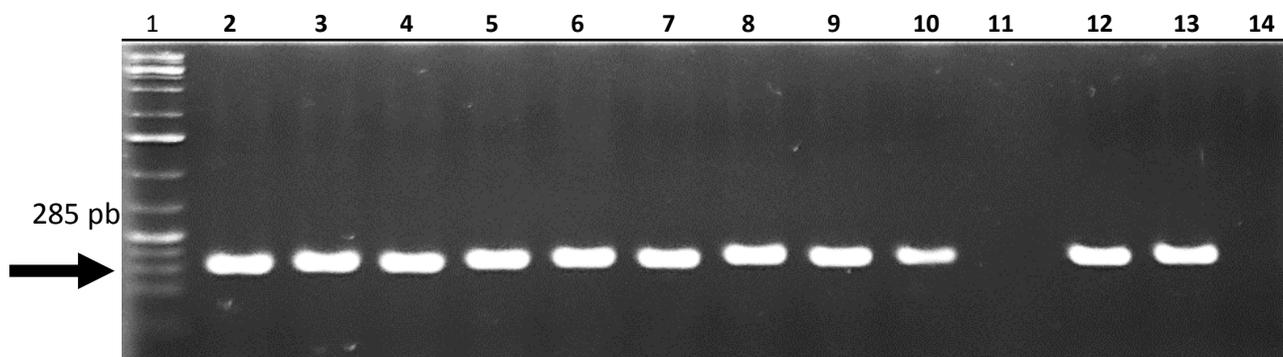
En los medios selectivos para los géneros *Salmonella*, *E. coli* y *Campylobacter* spp. se aislaron otros géneros como *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp. y *Klebsiella oxytoca*, en el **cuadro 10** se muestran la cantidad de cepas aisladas, así como la muestra de procedencia.

**Cuadro 10.** Cepas bacterianas aisladas a partir de las diferentes presentaciones de huevo. Las muestras marcadas con asterisco (\*) incluye huevo de gallina libre, campero, huevo de gallina libre orgánico y *cage free*. Valores marcados con doble asterisco (\*\*) corresponden a porcentajes obtenidos a partir del total de aislados con respecto al total de las muestras (n=36).

Muestra de huevo	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>K. oxytoca</i>
	Número (%)		
Gallina libre	5 (35.7)	1 (7.1)	0 (0)
Gallina en jaula*	2 (11.1)	0 (0)	0 (0)
Claros Líquidas	1 (25.0)	0 (0)	1 (25)
<b>Total</b>	<b>8 (22.2**)</b>	<b>1 (2.8**)</b>	<b>1.0 (2.8**)</b>

- PCR a partir de las muestras de huevo

En nueve de las muestras se amplificó un fragmento del gen *invA* correspondiente a *Salmonella* spp. (**Figura 25**) en las reacciones de *E. coli* diarrogénica y *Campylobacter* spp. no se obtuvo amplificado alguno.



**Figura 25.** Productos de la PCR obtenidos a partir de muestras de huevo positivas a la PCR de *Salmonella* empleando un fragmento del gen *invA*: 1 MPM 1kb plus, 2.- M2, 3.- M4, 4.- M5, 5.- M6, 6.- M29, 7.- M34, 8.- M36, 9.- M39, 10.- M32, 12.-Control positivo de extracción SE ATCC 49214 , 13.-Control positivo de reacción SE ATCC 49214 y 14 .- Control negativo *E.coli* ATCC 25922

En el **cuadro 11** se muestran los resultados obtenidos a partir de la PCR realizada a cada muestra de huevo a partir de la siembra en medios de enriquecimiento en las cuales fueron positivas a *Salmonella*; 2 muestras que provenían de huevo de gallina libre, 6 de huevo que provenía de gallina en jaula y 1 de huevo líquido.

**Cuadro 11.** Resultados de la PCR para la detección de *Salmonella* spp. variedades diarrogénicas de *E. coli* y *Campylobacter* spp. el valor indicado con dos asteriscos (\*\*) corresponde al porcentaje de positivos respecto al total de las muestras (n=36). Las muestras marcadas con asterisco (\*) incluye huevo de gallina libre, campero, huevo de gallina libre orgánico y *cage free*.

Muestra de huevo	Positivos a <i>Salmonella</i> spp. Número (%)	Positivos a <i>E. coli</i> Diarrogénica Número (%)	Positivos a <i>Campylobacter</i> spp. Número (%)
Gallina libre*	2 (14.3)	0 (0)	0 (0)
Gallina en jaula	6 (33.3)	0 (0)	0 (0)
Líquido	1 (25.0)	0 (0)	0 (0)
Total	9 (25**)	0 (0)	0 (0)

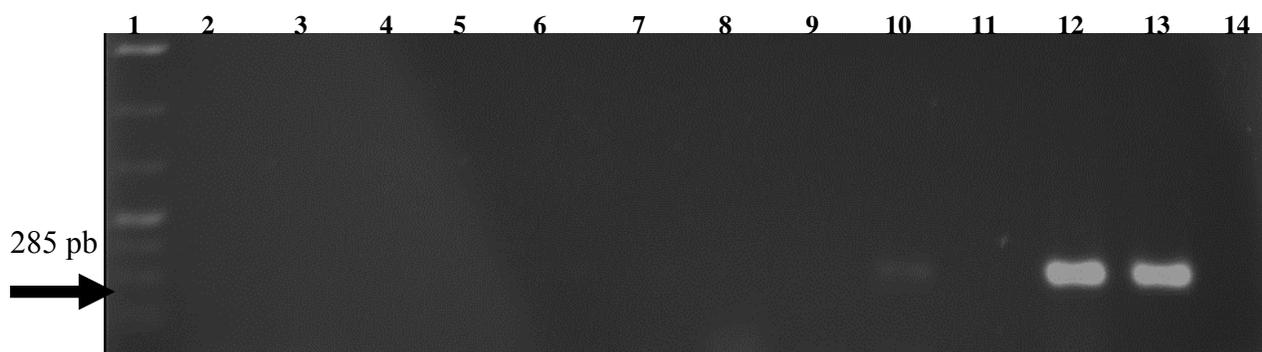
- Enriquecimiento de la muestra previo a la prueba molecular

Debido a que no se logró el aislamiento de *Salmonella* spp. pero si la amplificación de ADN de la bacteria, se realizó un ensayo para cuantificar colonias, a partir de un pre-inóculo en caldo Rappaport de 16 h se diluyó a partir de una dilución 1/100 preparando diluciones decuples seriadas (número más probable) y sembrando en agar MacConkey para conocer la cantidad de UFCs se podrían detectar a partir de un medio para *Salmonella* y posteriormente realizar la extracción de ADN de cada dilución en 1 mL los resultados se muestran en el **cuadro 12** en el cual se aprecia que en la dilución  $10^{-4}$ , que representa un aproximado de un millón de células bacterianas, se puede detectar *Salmonella* en la **figura 26** se observa este resultado. La decisión de emplear el medio Rappaport-Vassidialis se tomó debido a que fue el medio en donde se obtuvieron la mayoría de los resultados positivos para *Salmonella* en la PCR. Por lo anterior se decidió comparar los métodos de extracción de ADN empleando el protocolo del reactivo DNazol (Invitrogen®), un estuche comercial de DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen (Qiagen®) cuyos resultados observados fueron que apartir del estuche de Qiagen se detectaron aproximadamente diez mil bacterias y por medio del reactivo de

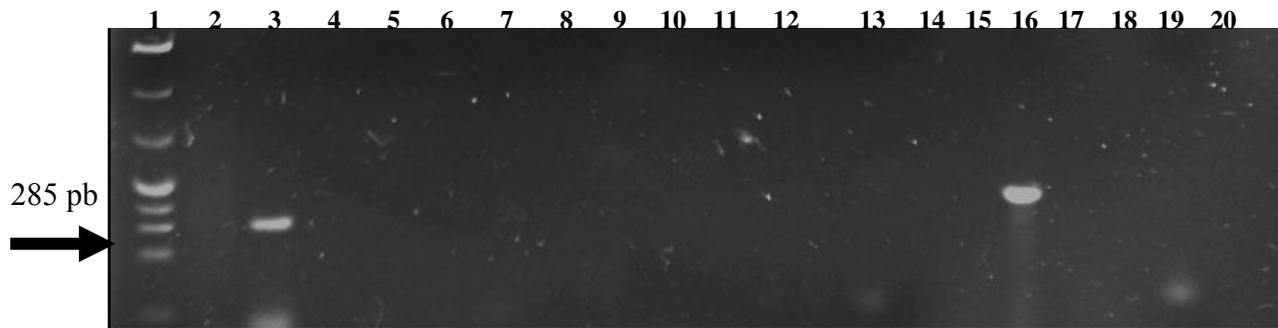
DNAzol se pudieron detectar aproximadamente un millón al igual que por el método del tiocianato, después de haber diluido a la bacteria en el caldo y tomar los volúmenes necesarios para cada extracción, el medio restante se dejó incubar durante 16 h y se le realizó la extracción de ADN por tiocianato de guanidina detectando ADN hasta la dilución  $10^{-9}$  en donde no se logro cuantificar por siembra bacterias como se aprecia en las **figuras 27, 28 y 29**.

