



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LORENA GARCÍA ROMERO

CDMX

AÑO 2023





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: DIAZ RUIZ GLORIA
VOCAL: Profesor: HERNANDEZ PEREZ HUGO ANTONIO
SECRETARIO: Profesor: MARTINEZ CASTAÑEDA FERNANDO
1er. SUPLENTE: Profesor: CAMACHO CRUZ ALEJANDRO
2° SUPLENTE: Profesor: CRUCES MARTINEZ ANA LILIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

SUSTENTANTE (S):

LORENA GARCÍA ROMERO

Agradecimientos

Trabajo realizado con el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE211623 titulado “Aislamiento y caracterización de microorganismos resistentes a antimicrobianos de productos cárnicos y lácteos”

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Química por proporcionarme todos los medios y el conocimiento para desarrollar esta profesión, espero un día regresar todos los recursos que me proporcionaron.

Al Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez por apoyarme a realizar este trabajo, así como todo su conocimiento aportado, dedicación y su amistad. Le agradezco su dedicación en este trabajo.

A mis padres, Irineo y Senorina por su apoyo y amor incondicional para que culminara esta etapa de mi vida, siempre estaré en deuda con ustedes por todo lo que me han dado.

A mis hermanos, Lety y Omar, por ser mis cómplices y mis grandes amigos, les agradezco toda su ayuda y apoyo incondicional para poder cumplir todas mis metas personales y académicas.

A todos mis amigos de la Facultad de Química, ya que con su amistad y compañerismos me ayudaron a crecer como profesionista, así como persona, les agradezco su amor y amistad que me dieron durante la carrera.

Índice

Introducción.....	10
Objetivos.....	13
Metodología	13
Capítulo 1. Microbiología de la carne	17
1.1 Efecto del proceso en la microbiota de la carne.....	19
Tipos de rastros en México	19
Proceso de obtención de la carne.....	20
1.2 Deterioro microbiano de la carne.....	25
pH.....	25
Temperatura	26
Requerimientos de oxígeno	26
1.3 Microorganismos patógenos asociados a la carne.....	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	29
<i>Salmonella spp</i>	30
<i>Listeria monocytogenes</i>	30
<i>Escherichia coli</i>	31
Capítulo 2. Resistencia antimicrobiana	32
2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos	32
Pared bacteriana	32
Membrana bacteriana	34
Síntesis de proteínas.....	35
Síntesis de ácidos nucleicos.....	36
2.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	37
Mutación del receptor o modificación del sitio diana	38
Inactivación del antibiótico	39
Reducción de la permeabilidad.....	39
Activación de bomba de eflujo.....	40
2.3 Transferencia horizontal de resistencia a los antimicrobianos.....	41
Transformación	42
Transducción	42
Conjugación.....	42

Capítulo 3. Métodos para la determinación de resistencia a antimicrobianos...	44
3.1 Métodos fenotípicos.....	44
Difusión en disco.....	44
Prueba MIC (Concentración mínima inhibitoria).....	45
Dilución en agar	46
Microdilución en caldo.....	47
3.2 Métodos moleculares.....	48
PCR.....	48
MALDI-TOF MS	49
Metagenómica.....	52
Capítulo 4. Reglamentación para la resistencia a los antimicrobianos.....	53
4.1 Programas de vigilancia.....	54
FAO.....	54
CDC	55
Situación actual en México.....	55
4.2 Control microbiológico y de calidad en la carne.....	56
Etapas de lavado y desinfección.....	57
Agentes de lavado y desinfección.....	58
Capítulo 5. Protocolo: Aislamiento de bacterias patógenas de transmisión alimentaria resistentes a antimicrobianos a partir de productos cárnicos	61
Objetivos	61
Fundamento de la técnica.....	61
Medios y diluyentes empleados.....	64
Material y equipo	64
Muestra	65
Diagrama general para la etapa de determinación y aislamiento de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas	66
Diagrama general para identificación bacteriana mediante el analizador MALDI-TOF	67
Procedimiento experimental	67
Capítulo 6. Resultados experimentales.....	70
6.1 Resultados experimentales de la muestra de hígado de res	70
6.2 Resultados experimentales de la muestra de vísceras de res.....	71
6.3 Resultados experimentales de la muestra de mollejas de pollo.....	72

Capítulo 7. Discusión de resultados	74
7.1 Discusión de resultados experimentales de muestra de hígado de res ...	75
7.2 Discusión de resultados experimentales de muestra de vísceras de res	78
7.3 Discusión de resultados experimentales de muestra de molleja de pollo	82
7.4 Discusión referente a los antibióticos evaluados	84
Capítulo 8. Conclusiones.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	90

Índice de tablas

Tabla 1. Géneros de bacterias que se encuentran en carne cruda y su asociación con el desarrollo del deterioro.....	18
Tabla 2. Factores que influyen en el crecimiento microbiano de la carne bovina	27
Tabla 3. Microorganismos patógenos asociados con la carne cruda refrigerada y congelada.....	28
Tabla 4. Antibióticos y concentraciones empleadas para la etapa de aislamiento selectivo.....	62
Tabla 5. Ejemplo de etiqueta empleada para muestras	65
Tabla 6. Resultados obtenidos de la muestra de hígado de res	70
Tabla 7. Resultados obtenidos de la muestra de vísceras de res.	72
Tabla 8. Resultados obtenidos de la muestra de molleja de pollo.....	73
Tabla 9. Tabla de contingencia para los resultados experimentales obtenidos de los antibióticos aminoglucósidos.....	86

Índice de figuras

Figura 1. Proceso para la obtención de la carne de bovino con base a los requerimientos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación	21
Figura 2. Desollado hidráulico a rodillo.....	23
Figura 3. Estructura química de la penicilina en donde se resalta la ubicación del anillo β -lactámico.....	33

Figura 4. Mecanismo de acción de los β -lactámicos.....	34
Figura 5. Diferentes modos de acción de los aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos y oxazolidinonas y su sitio de interacción con los ribosomas.	36
Figura 6. Diferentes tipos de quinolonas y sus derivados	37
Figura 7. Esquema general de los mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	38
Figura 8. Estructura general de las principales familias de bombas de eflujo. 41	
Figura 9. Esquema general de los mecanismos horizontales de genes.....	43
Figura 10. Ejemplo de prueba de difusión en disco empleando diferentes antibióticos contra <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 11. Medio de cultivo de la izquierda: Antibiograma por difusión en disco en el que se observa la presencia de halo de inhibición. Medio de cultivo de la derecha es el antibiograma por E-test en donde se muestra el valor MIC.	46
Figura 12. Dilución en agar. La determinación del valor MIC se lleva a cabo encontrando la concentración más baja que no produce crecimiento.	47
Figura 13. Microdilución en caldo en donde se determinó el MIC para <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 14. Esquema general de la identificación bacteriana de microorganismos mediante MALDI-TOF.....	51
Figura 15. Diseminación de la resistencia antimicrobiana	53
Figura 16. Procedimiento general para la determinación y aislamiento de microorganismos resistentes a antimicrobianos.....	66
Figura 17. Procedimiento general para la tipificación de microorganismos resistentes a antimicrobianos mediante el uso del analizador MALDI-TOF Biotyper Bruker Daltonik.....	67
Figura 18. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de hígado de res.	71
Figura 19. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de vísceras de res.	72
Figura 20. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de mollejas de pollo.....	73
Figura 21. Distribución de los microorganismos resistentes a los antibióticos evaluados en las tres muestras analizadas.....	84
Figura 22. Distribución de los microorganismos aislados resistentes a los antibióticos evaluados.....	85

Glosario

ABC	Casetes de unión a ATP (Por sus siglas en inglés The ATP-binding cassette)
AME	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Por sus siglas en inglés Aminoglycoside modifying enzymes)
Aw	Actividad de agua (Por sus siglas en inglés Water Activity)
BPH	Buenas Prácticas de Higiene
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Por sus siglas en inglés Centers for Disease Control and Prevention)
CLSI	El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Por sus siglas en inglés The Clinical and Laboratory Standards Institute)
CODEX	Normas Alimentarias Internacionales (Por sus siglas en inglés Codex Alimentarius, International Food Standards).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Por sus siglas en inglés Deoxyribonucleic acid)
EMB	Agar con Eosina y Azul de Metileno
EPA	Agencia de Protección Ambiental (Por sus siglas en inglés Environmental Protection Agency)
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
EUCAST	El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (Por sus siglas en inglés The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (Por sus siglas en inglés Food and Drug Administration)
HACCP	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (Por sus siglas en inglés Hazard Analysis and Critical Control Points)
IR	Integrone a resistencia
IS	Secuencias de inserción
LB	Agar Luria-Bertani

LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry
MATE	Familia de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (Por sus siglas en inglés Multidrug and toxic compound extruction family)
MCI	Concentración mínima inhibitoria (Por sus siglas en inglés Minimal inhibitory concentration.
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (Por sus siglas en inglés Multidrug resistance)
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal (Por sus siglas en inglés World Organisation for Animal Health)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas de unión a penicilina (Por sus siglas en inglés Penicillin Binding Protein).
PG	Peptidoglicano
RAM	Resistencia a los Antimicrobianos
RNA	Ácido Ribonucleico (Por sus siglas en el inglés Ribonucleic acid)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SMR	Resistencia múltiple a fármaco (Por sus siglas en inglés Small multidrug resistance)
spp.	Especies plurales
TIF	Rastros Tipo Inspección Federal
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Por sus siglas en inglés United States Department of Agriculture)

Introducción

La resistencia antimicrobiana es la capacidad que presentan algunos microorganismos de evadir la presencia de ciertas sustancias que tienen el propósito de eliminarlos. Los antimicrobianos suelen emplearse para combatir infecciones potencialmente mortales. Los antibióticos, que son sustancias antimicrobianas, se utilizan como medicamentos poderosos para la prevención y el tratamiento de infecciones causadas por cierto tipo de bacterias u hongos en personas, animales o cultivos. Los antibióticos se pueden clasificar como aquellos conocidos como de espectro reducido los cuales tienen acción contra ciertos tipos de microorganismos y por otra parte se encuentran los antibióticos de amplio espectro, los cuales pueden actuar sobre una amplia gama de microorganismos.

Aunque los antibióticos son una excelente herramienta contra infecciones, estos contribuyen al desarrollo de la resistencia antimicrobiana y a pesar de que su uso sea apropiado, en la mayoría de los casos, las malas prácticas de tomar antibióticos cuando no son requeridos pueden tener efectos en los organismos (humanos y animales) que consumen dichas sustancias y que en su mayoría se puede presentar efectos secundarios tales como: sufrir reacciones alérgicas o que se presente una toxicidad que afecte la función de los órganos (CDC, 2019).

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que el humano no puede frenar, ya que estos son fenómenos naturales que los microorganismos obtienen, estos mecanismos se han adoptado mediante la obtención de material genético, el cual contiene la información que le confiera esta resistencia (la transferencia vertical es la vía más adecuada, sin embargo se puede obtener mediante transferencia horizontal) o así mismo, pueden ser objeto de modificaciones genéticas por la adición de material genético al genoma (Birk et al., 2020). La resistencia antimicrobiana se genera para la supervivencia de los microorganismos en el medio ambiente con el objetivo de que estos puedan proliferar. Estos microorganismos resistentes a las sustancias antimicrobianas están presentes en los humanos, los animales, los alimentos, el medio ambiente (agua, suelo y aire), etc.

Los microorganismos que presentan resistencia antimicrobiana se pueden diseminar fácilmente en el medio ambiente, en este caso, se pueden propagar entre las personas o entre personas y animales, y esto a partir de alimentos de origen animal (OMS, 2020). Los problemas relacionados con la resistencia de antimicrobianos están asociados con el uso de estos mismos metabolitos en cualquier ámbito, lo que comprende los de uso humanos y no humanos. El uso de agentes antimicrobianos en animales o cultivos destinados a la producción de alimentos constituye un factor potencialmente importante de riesgo de selección y propagación en los seres humanos a través del consumo de alimentos contaminados de dichos microorganismos (Codex Alimentarius, 2011).

En la actualidad el tema de la resistencia hacia los agentes antimicrobianos por microorganismos ha causado una gran alarma a nivel mundial, ya que significa un problema grave en la salud de la población. Dentro del área de los alimentos esto ha generado una gran controversia, ya que en los alimentos que son un medio de crecimiento y proliferación de microorganismos, los cuales pueden llegar a causar problemas en la salud de los consumidores (enfermedades transmitidas por alimentos, ETA). Según la CDC, se estima que todos los años, por lo menos 48 millones de personas se enferman por una ETA, de las cuales pueden llegar a ser hospitalizadas o en su defecto se pueden llegar a ser mortal (CDC, 2018). En la actualidad, han aparecido cepas de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, ya que estos han adquirido nuevos mecanismos de resistencia contra diversos fármacos, por lo que su resistencia limita el tratamiento de infecciones y en consecuencia se ha observado un aumento de la mortalidad.

Dentro de los alimentos que los humanos pueden encontrar e incluir en su alimentación, la carne que es uno de los alimentos esenciales en la dieta y se define como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; la cual proviene de los animales para abasto (Secretaría de Salud, 2004). En México, la carne es uno de los alimentos más consumidos por la población, según el Consejo Mexicano de la Carne, siendo su consumo per cápita durante 2022 de 73.9 kg (Consejo Mexicano de la Carne, 2022). La carne, al ser un alimento con un alto contenido de agua y proteína, contiene otros

componentes que hacen que esta y sus derivados sean un medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos.

Principalmente la microbiota de la carne se ve influenciada por el medio ambiente en el que el animal se encontraba, las condiciones del proceso, así como su manipulación durante el proceso. La calidad microbiológica de la carne se encuentra determinada por una interacción compleja de la microbiota del animal, así como la eficiencia de la higiene durante el proceso de matanza y el faenado. Dentro de la industria de los alimentos, la calidad es uno de los parámetros de los productos que es primordial tener en consideración ya que los consumidores buscan productos que no presenten defectos, los cuales en su mayoría se buscan que no ejerzan un efecto adverso en la salud del consumidor; es decir en este caso se busca que los alimentos sean inocuos (que no presenten un riesgo) como es la presencia de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas.

En el presente proyecto de tesis se llevó a cabo el aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos a partir de productos cárnicos (muestras bovinas y avícolas) con el fin de determinar su presencia además de identificar la importancia que está teniendo la aparición de microorganismos farmacorresistentes ya que esto pone en peligro los avances y todas las investigaciones en el área de la medicina, en los sistemas de salud y, por otra parte, el efecto que genera en el sector económico. La presencia de microorganismos resistentes a antimicrobianos servirá como herramienta para la prevención de infecciones, retrasar el desarrollo de la resistencia antimicrobiana a través de un mejor empleo de los antibióticos en aquellos animales destinados para el consumo humano y el poder detener la propagación de la resistencia cuando se desarrolle.

Objetivos

- El objetivo general de este presente proyecto es llevar a cabo el aislamiento de microorganismos que presenten resistencia antimicrobiana a partir de diferentes productos cárnicos (productos bovinos y avícolas) obtenidos de rastros municipales mediante un protocolo específico.
- Dentro de los objetivos particulares de este proyecto está llevar a cabo la elaboración de un protocolo específico para el aislamiento e identificación de bacterias resistentes siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana correspondiente (NOM-210-SSA1-2014) así como estándares internacionales (CLSI).
- La disponibilidad de un protocolo específico para el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos en muestras de carne servirá como herramienta para llevar a cabo una identificación óptima de dichos microorganismos además de que contribuirá a una mayor comprensión de los posibles efectos negativos que se presentan en los diferentes sectores tanto sociales como económicos.