**Cuadro 12.** Diluciones décuples realizadas en caldo Rappaport-Vassidialis a partir de un inóculo con SE de 16 h en RV, la dilución  $1/10^9$  fue la última en donde se pudieron contar colonias. Dilución  $10^{-4}$  fue donde se pudo detectar ADN de la bacteria por medio de la extracción con tiocianato de guanidina al igual que con el reactivo de DNAzol. Dilución  $10^{-6}$  se pudo detectar empleando el método de extracción del estuche comercial de Qiagen, en la dilución  $10^{-10}$  se pudo detectar incubando a la batería 16 h en el medio RV. Resultados promedio de tres experimentos realizados por duplicado. Valores por mililitro

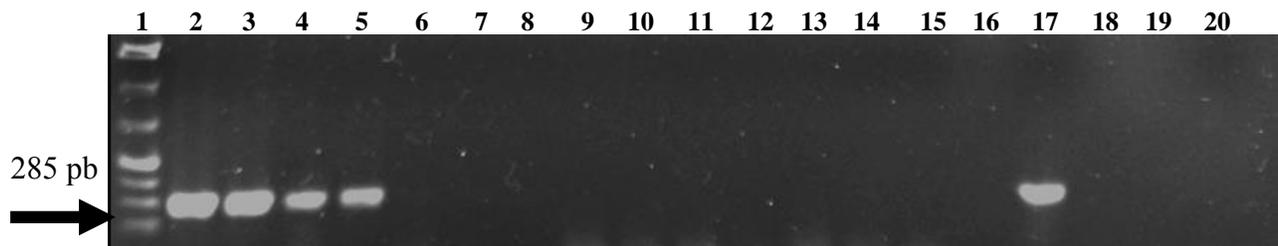
	Dilución	# de Colonias	Tiocianato (16h RV)	Tiocianato (sin incubar)	Kit	DNAzol
Tubo	16 h	Incontables	+	+	+	+
1	$10^{-4}$	Incontables	+	+	+	+
2	$10^{-5}$	Incontables	+	-	+	-
3	$10^{-6}$	Incontables	+	-	+	-
4	$10^{-7}$	1883	+	-	-	-
5	$10^{-8}$	283	+	-	-	-
6	$10^{-9}$	54	+	-	-	-
7	$10^{-10}$	0	+	-	-	-
8	$10^{-11}$	0	-	-	-	-
9	$10^{-12}$	0	-	-	-	-
10	$10^{-13}$	0	-	-	-	-



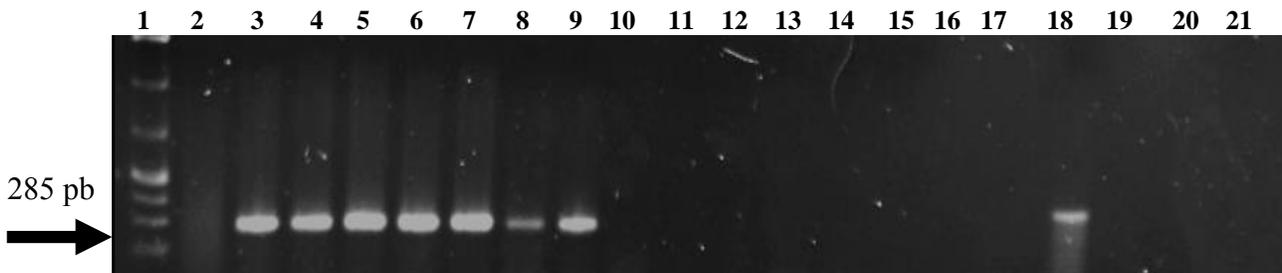
**Figura 26.** Productos de la PCR obtenidos a partir de la amplificación de las diluciones décuples de SE realizadas en caldo Rappaport Vassidialis: 1.- MPM 1kb plus (Thermo Scientific) 2.-  $10^{-12}$ , 3.-  $10^{-11}$ , 4.-  $10^{-10}$ , 5.-  $10^{-9}$ , 6.-  $10^{-8}$ , 7.-  $10^{-7}$ , 8.-  $10^{-6}$ , 9.-  $10^{-5}$ , 10.-  $10^{-4}$ , 12.- Control positivo de extracción SE 16 h, 13.- Control positivo de reacción SE ATCC 49214 y 14.- Control negativo *E.coli* ATCC 25922.



**Figura 27.** Productos de la PCR obtenidos a partir de la amplificación de las diluciones décuples de SE realizadas en caldo Rappaport Vassidialis: 1.- MPM 1kb plus (Thermo Scientific) 3.-  $10^{-4}$ , 4.-  $10^{-5}$ , 5.-  $10^{-6}$ , 6.-  $10^{-7}$ , 7.-  $10^{-8}$ , 8.-  $10^{-9}$ , 9.-  $10^{-10}$ , 10.-  $10^{-11}$ , 11.-  $10^{-12}$ , 12.-  $10^{-13}$ , 16.-Control positivo SE 16h y 19.- Control negativo *E.coli* ATCC 25922.



**Figura 28.** Productos de la PCR obtenidos a partir de la amplificación de las diluciones décuples de SE realizadas en caldo Rappaport Vassidialis: 1.- MPM 1kb plus (Thermo Scientific) 2.- Dilución 1/100 de SE, 3.-Inóculo de SE, 4.-  $10^{-4}$ , 5.-  $10^{-5}$ , 6.-  $10^{-6}$ , 7.-  $10^{-7}$ , 8.-  $10^{-8}$ , 9.-  $10^{-9}$ , 10.-  $10^{-10}$ , 11.-  $10^{-11}$ , 12.-  $10^{-12}$ , 13.-  $10^{-13}$ , 14.- CRV sin inocular, 17.-Control positivo SE 16 h y 20.- C- *E.coli* ATCC 25922.

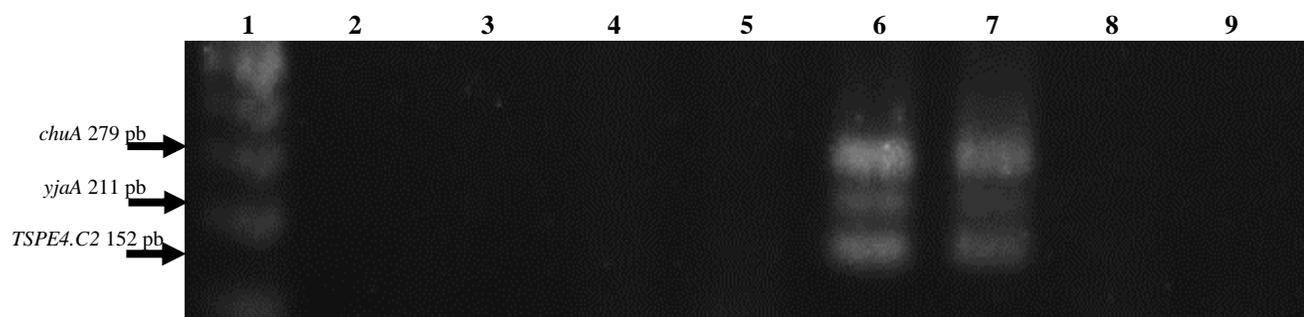


**Figura 29.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en SB con los productos de la PCR obtenidos a partir de la amplificación de las diluciones décuples de SE realizadas en caldo Rappaport Vassidialis: 1.- MPM 1kb plus (Thermo Scientific), 3.-  $10^{-4}$ , 4.-  $10^{-5}$ , 5.-  $10^{-6}$ , 6.-  $10^{-7}$ , 7.-  $10^{-8}$ , 8.-  $10^{-9}$ , 9.-  $10^{-10}$ , 10.-  $10^{-11}$ , 11.-  $10^{-12}$ , 12.-  $10^{-13}$ , 13.- CRV sin inocular, 18.-Control positivo SE 16h y 20.- Control negativo *E.coli* ATCC 25922.

La cepa obtenida a partir de la muestra 18 se sometió a la PCR con los oligonucleótidos que amplifican fragmento de los genes para *E.coli* diarrogénica, enlistados en el **cuadro 1**, sin embargo, no se obtuvo ningún amplificado, por lo cual la cepa fue proporcionada al laboratorio de patogenicidad microbiana del Hospital Infantil de México Federico Gómez donde se le realizó PCR para su caracterización a partir de cuatro colonias de la y se reportaron los siguientes resultados enlistados en el **cuadro 13**. Asimismo, en la **figura 30** se observa la fotografía de un gel de agarosa con los productos de la PCR en la cual se emplearon los iniciadores para la detección de genes para la clasificación de filogrupos de *E. coli* como lo describieron Clermont y col. en el 2000<sup>32</sup>, se aprecia que ninguna de las clonas pertenecientes a la cepa 18 amplificó algún fragmento lo que indica que se trata de una *E. coli* del filogrupo A con lo cual se determina que es un comensal del tracto digestivo y no pertenece a extraintestinales, aunque posee dos genes de virulencia correspondiente al patotipo UPEC.

**Cuadro 13.** Genes buscados en la cepa 18, se utilizaron 4 diferentes clonas de la cepa, y se incluyeron oligonucleótidos para la determinación de filogrupo

Gen	Resultado
<i>iutA</i>	-/-/-
<i>fimH</i>	+/-/-
<i>papC</i>	-/-/-
<i>Sat</i>	-/-/-
<i>Pic</i>	+/-/+
<i>aggR</i>	-/-/-
<i>Afa</i>	-/-/-
<i>sat1</i>	-/-/-
<i>Iron</i>	-/-/-
<i>FyuA</i>	-/-/-
<i>papa</i>	-/-/-
<i>OmpT</i>	-/-/-
<i>irp2</i>	-/-/-
<i>Kps</i>	-/-/-
<i>chuA</i>	-/-/-
<i>yjaA</i>	-/-/-
<i>TspE4.C2</i>	-/-/-



**Figura 30.** Productos de la PCR múltiple para la determinación de filogrupo de *E. coli* carriles 1 MPM 100 pb invitrogen, 2-5.- cepa 18, 6-7 Control positivo CFT(UPEC), pb carriles 8 y 9.- Control negativo

## DISCUSIÓN

En este trabajo se detectó ADN de *Salmonella* spp. a partir de muestras de huevo lo cual sugiere que éste es un vehículo para la transmisión de la bacteria como se ha demostrado anteriormente en otros países,<sup>5,6, 33, 34</sup> esto implica que en México también podrían existir casos de Salmonelosis asociados al consumo de huevo, sin embargo, al no existir un sistema de vigilancia estructurado como ocurre en otros países, probablemente no se reporten de manera adecuada. Asimismo, el sistema de salud mexicano tiene diversos problemas para el diagnóstico de esta enfermedad debido a que es escasa la búsqueda por aislamiento bacteriológico o biología molecular en pacientes que sugieren un cuadro clínico febril o de diarrea, otro problema que se enfrenta en México es la escasa información epidemiológica en los portales de los diversos sistemas de vigilancia<sup>35, 36</sup> esto resalta la importancia de reforzar los sistemas de vigilancia epidemiológica ya que en nuestro país el diagnóstico clínico de la Salmonelosis se basa solo en exploración, signos y síntomas. Únicamente en hospitales de infraestructura gubernamental se realiza el aislamiento, mientras que en la clínica particular no se realiza la búsqueda del patógeno en cuestión de manera rutinaria y cuando se lleva a cabo es por medio de reacciones febriles. En los países de la Unión Europea los casos sospechosos a Salmonelosis son de reporte inmediato para la búsqueda e identificación del patógeno, así como la fuente del caso. La manera por la cual las muestras de huevo positivas a *Salmonella* spp. pudieron haberse contaminado involucra diversos escenarios, algunos de ellos descritos por Gantois y col., en 2009,<sup>6</sup> el primero de ellos es la transmisión vertical de *Salmonella* spp. a través de una gallina infectada la cual enfrenta un proceso de invasión por parte de la bacteria y por medio de diseminación sistémica coloniza las diferentes porciones del tracto reproductor del ave, evento por el cual alguno de los componentes internos del huevo pudieran resultar contaminados; otro posible escenario descrito por Gantois es la transmisión horizontal por medio de materia fecal de aves infectadas que al ovopositar sobre barros contaminados con materia fecal en la cual se estuviese excretando *Salmonella* spp., al entrar en contacto con este fómite contaminan las estructuras externas del huevo (cascarón) evento que fue demostrado en 1990 por Padrón quien por medio de aspersión y contacto directo, comprobó que *S. Typhimurium* puede atravesar el cascarón de huevo a través de sus poros en un periodo de 10 minutos.<sup>37</sup> En el caso de aquellos huevos ovopositados por aves que producen en sistemas extensivos, también llamados de libre pastoreo este proceso puede presentarse ya que Padrón también demostró a través de cama contaminada con ST que la bacteria puede contaminar el interior del huevo en el mismo periodo de tiempo que la aspersión.<sup>37</sup> Otro escenario probable de contaminación del huevo, es la manipulación por personas con las manos contaminadas en aquellos sistemas en donde la recolección de este producto es manual.

En el presente trabajo no se logró el aislamiento de *Salmonella* spp. mediante la metodología establecida por la NOM-210 SSA 2014<sup>25</sup>, sin embargo, se logró la amplificación de un fragmento del gen *InvA*, lo cual sugiere que la bacteria estuvo presente y fue inactivada por acción de los factores antimicrobianos del huevo como: lisozima también conocido como muramidasa que destruye los enlaces  $\beta$  1-4 de N-acetilmurámico del peptidoglucano como lo demostró Philips en 1966,<sup>38, 39</sup> ovotransferrina proteína capaz de ligarse de manera reversible a iones de hierro, como lo demostraron Williams en 1968, Thibodeau en 1978, Dorland en 1979 y Lee en 1980, dado que el hierro ( $Fe^{++}$ ) es un ión esencial para el desarrollo

de las bacterias esta proteína tiene una importante actividad antibacteriana lo cual fue comprobado por Bullen en 1978.<sup>38, 40, 41, 42, 43, 44</sup> Por otro lado las proteínas ligadas a riboflavina llamadas también flavoproteínas son moléculas capaces de unirse a la riboflavina como lo demostró Miller en 1981, la riboflavina es un factor de crecimiento empleado por las bacterias y al ligarse a moléculas como las flavoproteínas no puede ser empleada por éstas.<sup>38, 45</sup> Otro compuesto es la avidina, proteína que se une fuertemente a la biotina, otro factor de crecimiento empleado por las bacterias, y al unirse este factor con la avidina deja de estar biodisponible dificultando el desarrollo bacteriano como lo demostró Green en 1975.<sup>38, 46</sup> También existe la posibilidad de que la bacteria se encontrara viable pero sin crecimiento en los medios de cultivo sólidos como lo reportaron Roszak y Grimes en 1984, quienes determinaron por medio de siembra de *S. Typhimurium* en agua de río estéril, ésta perdía la capacidad de crecer en los medios sólidos, debido a las condiciones astringentes, pero después de haber sido incubada a 37°C durante 96 h en medio líquido de Infusión Cerebro y Corazón el microorganismo crecía de manera óptima en los agares selectivos.<sup>47</sup> En este trabajo durante el aislamiento se emplearon los medios Rappaport-Vassidialis y Tetrionato de Sodio, medios de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp., con el uso del primero, se obtuvo un mejor resultado para la inhibición de microorganismos contaminantes debido a sus condiciones de alta osmolaridad dadas por el MgCl<sub>2</sub> y el efecto antimicrobiano brindado por el verde de malaquita,<sup>48, 49</sup> esto obliga a *Salmonella* spp. a enfrentarse a condiciones para sobrevivir evitando una adecuada adaptación a medios de cultivo en placa, lo cual sugiere emplear en conjunto la metodología de Roszak y Grimes en caldo infusión de cerebro y corazón para posteriormente realizar el enriquecimiento selectivo de la bacteria. En el caso del medio Tetrionato a pesar de ser selectivo permitió el desarrollo de *Pseudomonas* spp. que afectan el crecimiento de *Salmonella* spp. por competitividad.<sup>50</sup> Por lo anterior se sugiere una modificación de la metodología de aislamiento de *Salmonella* de la NOM que incluya un preenriquecimiento con medios como Infusión Cerebro Corazón o caldo brucella, seguido de un enriquecimiento en Rappaport y selenito de sodio, y posteriormente agares; sulfito de bismuto, XLD o salmonella-shigella y medio Hektoen de baja selectividad ya que el medio verde brillante.

Durante la metodología de detección molecular por medio de PCR de *Salmonella* spp. se observó que la prueba es sensible y específica ya que puede detectar hasta 500 fg de ADN que representa aproximadamente 100 bacterias, esto se determinó a partir de una dilución de ADN, sin embargo, durante las diluciones directamente de la bacteria viva en PBS o medio Rappaport se detectaban cantidades muy altas de bacteria debido al proceso de extracción de ADN por esa razón se realizó la extracción con un estuche comercial de Qiagen® y por medio de la solución de DNAzol® mostrando mejores resultados el estuche comercial en diluciones de la bacteria, también a partir de las mismas diluciones en RV se dejó incubar el medio con las bacterias durante 16 h detectando ADN por medio de la extracción con el método del tiocianato de guanidina en todas aquellas en las cuales se había logrado contabilizar y en una dilución en las cuales no se observó crecimiento lo cual demuestra la necesidad de enriquecimiento previo de la muestra para la detección molecular.