Metodología

Para este proyecto se llevó a cabo una revisión bibliográfica de temas relacionados con la resistencia antimicrobiana además de la información esencial para el aislamiento de bacterias resistentes a sustancias antimicrobianas a partir de muestras cárnicas. Dentro de la investigación de este proyecto algo importante a resaltar es investigar la microbiota presente en la carne, además, de como esta se ve influenciada con respecto al proceso de la obtención de la canal (cuerpo del animal desollado, a menudo, pero no siempre, después de desangrar y faenar) (Fernandes, 2009). El proceso de obtención de la carne no queda exento de contaminarse con algún microorganismo patógeno, los cuales conllevan a que los consumidores presenten una ETA. En segundo lugar, dentro de la investigación se hizo una revisión de los mecanismos que

presentan las bacterias, los cuales les permiten resistir aquellos agentes antimicrobianos que puede afectar su viabilidad en una matriz, en este caso la carne.

Se revisaron artículos, libros y protocolos relacionados con los métodos para determinar la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos como son los métodos convencionales, los cuales se basan principalmente en las características fenotípicas en donde se determina la susceptibilidad a un agente antimicrobiano y métodos moleculares, donde el desarrollo de nuevas tecnologías y la innovación en la detección de microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos se lleva a cabo de una manera más fácil y eficiente. Estos métodos son una gran herramienta ya que además de realizar la detección de la resistencia también podemos obtener información tal como el análisis de las secuencias del genoma relacionadas con la resistencia a antimicrobianos y así mismo generar nuevas generaciones de fármacos que puedan inhibir el crecimiento de estos microorganismos. Finalmente se llevó a cabo la búsqueda de organismos nacionales como internacionales destinados para la regulación de este problema.

Con respecto a la parte experimental de este proyecto se llevó a cabo en primer lugar, la selección de las muestras cárnicas provenientes de animales para consumo humano, principalmente de productos bovinos y avícolas. El muestreo se realizó en un rastro municipal, ya que en este tipo de establecimiento se encuentra la muestra con la menor manipulación si se compara con su obtención en centros de distribución como lo son las carnicerías o en supermercados. Por otra parte, es importante mencionar que los antibióticos que se emplearon para este proyecto fueron proporcionados por el asesor debido a su disponibilidad y difícil acceso de manera comercial (costos elevados y ausencia de prescripción médica para su compra).

Dentro del protocolo se establecieron diferentes etapas, en las cuales se propuso llevar a cabo una etapa de pre-enriquecimiento de las muestras cárnicas bovinas y avícola, en donde se muestreó una cantidad específica (25 g), se incubaron en matraces con el medio nutritivo (caldo lactosado) a condiciones específicas de

tiempo y temperatura (37°C durante 1 hora). Acto seguido, se tomaron alícuotas del medio nutritivo y se inocularon por extensión superficial en los medios selectivos con los antibióticos a evaluar, para obtener el aislamiento de los microorganismos. En este caso se emplearon medios de cultivo selectivo como lo son agar ENDO y agar EMB, ambos suplementados con antibiótico y medio de cultivo general como es el caso del agar Luria-Bertani (LB) suplementado con antibiótico.

La suplementación del antibiótico a los medios de cultivo se llevó a cabo antes de realizar el vertido del medio en las cajas de Petri. Se esperaba a que la temperatura del medio disminuyera después de la esterilización con el fin de que el antibiótico no se degradara por la temperatura. Se agregaba la cantidad de stock de cada antibiótico necesario para que en las cajas de Petri se obtuviera la concentración final que se requería, se agitaba y finalmente se vertía para obtener así los medios que se emplearían en las etapas posteriores.

Al llevar a cabo el aislamiento selectivo se realizaron tinciones de Gram para determinar la pureza de las colonias, al observar que en este punto las colonias obtenidas no se encontraban puras se optó por llevar a cabo una resiembra de aquellas colonias que mostraron características morfológicas diferentes, ya sea por el color, tamaño, y/o cambios físicos en el medio de cultivo (cambio de color por el indicador presente en los medios EMB y Endo).

Al obtener las colonias puras, se llevaron a cabo las tinciones de Gram para confirmar la pureza del cultivo. Finalmente, en esta etapa de aislamiento se llevó a cabo la resiembra en agar LB más el antibiótico correspondiente con el propósito de llevar a cabo su respectiva identificación microbiana. Mediante el uso del equipo analizador MALDI-TOF Biotyper (por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry), se llevó a cabo la identificación bacteriana. Para esta parte del protocolo se elaboró en colaboración con el Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química (el equipo analizador se encuentra dentro del Cepario, ubicado en el laboratorio 1-C del edificio A de la Facultad de Química, y que fue realizado bajo la supervisión del profesor responsable, QFB. Alejandro Camacho Cruz). El proceso de su análisis hasta la identificación se llevó a cabo de manera

automática. El empleo de este analizador fue de suma importancia ya que acortó el tiempo de la identificación bacteriana si este se compara con la elaboración de pruebas bioquímicas y generar un perfil bioquímico para cada microorganismo que se pudo aislar.

Capítulo 1. Microbiología de la carne

La carne es aquella estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas (Secretaría de Salud, 2004).

La canal, que es el cuerpo del animal después de haber sido insensibilizado, sacrificado, sangrado, y desprovisto de cerdas, plumas y vísceras (Secretaría de Salud, 2004), generalmente es un tejido estéril en el cual presenta una carga microbiana nula o baja, sin embargo la microbiota que puede presentar la carne está en función principalmente del propio animal, en donde la fuente principal de los microorganismos se encuentra en las superficies externas como es la piel, vello, pies y pezuñas y por otra parte se encuentran los microorganismos del tracto gastrointestinal y respiratorio (siempre y cuando exista un contacto entre la canal y las partes ya mencionadas del animal) y por otro lado, está el contacto directo o indirecto con la canal ya sea por una contaminación por parte del personal o bien de los instrumentos que se requieren durante el proceso.

Aunque la mayoría de los microorganismos que nos rodean son inofensivos, hay algunos que pueden causar deterioro, enfermedades y hasta la muerte. El alto contenido de agua y proteínas de la carne y otros componentes solubles en agua hacen que la carne y sus productos sean un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos (Fernandes, 2009).

En la tabla 1 que a continuación se presenta se observa que la microbiota de la carne es una mezcla heterogénea que se obtiene de la microbiota presente en el animal vivo así como la higiene del proceso de matanza y faenado (Kraft, 1986). En la siguiente tabla se muestran los géneros microbianos que se han encontrado con más frecuencia en las carnes y aves crudas.

Tabla 1. Géneros de bacterias que se encuentran en carne cruda y su asociación con el desarrollo del deterioro (Fernandes, 2009).

Género	Frecuentemente implicado	Requerimiento de Oxígeno¹	Potencial de deterioro¹
Gram-positivo		Aerobio	
<i>Bacillus</i>	No	Facultativo	Alto
<i>Brochothrix</i>	Si	Anaerobio	Alto
<i>Clostridium</i>	Si		
Corynebacteria	No		
(1) <i>Corynebacterium</i>	No	Aerobio	
(2) <i>Kurthia</i>	No		
(3) <i>Microbacterium</i>	No		
Bacteria ácido-láctica			
(1) <i>Carnobacterium</i>	Si		
(2) <i>Enterococcus</i>	Si		
(3) <i>Lactobacillus</i>	Si		
(4) <i>Lactococcus</i>	Si		
(5) <i>Leuconostoc</i>	Si	Aerotolerante	Bajo
(6) <i>Pediococcus</i>	Si		
(7) <i>Vagococcus</i>	Si		
<i>Listeria</i>	No	Facultativo	
<i>Micrococcus</i>	No	Aerobio	
<i>Staphylococcus</i>	No	Facultativo	
Gram-negativo			
Grupo Acinetobacter	Si		
(1) <i>Acinetobacter</i>	Si		
(2) <i>Moraxella</i>	Si	Aerobio	Bajo
(3) <i>Psychrobacter</i>	Si		
<i>Aeromonas</i>	Si	Facultativo	Bajo
<i>Alcaligenes</i>	Si	Aerobio	Bajo
<i>Campylobacter</i>	No	Microaerofilo	
Enterobacteriaceae	Si		
(1) <i>Citrobacter</i>	No		
(2) <i>Enterobacter</i>	Si	Facultativo	Alto
(3) <i>Escherichia</i>	No		
(4) <i>Hafnia</i>	Si		
(5) <i>Pantoea</i>	Si		
(6) <i>Serratia</i>	Si		
<i>Flavobacterium</i>	No	Aerobio	
<i>Proteus</i>	No	Facultativo	
Pseudomonas	Si	Aerobio	Alto
<i>Salmonella</i>	No	Facultativo	
Shewanella	Si	Facultativo	Alto
<i>Yersenia</i>	No	Facultativo	

¹ Para algunos géneros de microorganismos presentes en la tabla no se presenta información con respecto a los requerimientos de oxígeno y potencial de deterioro.

La mayoría de las bacterias presentes son microorganismo mesófilos (aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 °C y 37 °C) (Secretaría de Salud , 2015), por lo que estos microorganismos al no poder crecer en temperaturas de refrigeración no tendrán un efecto en el deterioro de la carne, sin embargo existe una parte de la población microbiana que será psicrófilos, por lo que serán capaz de proliferar a dicha temperatura y por lo tanto estos se asocian al deterioro microbiano de la carne. Por otra parte, también existe la presencia de levaduras y hongos. A pesar de la diversidad de microorganismos en la carne, se puede observar que en la microbiota inicial predominan bacterias Gram positivas, no obstante, la carga microbiana aumenta con el proceso posterior que se le da a la carne debido a la contaminación asociada a la manipulación. Sin embargo, se puede encontrar microorganismos patógenos, en donde la carga microbiana es generalmente baja.

1.1 Efecto del proceso en la microbiota de la carne

El proceso de la obtención de la carne es una serie de operaciones unitarias, las cuales juegan un papel importante para determinar la calidad microbiológica de esta. Por eso, para poder determinar los cambios que presenta la microbiota de la carne, así como la presencia de ciertos microorganismos en esta que pueden representar un factor de deterioro, así como un riesgo para su consumo, es necesario conocer más a fondo el impacto que presenta el proceso, así como aquellas operaciones unitarias que puedan conllevar a presentar un punto crítico en el proceso.

Tipos de rastros en México

Según la NOM-194-SSA1-2001, los rastros es el nombre que recibe todo aquel establecimiento dedicado a la matanza y faenado de animales para abasto. En México existen dos tipos de rastros: los primeros se denominan rastros TIF (Tipo Inspección Federal) y los municipales. En el caso de los rastros TIF, son aquellas instalaciones dedicadas a la matanza de los animales, proceso de envasado,

empacado, refrigeración o industrializado y que están sujetos a regulación por parte de la SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) y principalmente los productos que provienen de los rastros TIF son productos de calidad e inocuidad a nivel nacional e internacional, ya que cumplen con lo establecido por las normas y parámetros de ambos niveles.

Con respecto a los rastros municipales, que constituyen a un servicio público (propiedad del municipio), es el establecimiento en donde se presta las instalaciones, equipos y herramientas para proporcionar a la población carne que reúna las condiciones higiénicas y sanitarias necesarias para su consumo humano. Los rastros municipales se encuentran regulados por parte de la Secretaría de Salud y en estos establecimientos se lleva a cabo la matanza, el manejo de las canales, así como su comercialización directa-(Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016).

Proceso de obtención de la carne

Con respecto al proceso de obtención de la carne, en la figura 1 que a continuación se presenta, se pueden observar las operaciones unitarias que se llevan a cabo en los rastros y a continuación se procederá a analizar el efecto que presenta cada operación unitaria en la microbiota de la carne.



Figura 1. Proceso para la obtención de la carne de bovino con base a los requerimientos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2017).

Dentro del proceso de la obtención de la carne no existe alguna operación unitaria que disminuya o elimine por completo a los microorganismos, sin embargo, existen muchos puntos dentro del proceso en los que se puede minimizar la introducción, propagación y proliferación de la contaminación microbiana. En México existen normas oficiales las cuales tienen como objetivo garantizar productos óptimos en relación con la calidad higiénico-sanitaria. En primer lugar, la NOM-009-ZOO-1994, establece todas las inspecciones que se tienen que llevar a cabo desde que el animal de abasto (todo aquel destinado al sacrificio como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves, equinos o cualquier otra especie destinada al consumo humano) llega al rastro hasta el transporte y movilización de las canales.

Cuando llegan los animales a los rastros es importante llevar a cabo una inspección ante mortem en cada animal. En esta etapa se observará si no presenta posibles claudicaciones, lesiones en la piel o cualquier otra anormalidad. Así mismo, es de suma importancia que los animales no presenten alguna enfermedad. Después de esta etapa, se prosigue a llevar a cabo un baño ante mortem, en donde se removerá toda la presencia de contaminantes macroscópicos de la piel del animal, como es tierra, heces fecales y otros sólidos que puedan estar presentes. La limpieza del animal antes de su matanza reduce significativamente la contaminación de la canal, ya que la principal fuente de contaminación de la canal es el contacto directo o indirecto con la piel.

La insensibilización del animal tiene como objetivo evitar el dolor, estrés y la incomodidad de la matanza de los animales. Esta etapa se puede llevar a cabo de diferentes maneras ya sea mecánico, eléctrico o por gaseado. En el caso de la insensibilización mecánica consiste en golpear con una pistola en la cabeza lo que conlleva a dejar inconsciente al animal y este método principalmente se utiliza en reces. La insensibilización eléctrica consiste en un choque eléctrico en el cuello, en el caso del ganado porcino mueren por paro cardíaco en esta etapa y en el ganado avícola se toman las aves de las patas y se electrocutan. Finalmente, para el caso de la insensibilización por gaseado se emplea dióxido de carbono en donde los animales mueren por asfixia, sin embargo, este método no es tan recurrente debido a que suele ser caro.

El degollado y desangrado del animal presenta un riesgo de contaminación microbiológica, ya que si no se lleva a cabo la limpieza adecuada de los instrumentos de matanza, como son las sierras, cuchillos y otros equipos puede existir una contaminación cruzada, ya que las bacterias pueden introducirse en tejidos profundos mediante instrumentos contaminados y esto ocurre cuando no existe una limpieza periódica de los instrumentos entre cada animal degollado. Cuando se lleva a cabo esta etapa del proceso con las buenas prácticas de manufactura, el degollado y desangrado no debería de contribuir significativamente a la contaminación de la canal (Fernandes, 2009).

El desollado del animal, que es la operación unitaria en la que se remueve la piel de la canal, puede existir el contacto directo entre las dos partes dando como resultado la transferencia de los microorganismos presentes en el pelo del animal

a la canal. La contaminación de la canal tiene una mayor incidencia cuando el desollado se realiza manualmente. Hoy en día, en algunos rastros en donde su proceso se encuentra automatizado el proceso de desollado lo llevan a cabo mediante máquinas especiales como son extractores mecánicos de pieles, como se muestra en la figura 2, las cuales son removidos sin que exista un contacto de la canal con la piel, por lo que este mecanismo reduce significativamente la contaminación de la canal.



Figura 2. Desollado hidráulico a rodillo. Imagen recuperada de: (BANSS , s.f.).

Dentro del proceso de la obtención de la carne la evisceración juega un papel importante en la contaminación microbiana de la carne ya que en esta etapa se lleva a cabo la extracción de las vísceras contenidas en las cavidades torácica, abdominal, craneal y bucal. Principalmente todos estos órganos contienen una alta carga microbiana, lo que representa un peligro con respecto a la contaminación con patógenos entéricos, por lo que es importante llevar a cabo la remoción sin ninguna perforación de las vísceras. Con base en la NOM-009-ZOO-1994, la evisceración debe efectuarse en un lapso menor a 30 minutos, a partir de la muerte del animal.