En este trabajo no se logró el aislamiento ni detección por medio de la PCR de *Campylobacter* spp. lo que podría indicar que la bacteria no se encontraba presente en las muestras de huevo, lo que puede sugerir que las muestras provenían de aves que no eran portadoras de *Campylobacter* spp. pues esta bacteria puede transmitirse de manera vertical y

es común aislar a la bacteria de animales que son portadores y sus subproductos.<sup>7</sup> Otra posible explicación es la incapacidad de la bacteria para colonizar el interior del huevo en caso de que la contaminación fuera de manera horizontal ya que la capacidad de *Campylobacter* spp. de atravesar el cascarón empleando soluciones acuosas fue descrita previamente<sup>51</sup> mientras que Niel en 2008 demostró que *Campylobacter jejuni* muere en las membranas del cascarón debido a la atmósfera adversa de estas estructuras.<sup>52</sup>

Para poder determinar la verdadera ausencia del patógeno se sugiere realizar un estudio con un número mayor de muestras, además de realizar algún estudio donde se evidencie la ausencia de esta bacteria en huevo, esto debido a su estado de viable no cultivable (VNC) inducido por un ambiente desfavorable; es decir, la bacteria puede disminuir su metabolismo, de tal manera que en medios de cultivo no puede ser detectada, únicamente con tinciones especiales o por medio de PCR cuantitativa.<sup>53</sup> También existe la posibilidad de que la bacteria sea eliminada de manera eficaz por los mecanismos antimicrobianos inherentes del huevo como lo demostró Fonseca y col. en 2014, quienes por medio de cama contaminada con *Campylobacter jejuni* en un lapso de 3 h la bacteria logró penetrar a través del cascarón, sin embargo la viabilidad de la bacteria fue nula, y se detectó ADN de la misma por medio de qPCR.<sup>54</sup> Lo anterior se fundamenta en el hecho de que en México como ocurre con la presencia de *Salmonella* spp., la Campilobacteriosis es subdiagnosticada o diagnosticada de manera equivocada como lo publicó Hernández en 2013.<sup>55</sup> Esto subraya la necesidad de reforzar el sistema de vigilancia epidemiológica. Otro problema es la falta de protocolos estandarizados para el aislamiento y la detección de dicha bacteria; en este trabajo se empleó la metodología propuesta por el BAM<sup>56</sup> debido a que en México no existen protocolos validados para el aislamiento de esta bacteria en el país.

Durante la búsqueda de bacterias diarrogénicas en este trabajo se aisló una cepa de *Escherichia coli* a partir de la muestra identificada con el número 18, de gallina en libre pastoreo abriendo diversos escenarios, uno en el cual la bacteria en cuestión podría haber contaminado el huevo de manera que previamente invadió los órganos reproductivos de la gallina como lo demostró Ozaki en 2009<sup>8</sup>, sin embargo, durante la identificación de genes de virulencia no se encontró evidencia que pudiera asociar a esta bacteria a un proceso patogénico en aves, pero da paso a otro escenario en el cual puede sugerir la contaminación ya sea de cama, o manipulación por los operarios con lo cual se puede especular sobre el manejo higiénico que está teniendo este producto alimenticio y abre paso al cuestionamiento sobre la capacidad de patotipos sobre la contaminación de este alimento, además durante la búsqueda de genes para la clasificación de la bacteria en filogrupos se determinó que esta pertenece a los comensales del tracto gastrointestinal, sin embargo, se detectaron dos genes de virulencia lo cual puede ofrecer la idea de la existencia de transferencia horizontal de genes como se ha presentado en diversas especies bacterianas y descrita con anterioridad en *E. coli*<sup>57,58</sup> Al abrirse un escenario en el cual, en algún momento, esta bacteria puede adquirir genes de virulencia asociados a enfermedad en aves y humanos, así como genes de resistencia a antimicrobianos y que esta cepa de *E. coli* apatógena sea un vehículo de transferencia de resistencia a otras bacterias, en el anexo 3 se muestran las sensibilidades y resistencias a quimioterapéuticos antimicrobianos en donde se muestran antibióticos que no puede eliminarla, además que durante el proceso de aislamiento esta cepa fue encontrada además de los medios especializados para su aislamiento, en aquellos medios con antibióticos como lo es el caldo Bolton y posteriormente en el medio para *Campylobacter* spp., lo cual apoya

lo mencionado y expone la necesidad de la búsqueda con más escrutinio de esta bacteria, así como un control en la administración de antibióticos empleados como terapia en las aves de producción.

Otro escenario posible es la contaminación horizontal en la cual por medio de mucosas o superficies contaminadas con *E. coli*; como en el caso de producción en libre pastoreo, jaulas contaminadas con heces, o a través de las manos de algún operario, estos escenarios aún no se han confirmado o reportado, sin embargo, al ser una bacteria que comparte múltiples características con *Salmonella* spp. la probabilidad de la presencia de esta bacteria es amplia.

En este trabajo se aislaron ocho cepas de *Pseudomonas aureginosa* que en su totalidad mostraron un fenotipo multirresistente, además la cepa identificada como 34 que mostró un fenotipo de resistencia a 14 de 16 quimioterapéuticos probados (ver Anexo 3) posee genes de resistencia a cloranfenicol, aminoglucósidos y sulfonamidas, que fueron identificados de manera paralela por el eMVZ. Leonardo Villavicencio Monroy y que posteriormente empleó como control positivo para estos genes para la PCR. Estas cepas, además, se desarrollaron, en todos los medios selectivos empleados para enterobacterias, así como en los medios para *Campylobacter* spp. que poseen antibióticos para la inhibición de contaminantes y el caldo de enriquecimiento para *Salmonella* spp. tetracionato que tiene antibiótico, verde brillante y tetracionato de sodio lo cual demuestra su capacidad de tolerancia a ambientes desfavorables. Con anterioridad se ha demostrado la virulencia de esta bacteria en individuos con sistema inmuno-comprometidos, asociado a infecciones intranosocomiales o en aquellos con fibrosis quística, en quienes representa un serio problema debido al difícil tratamiento por su marcada resistencia natural y adquirida.<sup>59, 60, 61, 62, 63, 64</sup> Lo anterior como inconveniente principal sobre todo en personas con cuestiones de salud se recomienda ampliamente el consumo de huevo debido a su gran aporte nutricional, sobre todo el contenido de proteínas de fácil digestión; a pesar de todos los beneficios que ofrece el huevo se ha reportado la presencia de esta bacteria en huevo no sólo de gallina y pato el cual se consume con gran frecuencia en el oriente del mundo.<sup>38,64</sup>

La regularidad con que este microorganismo contamina el huevo se ha reportado durante muchos años ya que es un microorganismo proteolítico también llamado alterador,<sup>65, 66</sup> sin embargo no se le ha dado la importancia no solo por lo ya mencionado. *Pseudomonas* spp. puede transferir resistencia a antibacterianos a otras especies bacterianas por medio de elementos genéticos móviles como transposones, fagos y conjugación, un ejemplo estudiado es con *E. coli*.<sup>67, 68, 69, 70</sup> Esto demuestra el riesgo de diseminación de resistencias a bacterias patógenas y la emergencia de estas que puede resultar en un panorama epidemiológico desfavorable no solo en la medicina veterinaria, también en la salud pública debido a los frecuentes reportes de cepas multirresistentes y la dificultad de solucionar cuadros clínicos ocasionados.<sup>71</sup> Lo anterior pone en manifiesto la necesidad de enfocar la atención a estas cepas “ambientales” que portan múltiples genes de resistencia y que en ciertas circunstancias se comportan como patógenos.

En el proceso de recuperación de cepas a partir de huevo se aislaron *Aeromonas hydrophila* y *Klebsiella oxytoca*. En el caso de *A. hydrophila* un organismo que se encuentra de manera habitual en cuerpos de agua y causa problemas en diversas especies de peces, también ha sido reconocida como un organismo que puede ser hallado en el huevo de gallina como un alterador al igual que *Pseudomonas* spp.<sup>72,73</sup> y los riesgos que puede tener son muy similares ya que posee múltiples resistencias. Un factor importante para establecimiento de esta

bacteria es la humedad, esto es indicador de un alto porcentaje de humedad en la caseta o en la cama ya que la cepa obtenida fue aislada apartir de huevo de gallina libre, otro escenario posible es el uso de soluciones para el lavado del huevo que se encuentra sucio y esto imposibilita la venta por lo cual diversos productores emplean limpieza *in situ* por medio de paños húmedos o lavado del huevo, lo cual está contraindicado en la norma.