Finalmente, cuando se obtiene la canal, se lleva a cabo un lavado de esta, en donde la mayoría de los casos se emplea agua potable a temperatura ambiente, con el objetivo de eliminar la contaminación visible de este, como son restos de

sangre, polvo de huesos, etc. Al mejorar la estética de la canal también tendrá un posible impacto positivo en la microbiota. El lavado de la canal redistribuye la contaminación microbiana en la dirección del flujo de agua, sin embargo, la reducción microbiana no es lo suficientemente grande para extender significativamente la vida de anaquel de las canales refrigeradas, por lo que es recomendable realizar una descontaminación de la canal, en la cual, si se lleva a cabo la eliminación microbiana, extiende la vida de anaquel y resuelve problemas de seguridad microbiológica (Fernandes, 2009).

Principalmente el método físico más empleado para la descontaminación microbiana es el lavado a presión con agua fría, en donde la presión con la que el agua es expulsada hace que reduzca la contaminación microbiológica, sin embargo, pueden existir problemas en la canal, ya que si se emplean presiones elevadas puede generar daños físicos en la superficie de la carne. Por otra parte, la temperatura del agua es importante. Si se aumenta la temperatura, el potencial de reducción de la microbiota será mayor, no obstante, el empleo de altas temperaturas causa cambios irreversibles en el color de la carne, por lo que el método físico a comparación de otros métodos como son los térmicos puede traer problemas al producto, siendo principalmente sensoriales (Fernandes, 2009).

Los métodos químicos por otra parte son métodos de descontaminación más utilizados ya que estos son más fáciles de realizar. Existe una diversa gama de productos químicos como son los ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, cloro, peróxido de hidrógeno, trifosfatos, mezclas de nisina con EDTA, etc., las cuales por su eficacia y practicidad son muy empleadas ya que son sustancias que inhiben en gran medida el crecimiento microbiano en las canales. Dentro de la industria cárnica los ácidos orgánicos, como son el ácido acético y el ácido láctico, son los más empleados; estos se rocían a una temperatura de 55°C ya que a esta temperatura son más efectivos. Sin embargo, también cuentan con sus limitaciones, ya que estas sustancias pueden tener un efecto en las características sensoriales de la carne como es en el sabor y olor que está presente (Albert et al., 2021).

1.2 Deterioro microbiano de la carne

La carne es una excelente fuente de nutrientes, en donde se encuentran todos los aminoácidos, vitaminas y minerales, además de que la actividad de agua proporciona un excelente medio de cultivo para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos. Sin embargo, pueden existir diversos factores que pueden influir en el crecimiento microbiano. En primer lugar, el contenido de agua y la actividad de agua en la carne juegan un papel importante. La carne fresca presenta un A_w de 0.98, el cual se encuentra por arriba de los requisitos mínimos para el crecimiento de las bacterias (A_w mínimo de 0.88). Por lo tanto, la mayoría de los productos cárnicos frescos presentan un A_w que permite la proliferación de bacterias. Caso contrario de esto, serían productos cárnicos tales como los jamones curados, secos y la cecina, los cuales presentan un A_w bajo, lo que previene el crecimiento microbiano en la mayoría de estos productos (Lonergan et al., 2019).

pH

El pH es un factor importante que influye en el crecimiento microbiano en la carne. El rango de crecimiento para la mayoría de las bacterias se encuentra dentro de un rango de 5.0 – 8.0. En la carne fresca, el pH se encuentra en función de la cantidad de glucógeno presente en el animal durante la matanza. El pH cae con frecuencia en el rango de 5,7 a 6,0, pero en algunas ocasiones puede caer en un rango más amplio como de 5,3 a 7,2. Se ha demostrado que la carne con un pH de 6,0 tiene una menor vida de anaquel que la carne con pH ácido (como de 5,3), ya que las bacterias exhiben un retraso y tiempo de generación más prolongado a pH bajo. Por lo tanto, la disminución del pH en la carne es deseable, ya que retrasa el deterioro microbiano. Dentro de la industria cárnica es común que se adicione sobre la canal disoluciones ácidas como ácido acético, láctico y cítrico (Kraft, 1986).

Temperatura

Dentro de la microbiota de la carne se encuentran presente microorganismos capaces de crecer en temperaturas de refrigeración y se clasifican como psicrófilos. Estas bacterias pueden crecer por debajo de los 20°C y comúnmente son los microorganismos que probablemente se encuentran creciendo en la carne refrigerada (Lonergan et al., 2019).

Cuando la carne fresca se mantiene a temperaturas de refrigeración (~ 0-10 ° C) en condiciones aeróbicas, los microorganismos psicrófilos pueden crecer a tales temperaturas en una o dos semanas, aunque sus temperaturas óptimas están más cerca de la temperatura ambiente (15-20°C). La microbiota que se desarrolla frecuentemente incluye principalmente los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes* y *Enterobacteriaceae*, en menor grado bacterias Gram positivas como lo son *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, entre otros microorganismos. Los microorganismos de descomposición predominantes en la carne fresca refrigerada son *Pseudomonas* spp. (Kraft, 1986).

Requerimientos de oxígeno

Después de la matanza del animal las concentraciones de oxígeno disminuirán de la circulación sanguínea, por lo que en la parte más profunda del tejido sólo podrán proliferar aquellas bacterias anaeróbicas o facultativas. La mayoría de las bacterias anaerobias no son psicrófilas, por lo que no podrán desarrollarse fácilmente en las etapas de refrigeración. Por otra parte, en la superficie de la carne, la cual está expuesta al aire se encontrarán microorganismos aerobios (Kraft, 1986).

Dentro del mercado, el consumidor desea una carne roja y para esto debe de estar en condiciones aerobias sin embargo, esto puede causar el crecimiento de aquellos microorganismos aerobios por lo que se recomienda envasar la carne al vacío o emplear el uso de empaques de atmósferas modificadas, en donde se disminuye la concentración de oxígeno y se aumenta la concentración de dióxido de carbono y de esta forma se puede tener una carne roja y además contribuir a reducir el crecimiento microbiano, retardar la descomposición de la carne y en

consecuencia extender la vida de anaquel. A continuación, en la tabla 2 se resumen y presentan todos los factores que pueden alterar el crecimiento microbiano en la carne.

Tabla 2. Factores que influyen en el crecimiento microbiano de la carne bovina (Lonergan et al., 2019).

Factor	Clase de microorganismos	Requerimientos para su crecimiento
pH	Acidófilos	Crecen de manera óptima a un pH < 5.5, No pueden crecer a pH neutro y por encima de este.
	Neutrófilos	Crecen de manera óptima a un valor de pH en el intervalo neutro pH >5.5 y < 7.9.
	Alcalófilos	Crecen de manera óptima a un pH alcalino de ≥ 8 .
Temperatura	Psicrófilos	Temperatura óptima de crecimiento de 15°C o menos, una temperatura máxima por debajo de 20°C y una temperatura mínima de 0°C o menos.
	Mesófilo	Temperaturas de crecimiento óptimas en un intervalo de 45°C a 80°C.
	Termófilo	Temperatura optima de crecimiento por arriba de los 45°C. También hay microorganismos que presentan una temperatura óptima por arriba de los 80°C y se les denomina hipertermófilos
Oxígeno	Aerobios	Requiere tensiones normales de oxígeno para crecer, mínimo un 20% de oxígeno.
	Facultativos	En condiciones adecuadas de nutrientes y cultivo pueden crecer en ausencia de oxígeno, pero crecen mejor con este.
	Microaerófilos	Es necesario el oxígeno, pero a concentraciones menor que la atmosférica, aproximadamente un 6 %.
	Anaerobios	No necesitan el oxígeno para crecer. Hay algunos microorganismos que lo pueden tolerar y crecen en su presencia, aunque no lo respiren (anaerobios aerotolerantes) y hay otros microorganismos que la presencia de oxígeno resulta ser dañina o letal (anaerobios estrictos).