El hallazgo de *K. oxytoca* es un evento aislado, sin embargo, el hecho de haber sido obtenida de un producto pasteurizado abre la posibilidad a los cuestionamientos sobre el funcionamiento del proceso térmico empleado, no solo porque es una bacteria multirresistente sino que además pertenece a la familia de enterobacteriales lo cual propone que si este proceso no logra eliminar a *Klebsiella*, podría ser indicador de otros microorganismos tales como *Salmonella* o *E. coli*. En este caso la cepa de *K. oxytoca* se pudo recuperar aún en medios con antibióticos (medio Bolton y agar campylobacter) así como a partir del medio tetrionato de sodio observando una gran capacidad de adaptación a medio ambientes astringentes.

En conjunto estos hallazgos de múltiples cepas ofrecen una interpretación general como indicadores sanitarios, y su presencia expone la posibilidad de que microorganismos patógenos primarios pudieran encontrarse presentes, en el caso de los productos pasteurizados también son marcadores de que el proceso podría no ser suficiente para la destrucción de patógenos.

Los resultados obtenidos muestran un panorama general acerca de la situación epidemiológica del país, desde diferentes enfoques, el primero de ellos, y más favorable, es que a pesar de haberse demostrado la presencia de *Campylobacter* en canales de ave para consumo,<sup>74</sup> la presencia de *Campylobacter* pudiera verse limitada debido a las características inherentes del huevo las cuales la eliminarían eficazmente. En el caso de *Escherichia coli* diarrogénica, hasta la fecha no hay reportes acerca de infecciones relacionadas por el consumo de huevo en el mundo sin embargo los sistemas de vigilancia deben poner atención en este microorganismo. El segundo enfoque y más importante es la presencia de *Salmonella* detectada por medio de métodos moleculares pero no por metodologías oficiales, que da una visión general del problema el cual se enfrenta al subreportar casos de *Salmonella* asociados con alimentos debido a su escaso aislamiento, y que también debe ser una llamada de atención para el sector productor de huevo y más relevante al sector consumidor al que México lleva el primer lugar a nivel mundial, estos resultados en conjunto ponen en manifiesto la necesidad de realizar trabajos con mayor alcance y mayor presupuesto en las cuales iniciativas pública y privada logren dar a conocer el verdadero nivel del problema (incidencia y prevalencia) así como datos reales sobre las serovariedades de este microorganismo que se encuentren de manera frecuente en campo.

Es difícil establecer debido a la naturaleza de las cepas de *Pseudomonas*, que son bien conocidos sus mecanismos de resistencia a antibióticos, la forma por la cual adquirieron resistencia a diversos grupos de quimioterapéuticos y es temerario aseverar que se debe al empleo de antibióticos en producciones avícolas como profilaxis o como terapéutica, sin embargo, es tema que ha sido controvertido en las últimas tres décadas. La rastreabilidad de los lotes positivos a *Salmonella* por medio de PCR es un proceso que debe ser vigilado por la autoridad ya que la injerencia de un tercero puede prestarse a situaciones de seguridad alimentaria y legales.

## CONCLUSIONES

- Se detectó ADN de *Salmonella* spp. a partir del 22% de las muestras, de cada categoría de huevo el 33.3% corresponde a gallina productora de huevo en jaula, 25 % de clara líquida y 14.3 % de gallina en piso donde se detecto ADN de la bacteria.
- Es necesario el enriquecimiento previo de la muestra para el proceso de la PCR.
- La PCR fue más sensible que el procedimiento de cultivo indicado en la NOM-210-SSA-2014 sobre *Salmonella* spp.
- Se aisló una cepa de *E.coli* comensal a partir de una muestra de huevo de gallina de crianza libre, un 97.62 % de las muestras fue negativo por aislamiento y el 100% por medio de la PCR.
- No se encontró la presencia de *Campylobacter* spp. por medio de bacteriología o biología molecular en las muestras de huevo, el 100% de las muestras fueron negativas a la presencia de *Campylobacter* spp. por bacteriología y biología molecular.

## **PROSPECTIVA**

- Emplear un número de muestras mayor que aproxime la verdadera incidencia de *Salmonella* presente en el huevo en México, asimismo, que descarte la presencia de *Campylobacter* y *E. coli*.
- Utilizar la PCR como técnica de detección de patógenos en huevo.
- Incluir el medio Infusión cerebro corazón como un previo enriquecimiento de muestras para el aislamiento de *Salmonella* spp.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1.- Unión Nacional de Avicultores (UNA); Indicadores Económicos 2017 en línea <http://una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> Visitado 03/06/2017
- 2.- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP); Atlas Agro Alimentario 2016, Primera Edición 2016
- 3.-DOF, NOM-159-SSA1-1996; Bienes y servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- 4.- José Antonio Quintana; Avitecna, Manejo de las Aves Domésticas más comunes, 4 ed, México Distrito Federal, Editorial Trillas, 2013.
- 5.-European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014, 2015
- 6.- Gantois I., Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F.; Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis, FEMS Microbiol Rev.2009
- 7.- Cox N. A., Richardson L. J., Maurer J. J. , Berrang M.E., Fedorka-Cray P.J., Buhr R.J., Byrd J.A., Lee M.D., Hofacre C.L., O'Kane P.M., Lammerding A.M., Clark A.G., Thayer S.G., Doyle M.P.; Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny., J Food Prot., 2012.
- 8.- Ozaki H., Murase T.; Multiple routes of entry for *Escherichia coli* causing colibacillosis in commercial layer chickens., J Vet Med Sci., 2009.
- 9.- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(7):2465-2467.
- 10.-Giannella RA. *Salmonella*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 21. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>
- 11.- WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.
- 12.- Centers for Disease Control and Prevention (cdc). National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.
- 13.- Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Disponible en url: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-07-12/signs-symptoms.html>
- 14.- Flores CR. Epizootiología de las Salmonelosis en Bovinos, Porcinos y Aves. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias S.A.R.H. Palo Alto, México, D.F. Clínica Veterinaria. 1981;3: 148-175.
- 15.-Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México 2000;42(6):490-495.
- 16.- Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. boletín epidemiológico. semana epidemiológica n° 52 del 25 al 31 de diciembre de 2016.
- 17.- Nataro J. P.; Diarrhegenic *Escherichia coli* Clinical Microbiology Reviews. 1998.
- 18.- Pitcher, D. G., Saunders, N. a., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology, 8(4), 151–156.

- 19.-Oyofa B. A., Thornton S. A., Burr D. H., Trust T. J., O R Pavlovskis, and P Guerry; Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction.
- 20.- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*.
- 21.- Paton, A.W., Paton, J.C., Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J. Clin. Microbiol. 1998.
- 22.- Bisi-Johnson , Chikwelu L Obi, Sandeep D Vasaikar, Kamaldeen A Baba and Toshio Hattori; Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa; 2011
- 23.-S. S. Jang; A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Mycology 1986
24. - GI Barrow, RKA Feltham. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 1987
- 25.- (DOF) Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- 26.- Manual de Procedimientos *Campylobacter* Ministerio de Salud; Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bacteriología Servicio Bacteriología Sanitaria Buenos Aires, Argentina 2001.
- 27.- Aislamiento e identificación de *Salmonella* sp. en fluidos cloacales de tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) obtenidas en el pacífico mexicano.; tesis que para obtener el título de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia; Yeny Rocio Navas Valbuena 2013
- 28.- Estandarización de una PCR anidada para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp. y *Ehrlichia canis* en muestras clínicas de perros; tesis que para obtener el título de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, presenta Salvador Eduardo Acevedo Monroy
- 29.- Ducoing-Watty A. M. Estadística para veterinarios y zootecnistas. 2016 Newton Edic.
- 30.- Jan M. Hunt J. M. , Abeyta C., Tran T., Bacteriological Analytical Manual Chapter 7: *Campylobacter*;  
<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>  
Consultado 05/julio /2018
- 31.- Doležal J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J.; Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry A. 2003
- 32.- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E.; Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group, Appl Environ Microbiol, 2000
- 33.-Centers for Disease Control and Prevention;  
<https://www.cdc.gov/salmonella/oranienburg-10-16/index.html> Consultado 19/ diciembre /2018
- 34.- FSIS-USDA; Risk Assessments of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs and *Salmonella* spp. in Egg Products, 2005
- 35.- SSA, Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información 2018 - Semana Epidemiológica 39
- 36.- SAGARPA-SENASICA <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sive> consultado 19/dicimebre/2018
- 37.- Padron M.; *Salmonella typhimurium* Penetration through the Eggshell of Hatching Eggs; Avian Diseases, 1990

- 38.- Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R.; Bioactive Egg Compounds; Springer Berlin Heidelberg New York, 2007
- 39.- Philips D. C.; The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci Amer* 215:78–90, 1966
- 40.- Williams J.; A comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. *Biochem J* 108:57–67, 1968
- 41.- Thibodeau S. N., Lee D. C. y Palmiter R.D.; Identical precursors for serum transferrin and egg white conalbumin. *J Biol Chem* 253:3771–3774, 1978
- 42.- Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart J. F., Spik G., Fournet B., Montreuil J.; Investigation by 360-MHz <sup>1</sup>H-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy and methylation analysis of the single glycan chain of chicken ovotransferrin. *Eur J Biochem* 100:569–574, 1979
- 43.- Lee D. C., McKnight G. S., Palmiter R. D.; The chicken transferrin gene. Restriction endonuclease analysis of gene sequences in liver and oviduct DNA. *J Biol Chem* 255:1442–1450, 1980
- 44.- Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E.; Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 80:1–35, 1978
- 45.- Miller M. S., Buss E. G., Clagett C. O.; The role of oligosaccharide in transport of egg yolk riboflavin-binding protein to the egg. *Biochem. Biophys Acta* 677:225–233, 1981
- 46.- Green N.M.; Avidin. *Adv Protein Chem* 29:85–133, 1975
- 47.- Roszak D.B., Grimes D.J., Colwell RR.; Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems; *Canadian Journal of Microbiology*, 1984
- 48.- Rappaport F., Konforti N., and Navon B.; A New Enrichment Medium for Certain Salmonellae; *J Clin. Path.* 1956
- 49.- Vassiliadis P., Trichopoulos D., Kalandidi A., Xirouchaki E.; Isolation of *Salmonellae* from Sewage with a New Procedure of Enrichment; *Journal of Applied Bacteriology*, 1978
- 50.- Thomas L.V., Wimpenny J.W.T.; Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature; *Food Microbiology*, 1996
- 51.- Shane S.M., Gifford D.H., Yogasundram K.; *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Vet Res Commun.* 1986
- 52.- Neill S., Campbell J.N. & O'brien J.J; Egg penetration By *Campylobacter Jejuni*, *Avian Pathology* 2008
- 53.- Bronowski C., Mustafa K., Goodhead I., James C. E., Nelson C., Lucaci A.; *Campylobacter jejuni* transcriptome changes during loss of culturability in water, *PLOS ONE*, 2017
- 54.- Fonseca B.B., Beletti M.E., Torres de Melo R.; *Campylobacter jejuni* in commercial eggs, *Braz J Microbiol.* 2014
- 55.- Hernández C. C., *Campylobacter jejuni*: ¿A forgotten bacteria? Its situation in Mexico, *Enf. Inf. Microbiol.*, 2013
- 56.- FDA; Hunt J. M. , Abeyta C. and Tran T.; *Bacteriological Analytical Manual: Chapter 7 Campylobacter*, 2001
- 57.- Croxen M. A., Law R. J., Scholz R., Keeney K. M.; Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Review*, 2013
- 58.- Anjana K., Hu1J. y Torres A. G.; Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*, *Curr Opin Infect Dis.* 2014

- 59.- Ribeiro-Ferreira da Silva Filho L. V., Aguiar Ferreira F., Caldeira Reis F.J., Amorim de Britto M. C.; *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment., J Bras Pneumol, 2013
- 60.- Gellatly S. L. & Hancock R. E.W.; *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses., Pathogens and Disease, 2013
- 61.- Cavalcanti Dantas R., Lorraine Ferreira m., Pinto Gontijo-Filho P. and Marques Ribas R.; *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome., Journal of Medical Microbiology, 2014
- 62.- Cagla Sonmezer M., Ertem, G. Sebnem Erdinc F., Kaya Kilic E., Tulek N., Adiloglu A., and Hatipogl C.; Evaluation of Risk Factors for Antibiotic Resistance in Patients with Nosocomial Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*., Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2015
- 63.- Vitkauskienė A., Skrodenienė E., Dambrauskienė A., Macas A., Sakalauskas R.; *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality, Medicina, 2010
- 64.- Maha A.M. AL-Ashmawy, Khaled H. Abd E., Galil and Shaadi F. Elswaifi; The Microbial Burden of *Pseudomonas* Species in Different Types of Table Eggs in Egypt, World Journal of Dairy & Food Sciences, 2013
- 65.- Hartung T. E. & Stadelman W. J.; *Pseudomonas Fluorescens* Penetration of Egg Shell Membranes as Influenced by Shell Porosity, Age of Egg and Degree of Bacterial Challenge, Poultry Science, 1962
- 66.- Elliot R. P.; Spoilage of Shell Eggs by *Pseudomonads*., Food and Drug Administration 1954
- 67.- Poole K.; *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max., Frontiers in Microbiology, 2011
- 68.- Kung V. L., Ozer E. A. and Hauser A. R.; The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*., American Society for Microbiology, 2010
- 69.- von Wintersdorff C. J. H., Penders J., van Niekerk J., Mills N. D., Majumder S., van Alphen L., Savelkoul P. and Wolffs P.; Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer., Frontiers in Microbiology, 2016
- 70.- Lu Y, Zeng J, Wang L, Lan K, E S, Wang L, Xiao Q, Luo Q, Huang X, Huang B, Chen C. Antibiotics Promote *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* Conjugation through Inhibiting Quorum Sensing., American Society for Microbiology, 2017
- 71.- Amábile-Cuevas C. F.; Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes., J Infect Dev Ctries 2010
- 72.- Schuman J. D., Sheldon B. W., Foegeding P.; Thermal Resistance of *Aeromonas hydrophila* in Liquid Whole Egg., Journal of Food Protection, 1997
- 73.- Abdel Karem H., Mattar Z.; Heat resistance and growth of *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* in whole liquid egg. Acta Microbiol Pol. 2001
- 74.- Olivares Hernández T. Rosario-Cortés C.; Presencia de *Campylobacter* spp. Durante el procesamiento primario del pollo de engorda en un establecimiento tipo inspección federal., Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción de la Salud Animal, presenta Teresa Olivares Hernández, UNAM, 2013

## **Anexo 1. Medios de Cultivo**

### **Medios de cultivo en caja de Petri**

#### **Caldo Luria Bertani (LB)**

Cloruro de Sodio (JT Baker®) 10 g

Peptona de caseína (Difco®/MCDLab®) 10 g

Extracto de levadura (Bioxon®) 5 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar LB**

Al preparar caldo LB agregar 15 g de agar-bacteriológico (Difco®/ MCDLab®) para 1 L.

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar sangre**

Corazón de res, infusión 500 g

Peptona de caseína 10 g

Cloruro sódico 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes en 900 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C. Al enfriarse el medio a 45°C agregar 100 mL de sangre de ovino o bovino o caballo desfibrinada atemperada asepticamente.

#### **Caldo brucella**

Digerido pancreático de caseína 10 g

Digerido péptico de tejido animal 10 g

Extracto de levadura 2 g

Dextrosa anhidra 1 g

Bisulfito de sodio 0.1 g

Cloruro de sodio 5 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada, dispensar en volúmenes requeridos y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar brucella**

Agregar 15 g de agar a 1 litro de caldo brucella, disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar métodos estándar**

Digerido pancreático de caseína 5 g

Extracto de levadura 2.5 g

Dextrosa anhidra 1 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)**

Lactosa 7.5 g

Sacarosa 7.5 g

Extracto de levadura 3 g

Tiosulfato sódico 6.8 g

Citrato férrico de amonio 0.8 g

Xilosa 3.5 g

L-Lisina 5 g

Desoxicolato de sodio 2.5 g

Rojo de fenol 0.08 g

Agar 13.5 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y hervir durante 5 min, no sobre calentar, permitir que se enfríe a 45°C y dispensar

No autoclavar

Usar el mismo día de preparación

### **Agar sulfito bismuto (SB)**

Peptona bacteriológica 10 g

Fosfato Disódico 4 g

Indicador bismuto sulfito 8 g

Sulfato Ferroso 0.30 g

Extracto de Carne 5 g

Verde Brillante 0.025 g

Dextrosa 5 g

Agar Bacteriológico 20 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y hervir durante 5 min, no sobre calentar, permitir que se enfríe a 45°C y dispensar

No autoclavar, usar el mismo día de preparación, proteger de la luz

### **Agar MacConkey (McC)**

Digerido pancreático de gelatina 17 g

Peptona de carne y caseína 3 g

Lactosa 10 g

Rojo neutro 0.03 g

Cristal violeta 0.001g

Sales biliares 1.5 g

Agar 13.5 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar eosina azul de metileno (EAM)**

Digerido pancreático de gelatina 10 g

Lactosa 5 g

Sacarosa 5 g

Fosfato dipotásico 2 g

Agar 13,5 Eosina Y 0.4 g

Azul de metileno 0.065 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar verde brillante (VB)**

Extracto de levadura 3 g

Peptona de caseína 10 g

Lactosa 10 g

Sacarosa 10 g

Cloruro sódico 5 g

Rojo fenol 0.08 g

Agar 20 g

Verde brillante 0.0125 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

#### **Agar campylobacter con vancomicina-colistina-cicloheximida-novobicina- (VCCN)**

Usar base de agar sangre o base de agar brucella, disolver los componentes en 900 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C. Al enfriarse el medio a 45 °C agregar 100 mL de sangre de ovino o bovino o **caballo (Campylobacter spp. Desarrolla mejor con sangre de caballo lisada)** desfibrinada atemperada a 37 °C y agregar 10 mg de vancomicina en solución, 10,000 UI de colistina en solución, 5 mg de novobiocina en solución y 50 mg de cicloheximida en solución.