1.3 Microorganismos patógenos asociados a la carne

Los microorganismos patógenos, los cuales son definidos por la NOM-210-SSA1-2014 como aquellos microorganismos capaces de producir una enfermedad, se encuentran en diversas matrices, en donde la carne no es la excepción. Principalmente los patógenos pueden causar una ETA, se asocia al consumo de alimentos contaminados, generando un cuadro clínico el cual va desde náuseas, vómito, diarrea y en casos extremos puede llegar a causar la muerte de los consumidores (CDC, 2018). La contaminación por microorganismos patógenos tiene un efecto negativo en la economía, ya que se pierden cantidades grandes de dinero al desperdiciar alimentos contaminados, por lo que es de suma importancia elaborar alimentos inocuos.

En la tabla 3 se muestran los microorganismos asociados a las ETA's por carne, en donde dichos microorganismos son en su mayoría bacterias mesófilas y a continuación se dará una breve explicación de algunos microorganismos patógenos presentes en esta matriz alimentaria.

Tabla 3. Microorganismos patógenos asociados con la carne cruda refrigerada y congelada (Fernandes, 2009).

Microorganismo	Requerimiento de Oxígeno	Requerimiento de temperatura	Cuadro clínico que genera
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Facultativo	Psicrófilo	Infección
<i>Bacillus cereus</i>	Facultativo	Mesófilo	Intoxicación
<i>Campylobacter spp.</i>	Microaerófilo	Mesófilo	Infección
<i>Clostridium botulinum</i>	Anaerobio	Mesófilo	Intoxicación
<i>Clostridium perfringens</i>	Anaerobio	Mesófilo	Intoxicación
<i>Escherichia coli</i>	Facultativo	Mesófilo	Infección
<i>Listeria monocytogenes</i>	Facultativo	Psicrófilo	Infección
<i>Salmonella spp.</i>	Facultativo	Mesófilo	Infección
<i>Staphylococcus aureus</i>	Facultativo	Mesófilo	Intoxicación
<i>Yersenia enterocolitica</i>	Facultativo	Psicrófilo	Infección

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum es una bacteria Gram positiva anaerobia y que además es un patógeno que se transmite por alimentos contaminados, se encuentra en el suelo, el agua y en los alimentos. En los alimentos se puede desarrollar en aquellos productos en los que se llevó a cabo el enlatado de manera incorrecta. Es capaz de producir en los consumidores el botulismo, la cual es la intoxicación resultante por el consumo de alimentos contaminados en donde *C. botulinum* haya crecido y producido su toxina. La intoxicación está en función de la cantidad de toxina ingerida, la aparición de los síntomas empieza a presentarse en un periodo de 18 a 36 horas después de su consumo produciendo una parálisis flácida simétrica descendente generando una visión borrosa y/o doble, pupilas fijas y dilatadas, disfonía (dificultad para tragar), disfagia (dificultad para hablar) y sequedad en la boca. El botulismo puede llegar a ser mortal, por lo que el diagnóstico de botulismo debe realizarse de manera rápida, mediante exámenes en donde se debe de detectar la presencia de la toxina en el suero y/o heces del paciente (Austin, 2014).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva presente en la carne de gran importancia, ya que esta se encuentra en la piel, las manos y las fosas nasales de los animales de abasto. Se transmite al estornudar, toser y el contacto directo de la piel con los alimentos (como puede ser el contacto que puede existir en el desollado de la canal), en donde los alimentos como la carne, son medios óptimos para su crecimiento. *S. aureus* es un microorganismo anaerobio facultativo que produce una toxina resistente al calor y puede crecer a un Aw bajo (0,87). Los síntomas de la ingestión de la toxina de *S. aureus* son náuseas, vómitos y diarrea pocas horas después de la ingestión de la toxina. Los tratamientos térmicos, así como el enfriamiento adecuado de los alimentos evitarán la intoxicación por estafilococos (Lonergan et al., 2019).

Salmonella spp.

Salmonella spp. es un bacilo Gram negativo y considerado uno de los patógenos con mayor incidencia en la carne cruda. Habita en el tracto intestinal en una amplia gama de animales, incluidas todas las especies animales para consumo humano. La incidencia de que la carne se encuentre contaminada por *Salmonella* está en función de varios factores tales como es la especie, la edad, las prácticas de criado, la higiene que se lleva en el proceso de matanza y la manipulación posterior de la carne (Fernandes, 2009).

Principalmente los brotes por *Salmonella* se asocian por el consumo de carne poco cocida o carne que se contaminó después del proceso de cocción. Los síntomas incluyen dolor de cabeza, diarrea, fiebre, vómitos, escalofríos y malestar abdominal dentro de las 12 a 72 h, y pueden durar hasta 4 a 7 días. Por lo general, el tiempo estimado de recuperación es de cinco a siete días. Es una infección muy común en los Estados Unidos y afecta a más de un millón de personas cada año con alrededor de 550 muertes por salmonelosis aguda. Los alimentos crudos de origen animal como la carne de res, las aves, la leche y los huevos son vehículos comunes (Lonergan et al., 2019).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo, se encuentra en el tracto intestinal y en el contenido fecal de los seres humanos y en el medio ambiente, presenta un amplio rango de temperatura de crecimiento (1–45° C) y de pH (5.0–9.6). La contaminación de productos alimenticios por *L. monocytogenes*, ha tenido como consecuencia el retiro de muchos productos alimentarios y así mismo de productos cárnicos procesados listos para el consumo.

Cuando se consume *L. monocytogenes*, las personas son susceptibles a contraen una infección llamada listeriosis, en donde los síntomas son similares a los de una gripe: fiebre, dolores musculares, náuseas, dolor de cabeza, malestar estomacal y vómitos. El tiempo de aparición puede ser de 3 días a semanas. Las infecciones graves por listeriosis provocan más muertes que las de *Salmonella* o *Escherichia coli*, y dos de los cuatro brotes de enfermedades

transmitidas por alimentos más mortales en los Estados Unidos fueron atribuidas a *L. monocytogenes*. La población susceptible son principalmente los jóvenes, las embarazadas, las víctimas de cáncer, los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos (Lonergan et al., 2019).

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa y un patógeno de gran impacto, ya que es una de las bacterias más comunes que se encuentra en el tracto intestinal de los humanos y animales. Existen cientos de cepas de esta bacteria, donde la mayoría son consideradas como inofensivas; sin embargo, existen algunas cepas muy dañinas, de las cuales *E. coli* O157: H7 es quizás la más conocida, en donde principalmente se asocia con una colitis hemorrágica que produce diarrea con sangre, náuseas y dolor abdominal intenso y en casos extremos puede ocasionar la muerte. Los síntomas ocurren fácilmente y la transmisión se puede llevar a cabo por carne contaminada poco cocida, productos crudos o por malas prácticas de higiene.

Hoy en día, *E. coli* ha pasado de su función tradicional en la microbiología de los alimentos y el agua como un indicador inofensivo de contaminación fecal, a estar asociado como un microorganismo causante de enfermedades. Actualmente se reconocen cinco tipos de cepas de *E. coli* patógenas: *E. coli* enteropatogénica (EPEC) la cual está asociada principalmente a la diarrea infantil, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) asociada con "diarrea del viajero", *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la cual incluye como subgrupo las cepas de *E. coli* verocitotoxigénicas (VTEC) y la *E. coli* de enteroadherente agregante (EA-AgEC) (Fernandes, 2009).

Capítulo 2. Resistencia antimicrobiana

Dentro del entorno en el que un microorganismo se puede desarrollar puede existir la presencia de alguna sustancia antimicrobiana, la cual en alguno de los casos afecta la viabilidad de la población microbiana. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a una sustancia antimicrobiana, cuando esta es eficaz frente a ella y podemos esperar la erradicación de la infección; por el contrario, es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección.

2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos

Las sustancias antimicrobianas presentan diferentes mecanismos de acción en contra de los microorganismos, entre los cuales, los blancos de ataque son regiones de la célula. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son:

Pared bacteriana

La pared celular bacteriana está compuesta de peptidoglicano (PG), la cual es una matriz polimérica reticulada covalentemente hecha de β -(1-4)-N-acetil hexosamina unida a péptidos. La resistencia mecánica de esta capa de pared celular es muy importante para la supervivencia de las bacterias en condiciones ambientales adversas como podría ser cambios en la presión osmótica (Madigan et al., 2015). Las sustancias antimicrobianas que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis lo que provoca la lisis bacteriana.

Los glucopéptidos y los β -lactámicos son tipos específicos de antibióticos que interfieren con los pasos críticos en la homeostasis de la biosíntesis de la pared celular. Estos tipos de antibióticos presentan una similitud entre ellos al contener un anillo de 3 carbonos y 1 nitrógeno, el cual es muy reactivo (ver figura 3) (Upmanyu & Malviya, 2020).

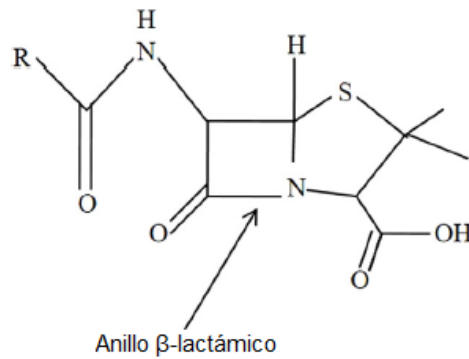


Figura 3. Estructura química de la penicilina en donde se resalta la ubicación del anillo β -lactámico (Upmanyu & Malviya, 2020).

Estas sustancias al estar presentes alrededor del microorganismo hacen que se inhiba la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que inhiben la función de la proteína esencial requerida para esta función y, por lo tanto, matan o inhiben el crecimiento de bacterias. Los miembros importantes de la familia de los β -lactámicos incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenémicos. Los β -lactámicos inhiben la reacción de formación de enlaces peptídicos que es catalizada por transpeptidasas y, por lo tanto, bloquean la reticulación de las unidades de PG. Las moléculas de dicho fármaco son análogas del dipéptido terminal D-alanil-D-alanina del PG. Imitan el sustrato para las transpeptidasas durante la etapa de reticulación e inactivan la enzima formando un enlace no hidrolizable con ella. Es por lo que estas enzimas se llaman también PBP (penicillin binding protein “proteína ligada a la penicilina”) (ver figura 4). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Para que actúen los β -lactámicos, es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular (Suárez & Gudíol, 2009).

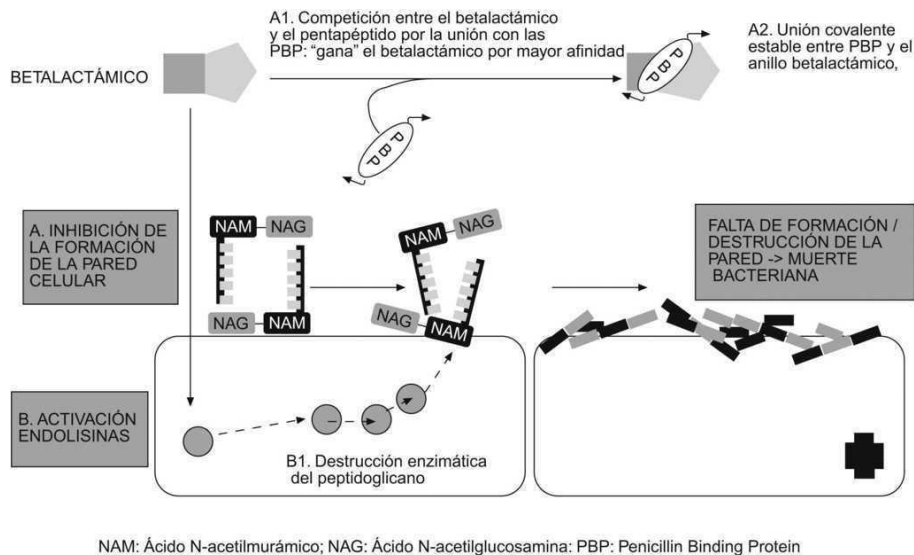


Figura 4. Mecanismo de acción de los β -lactámicos (Suárez & Gudiol, 2009).

Membrana bacteriana

La membrana citoplásmica es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros iones que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Las polimixinas, son antibióticos polipeptídicos, cíclicos y poli catiónicos, con una cadena de ácido graso unido al péptido y se comportan como detergentes catiónicos. Posee una parte hidrofílica (el péptido) con alta carga positiva que por atracción electrostática se une a la superficie de la membrana, cuya carga neta es negativa. Por otro lado, el extremo lipofílico (la cadena lateral de ácido graso) por interacciones hidrofóbicas se une a los fosfolípidos de la membrana. Como resultado se desorganiza la estructura de la membrana y aumenta su permeabilidad, con la pérdida de metabolitos esenciales. La mayor presencia de fosfolípidos en la membrana de las bacterias Gram negativas hace que éstas sean más sensibles que las Gram positivas a la acción de estos agentes (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Síntesis de proteínas

La síntesis protéica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos.

El mecanismo de acción de estas sustancias ocurre en diferentes etapas de la síntesis protéica (ver figura 5) como por ejemplo en la fase de inicio de la síntesis actúan las oxazolidinonas (inhiben la síntesis protéica e impiden la formación del complejo de iniciación 70S) y los aminoglucósidos (tienen su acción principalmente en la subunidad 30S), donde se unen a diferentes proteínas S y al RNA 16S. Bloquean la actividad normal del complejo de iniciación, impiden el inicio de la síntesis, y por lo tanto una lectura errónea del RNAm. Como resultado se obtienen proteínas anómalas que se unirán a la membrana, deteriorando su integridad y acelerando la difusión de más moléculas de aminoglucósido y en consecuencia, una gran cantidad de aminoglucósidos alcanza los ribosomas, que llegan a bloquearse, y se detienen irreversiblemente la síntesis de proteínas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

En el caso de los macrólidos su acción se considera como bacteriostática. Ejercen su efecto al interactuar con el sitio P en la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano evitando que la peptidiltransferasa agregue nuevos péptidos durante la traducción y, por lo tanto, inhibe el proceso de alargamiento de proteínas (Upmanyu & Malviya, 2020). En el caso de la tetraciclina, se difunde pasivamente por la membrana a través de los canales de porina y se unen de forma reversible a la subunidad ribosómica 30S, inhibiendo así la síntesis de proteínas al bloquear la unión del RNAt al complejo RNAm-ribosoma. En la figura 5 se puede observar el mecanismo de acción que ejercen algunos antibióticos al interactuar con los ribosomas.

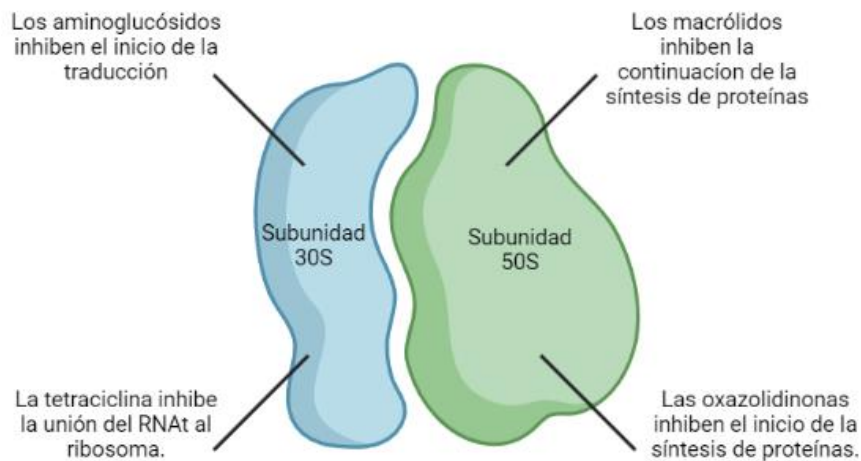


Figura 5. Diferentes modos de acción de los aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos y oxazolidinonas y su sitio de interacción con los ribosomas.