#### **Solución de vancomicina**

Hidrocloruro de vancomicina (Sigma-Aldrich®) 1 g

H<sub>2</sub>O MiliQ estéril 10 mL disolver por agitación vigorosa

Esterilizar por filtración y alicuotar en volúmenes de 1000 µL (100 mg/mL) almacenar a 20°C y descongelar hasta su uso.

### **Solución de Colistina**

Sulfato de colistina (Sigma-Aldrich®) 500 mg = 7,500,000 UI

H<sub>2</sub>O MiliQ estéril 10 mL disolver por agitación vigorosa

Esterilizar por filtración y alicuotar en volúmenes de 1000 µL (50 mg/mL) almacenar a 20°C y descongelar hasta su uso. -

### **Solución de Cicloheximida**

Cicloheximida (Sigma-Aldrich®) 1 g

Etanol absoluto 10 ml disolver por agitación vigorosa

Esterilizar por filtración y alicuotar en volúmenes de 1000 µL (100 mg/mL) almacenar a 20°C y descongelar hasta su uso (¡¡PRECAUCIÓN!! NO FILTRAR FRENTE A MECHERO, EL ETANOL ES ALTAMENTE FLAMABLE).

### **Solución de Novobiocina**

Novobiocina sódica (Sigma-Aldrich®) 1 g

H<sub>2</sub>O MiliQ estéril 10 mL disolver por agitación vigorosa

Esterilizar por filtración y alicuotar en volúmenes de 1000 µL (100 mg/mL) almacenar a 20°C y descongelar hasta su uso. -

### **Medios de cultivo en tubo**

#### **Caldo tioglicolato**

Extracto de levadura 5 g

Cloruro sódico 2.5 g

Digerido pancreático de caseína 15 g

Tioglicolato sódico 0.5 g

Dextrosa (anhidra) 5 g

Azul de metileno 0.001 g

L-cistina 0.5 g

Agar 0.75 g

Disolver los componentes en 100 mL de agua, hervir hasta que el medio tome un aspecto ópalo y dispensar en volúmenes requeridos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C. el medio se mantiene reducido hasta 3 meses, después deberá hervirse para reducirlo.

#### **Agar triple azúcar hierro (TSI)**

Digerido pancreático de caseína 10 g

Digerido péptico de tejido animal 10 g

Cloruro sódico 5 g

Lactosa 10 g

Sacarosa 10 g

Glucosa 1 g  
Sulfato ferroso de amonio 0.2 g  
Tiosulfato sódico 0.2 g  
Rojo fenol 0.025 g  
Agar 13 g  
Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Medio SIM**

Extracto de carne 3 g  
Hidrolizado pancreático de gelatina 30 g  
Sulfato ferroso amónico 0.2 g  
Tiosulfato sódico 0.025 g  
Agar 3 g  
Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes calentando hasta ebullición y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar citrato de Simmons**

Fosfato de amonio dihidrogenado 1 g  
Fosfato dipotásico 1g  
Cloruro sódico 5 g  
Citrato sódico 2 g  
Sulfato magnésico 0.2 g  
Agar 15 g  
Azul de bromotimol 0.08 g  
Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Agar urea de Christesen**

Hidrolizado pancreático de gelatina 1 g  
Dextrosa 1 g  
Cloruro sódico 5 g  
Fosfato potásico 2 g  
Urea 20 g  
Rojo Fenol 0.012 g  
Agar 15 g

Disolver el agar en 950 mL de agua, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Atemperar el agar a 45°C, los demás componentes disueltos en 50 mL de agua destilada, esterilizar por filtración incorporándolos al agar, dispensar en tubos.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Agar fenilalanina**

DL-Fenilalanina 2 g

Extracto de levadura 3 g

Cloruro sódico 5 g

Fosfato sódico 1g

Agar 12 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Medio basal O/F**

Peptona de Caseína 2 g

NaCl 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g

Agar 2.5 g

Azul de bromotimol 0.03 g

Carbohidrato a probar (Dextrosa) 10 g = 1%

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Caldo lisina**

Clorhidrato de L-lisina 5 g

Extracto de levadura 3 g

Glucosa 1 g

Púrpura de bromocresol 0.015 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Caldo MR-VP**

Mezcla de Peptonas 7 g

Fosfato dipotásico 5 g

Dextrosa 5 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

## **Medio ONPG**

### **Medio base:**

Peptona de caseína 10 g

NaCl 5 g

Agua destilada 1 L

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C. Atemperar medio a 20 °C y agregar solución de ONPG.

### **Solución de ONPG:**

o-nitrophenil-b-galactopyranoside 6 g

Solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0.01 M 1000 ml

Esterilizar por filtración y almacenar en congelación, protegido de la luz.

### **Preparación del medio ONPG**

Solución de ONPG 250 mL

Medio base 750 mL

Dispensar en tubos estériles 3 mL y proteger de la luz.

## **Caldo lauril triptosa**

Bacto triptosa 20 g

Lactosa 5 g

Fosfato potásico dibásico 2.75 g

Fosfato potásico monobásico 2.75 g

Cloruro de sodio 5 g

Lauril sulfato de sodio (SDS) 0.1 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

## **Caldo Rappaport-Vassidialis (RV)**

### **Base de RVS**

Digerido enzimático de soya 5 g

NaCl 8 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g

### **Solución de MgCl<sub>2</sub>**

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 40 g disolver en 100 mL de agua destilada y almacenar en oscuridad, máximo 1 año. No autoclavar.

### **Solución de verde de malaquita**

Disolver 0.4 g de oxalato de verde de malaquita en 100 mL de agua destilada y almacenar en frasco ámbar en oscuridad. No autoclavar.

### **Preparación del medio RV**

Mezclar para 1000 mL de medio base después agregar la solución de MgCl<sub>2</sub> y verde de malaquita, dispensar en tubos un volumen de 10 mL y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Emplear el mismo día o almacenar a 4°C máximo 24 horas.

### **Caldo tetrionato (CT)**

#### **Base de caldo tetrionato**

Extracto de carne 4.3 g

Digerido enzimático de caseína 8.6 g

NaCl 2.6 g

CaCO<sub>3</sub> 38.7 g

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-5H<sub>2</sub>O 47.8 g

Ox sales biliares de uso bacteriológico 4.78 g

Verde brillante 0.0096 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y hervir durante 5 minutos, no sobre calentar, permitir que se enfríe a 45°C y dispensar en volúmenes de 10 mL

No autoclavar.

### **Solución yodo-yoduro**

Yodo elemental 20 g

Yoduro de potasio 25 g

Disolver en 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL

Almacenar en oscuridad en frasco ámbar.

### **Solución de novobiocina**

Novobiocina Na 0.04 g

Disolver en 5 mL de agua inyectable estéril

Esterilizar por filtración y alicuotar en volúmenes de 100 uL almacenar a -20°C y descongelar hasta su uso.

### **Preparación del medio CT**

Agregar asepticamente 5mL de solución de novobiocina a 1000 mL de medio base. Mezclar, después agregar 20mL de la solución de yodo-yoduro. Mezclar bien. Distribuir el medio asepticamente en recipientes estériles. Emplear el medio el mismo día, de lo contrario conservar las soluciones por separado e incorporar hasta su uso.

### **Caldo infusión cerebro y corazón**

Infusión de cerebro y corazón de (sólidos) 8 g

Digerido péptico de tejido animal 5 g

Digerido pancreático de caseína 16 g

Cloruro sódico 5 g

Glucosa 2 g

Fosfato disódico de hidrógeno 2.5 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Caldo Bolton**

Peptona de caseína 10 g

Hidrolizado de lactoalbúmina 5 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 5 g

Hemina 0.01 g

Piruvato de sodio 0.5 g

Ácido  $\alpha$ -cetoglutaratato 1 g

Metabisulfito de sodio 0.5 g

Carbonato de sodio 0.6 g

Disolver en 950 mL de agua destilada y dejar reposar 10 min, calentar suavemente, esterilizar por autoclave 121°C , 15lb, 15 min. Al enfriarse el medio a 45 °C agregar 100 mL de sangre de ovino o bovino o **caballo (*Campylobacter* spp. desarrolla mejor con sangre de caballo lisada)** desfibrinada atemperada a 37 °C y agregar 10 mg de vancomicina en solución, 10,000 UI de colistina en solución, 5 mg de novobiocina en solución y 50 mg de cicloheximida en solución.

### **Caldo tripticaseína de soya con sulfato ferroso**

Tryptone (digerido pancreático de caseína) 17 g

Digerido péptico de harina de soya 3 g

Glucosa (dextrosa) 2.5 g

Cloruro sódico 5 g

Fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g

Sulfato ferroso FeSO<sub>4</sub> 35 mg

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

## **Reactivos para identificación e interpretación de bioquímicas**

### **Reactivo de Kovac (para detección de indol)**

Alcohol isoamílico 150 mL

p-dimetilaminobenzaldehído 10 g

HCl 50 mL

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol isoamílico (amílico o butílico), una vez incorporado se agrega el HCl, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Reactivo de Barrits A (Prueba de Voges-Proskauer)**

1-naftol 5 g

H<sub>2</sub>O 100 mL

Disolver cuidadosamente el 1-naftol en el agua, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Reactivo de Barrits B (Prueba de Voges-Proskauer)**

KOH 40 g

H<sub>2</sub>O 100 mL

Disolver cuidadosamente el KOH en el agua, realizar el procedimiento con cuidado ya que el KOH es altamente corrosivo y al mezclarse con el agua se produce una reacción exotérmica, por lo cual el frasco se calentará, una vez que se haya enfriado, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Rojo de metilo (Prueba de rojo de metilo)**

Rojo de metilo 0.1 g

Etanol 300 mL

Agua destilada 200 mL

Disolver el rojo de metilo en el etanol y agregar el agua, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Prueba de oxidasa**

N, n, n, n-tetrametil-p-fenilendiamina

Impregnar una porción de papel filtro (7 cm de diámetro) con 3 gotas de solución acuosa al 1 % del reactivo, secar a temperatura ambiente (no secar por completo) y congelar -20 °C.

### **Cloruro férrico (prueba de fenilalanina)**

FeCl<sub>3</sub> 10 g

H<sub>2</sub>O destilada 100 mL

Disolver cuidadosamente el FeCl<sub>3</sub> en el agua destilada. Almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Aceite mineral (sellado de bioquímicas)**

Aceite mineral sin esencia

Esterilizar por autoclave 121°C 15 lb 15 min, almacenar a temperatura ambiente.

### **Tinción de Gram**

Colorante primario:

Cristal Violeta 2.5 g

H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml

Almacenar en frasco ámabar.

Sensibilizante:

NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de sodio) 12.5 g

H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml

Almacenar en frasco ámabar.

Mordente:

Iodo 20 g

NaOH solución acuosa al 1 M 100 ml

H<sub>2</sub>O destilada 900 ml

Almacenar en frasco ámabar.

Decolorante:

Alcohol Etílico 95 % 50 ml

Acetona 50 ml

Almacenar en frasco ámabar.

Colorante de contraste:

Fucsina Básica, solución saturada en alcohol de 95% 100 ml

H<sub>2</sub>O destilada 900 ml

Almacenar en frasco ámabar.

### **Reactivo de Gregensen (corroborar tinción de Gram)**

KOH 3 g

H<sub>2</sub>O destilada 100 mL

Disolver cuidadosamente el hidróxido en el agua ya que es corrosivo, almacenar en frasco ámabar en refrigeración.

## **Anexo 2. Soluciones**

### **Solución amortiguada de fosfatos (PBS)**

NaCl (JT Baker®) 8 g

KCl (JT Baker®) 0.2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (JT Baker®) 0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (JT Baker®) 1.15 g

Ajustar pH 7.4, aforar a 1000 mL con agua destilada, esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb.

### **Soluciones para electroforesis**

#### **Solución TRIS-ácido acético-EDTA (TAE) 50X**

Trisaminometano base (Affymetrix USB®) 242 g

Ácido acético glacial (JT Baker®) 57.1 mL

Ácido Etilen Diamino Tetracético - EDTA (JT Baker®) 37.2 g o 50 mL a 0.5 M pH 8.0

Aforar a 1 L de agua destilada. Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Solución de trabajo 1X.

#### **Solución borato de sodio (SB) 25X**

NaOH (JT Baker®) 25 mM disolver en agua destilada y ajustar pH con ácido bórico (JT Baker®) a 8.0-8.5

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Solución de trabajo 1X.

#### **Amortiguador de carga para ADN**

Glicerol o Sacarosa (Sigma-Aldrich®) 30-40 % (w/v)

Xilencianol (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Azul de bromocresol (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Naranja G (Sigma-Aldrich®) 0.50-0.75 % (w/v)

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Solución de trabajo 1 X (Realizar Dilución con solución TAE o SB según sea el caso).

#### **Agarosa con SB 1.5 %**

Agarosa grado biología molecular (Invitrogen®) 1.5 g

Solución SB 1x 100mL

Calentar hasta ebullición y disolución de la agarosa y enfriar hasta 50 °C y vaciar.

#### **Agarosa con TAE 0.8 %**

Agarosa grado biología molecular (Invitrogen®) 1.5 g

Solución TAE 1x 100 mL

Calentar hasta ebullición y disolución de la agarosa y enfriar hasta 50 °C y vaciar.

## **Soluciones para extracción de ADN**

### **Solución de lisis**

1.66 M tiocianato de guanidina (Sigma-aldrich®)

N-Sarcosyl (Sigma-Aldrich®) 0.16%

EDTA Na (JT Baker) pH 8.0 a 0.5M

Disolver todos los reactivos en agua Mili Q y aforar a 150 mL

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb, almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Acetato de amonio 7.4 M**

7.4 M Acetato de amonio (JT Baker®) 100 mL

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Almacenar a -20 °C.

### **Fenol-cloroformo**

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL

Cloroformo (JT Baker®) 25 mL

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración 4°C.

### **Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico**

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL

Cloroformo (JT Baker®) 24 mL

Alcohol isoamílico (JT Baker®) 1 mL

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración 4°C.

### **Etanol 100%**

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®) 100 mL

Almacenar a -20°C.

### **Etanol 70%**

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®) 70 mL

H<sub>2</sub>O libre de nucleasas 30 mL

Almacenar a -20°C.

## **Soluciones y reactivos para la PCR**

### **DNTP's (Invitrogen®/Thermo Scientific Fisher®)**

ATP 100 mM

CTP 100 mM

GTP 100 mM

TTP 100 mM

Agregar 10 µL de cada dinucleótido a 60 µL de agua estéril libre de nucleasas, almacenar a -20 °C.

### **Iniciadores (Invitrogen®/Sigma Aldrich®)**

Iniciador F' (En sentido) 100 µM

Iniciador R' (Antisentido) 100 µM

Diluir por separado 10 µL de cada iniciador en 90 µL de agua libre de ADNasas, almacenar a -20 °C .

### **Polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Thermo Scientific Fisher®)**

*Taq*Pol 5 U/ µL

No diluir, si se requiere diluir emplear dimetilsulfoxido o Polietilenglicol

Almacenar a -20 °C.

### Anexo 3 Antibiogramas de cepas aisladas

Cepa	Ampicilina	Amoxicilina con ácido clavulánico	Cefazolina	Cefalotina	Cefepima	Cefoperzazona
18.- <i>Escherichia coli</i>	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Cepa	Ceftriaxona	Cefacimida	Ciprofloxacina	Ácido nalidixico	Norfloxacina
18.- <i>Escherichia coli</i>	Sensible	Sensible	Sensible	Intermedio	Sensible

Cepa	Trimetoprim/su lfametoxazol	Cloranfenicol
18.- <i>Escherichia coli</i>	Resistente	Sensible

Cepa	Antibiótico					
	Ácido nalidixico	Amoxicilina con ácido clavulánico	Ceftriaxona	Cefuroxima	Cefotaximel	Cefepima
19 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
20 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
22 <i>Klebsiella oxytoca</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
33 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
34 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
40 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
42 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
42 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
39 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Cepa	Antibiótico				
	Cloranfenicol	Ciprofloxacina	Doxiciclina	Eritromicina	Fosfomicina
19 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
20 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente
22 <i>Klebsiella oxytoca</i>	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente
33 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente
34 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
40 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
42 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
42 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
39 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Cepa	Antibiótico				
	Florfenicol	Imipenem	Norfloxacina	Penicilina	Tetraciclina
19 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
20 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
22 <i>Klebsiella oxytoca</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible
33 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente
34 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
40 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
42 <i>Aeromonas hydrophila</i>	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente
42 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
39 <i>Pseudomonas aureginosa</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Antibiogramas realizados a las cepas aisladas a partir de las muestras de huevo empleadas en este estudio, la cepa 18 de *E. coli* fue proporcionada al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Alberto Eslava Campos.