Síntesis de ácidos nucleicos

La replicación y la transcripción del DNA se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del DNA molde, que constituyen las dianas para la acción de diversos antibióticos.

Las quinolonas como se presentan dos tipos de ejemplos de este antibiótico en la figura 6, constituyen en la actualidad, junto a los β -lactámicos, los antibióticos de mayor uso, en donde las quinolonas ejercen su acción bloqueando las topoisomerasas II (DNA-girasa) y IV. Las topoisomerasas se acoplan al DNA, provocan un pequeño corte en las hebras de DNA que posteriormente es reparado, y quedan de nuevo libres. Las fluoroquinolonas, se unen al DNA roto y a la topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-DNA-topoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúe (Upmanyu & Malviya, 2020).

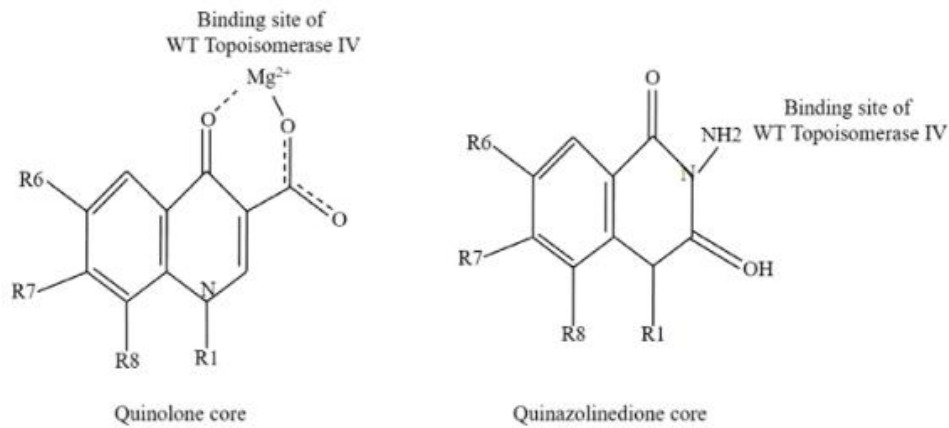


Figura 6. Diferentes tipos de quinolonas y sus derivados (Upmanyu & Malviya, 2020).

2.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Las sustancias antimicrobianas, como los antibióticos, son empleados para el tratamiento de enfermedades, tanto en los humanos como en aquellos animales destinados al consumo. El alimento para animales a menudo contiene antibióticos en cantidades que van desde niveles inferiores a los terapéuticos hasta niveles totalmente por encima de estos límites, y los antibióticos utilizados provienen en su mayoría de las clases de antimicrobianos utilizados en humanos.

Alimentar a los animales con antibióticos puede resultar en el desarrollo de organismos resistentes a los antimicrobianos, y que esos organismos resistentes pueden transferirse a los humanos que consumen dichos animales. La transmisión de la resistencia a los antimicrobianos de los animales a los humanos puede ocurrir de varias maneras, siendo la vía oral directa la más común (incluye comer carne más la ingestión de heces en alimentos o agua contaminados). Otra ruta común es el contacto directo con los animales por parte de los humanos (Reygaert, 2018).

La resistencia antimicrobiana que presentan los microorganismos se puede llevar a cabo mediante los diferentes mecanismos de resistencia los cuales son: modificación del sitio diana del fármaco, inactivación del antibiótico, reducción de

la permeabilidad y activación de bombas de eflujo. En la figura 7 que a continuación se presenta se puede apreciar de manera esquematizada los mecanismos de resistencia antimicrobiana que se pueden presentar en los microorganismos.

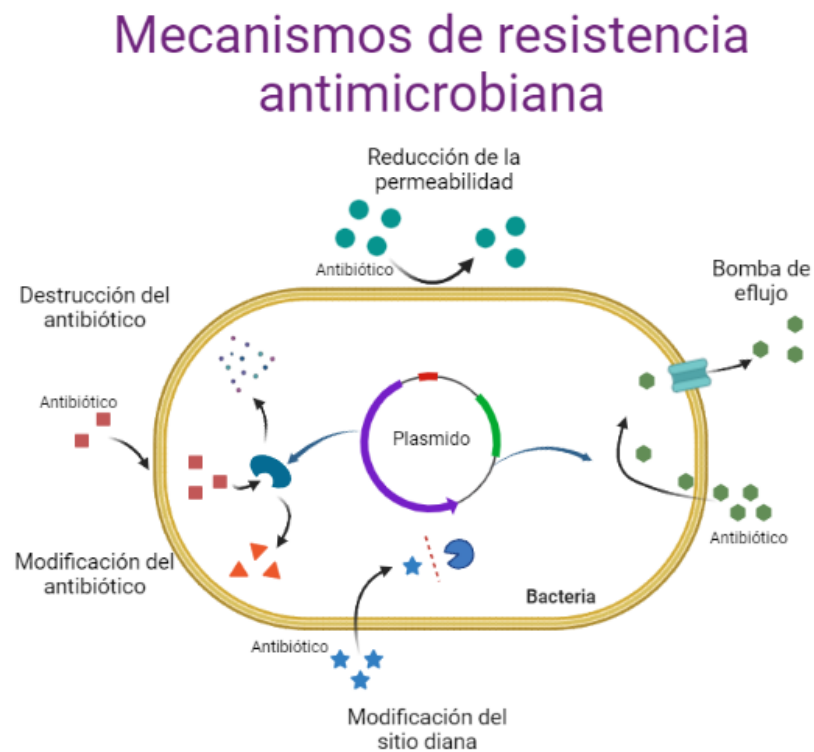


Figura 7. Esquema general de los mecanismos de resistencia antimicrobiana

Mutación del receptor o modificación del sitio diana

En este mecanismo existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. En primer lugar, se dan modificaciones a nivel genético en donde los genes encargados de codificar el receptor blanco de las sustancias antimicrobianas sufren un cambio estructural y en consecuencia hace que la afinidad de la sustancia antimicrobiana a su receptor disminuya. Un ejemplo de este mecanismo es la alteración que sufren las PBP de *Streptococcus pneumoniae*. Al existir una modificación en el material genético que codifica para las PBP se genera un cambio estructural a nivel proteína lo cual hace que la afinidad del antimicrobiano disminuya y por lo tanto el crecimiento microbiano no se verá afectado (Upmanyu & Malviya, 2020).

Inactivación del antibiótico

Las bacterias inactivan los antibióticos mediante uno de estos dos mecanismos: alteración química de este o destruyendo el antibiótico.

- Modificación química del antibiótico

La inactivación de antibióticos es un proceso basado en enzimas en el que la molécula de antibiótico activa se vuelve inactiva por enzimas producidas por las células bacterianas resistentes. Las estrategias para desactivar las moléculas de antibióticos incluyen la hidrólisis, la transferencia de grupos y el proceso redox (Pulingam et al., 2022). La transferencia de grupos fosforilo, acetilo y adenilo al compuesto es el método más eficaz de inactivación de fármacos por transferencia de grupos químicos.

La acetilación es el mecanismo más empleado, considerándose ambos para su uso aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas y fluoroquinolonas. Se considera que los aminoglucósidos se dirigen a través de la adenilación y la fosforilación. La participación de enzimas modificadoras de aminoglucósidos altera covalentemente los grupos hidroxilo o amino de la molécula de aminoglucósido y la vuelve inactiva (Uddin et al., 2021).

- Destrucción del antibiótico

Los antimicrobianos β -lactámicos, como es el caso de la penicilina y las cefalosporinas, son los agentes antimicrobianos empleados con más frecuencia. Así pues, las β -lactamasas hidrolizan la formación de anillos β -lactámico, inhibiendo así su unión a las PBP (Uddin et al., 2021).

Reducción de la permeabilidad

Como la mayoría de los antibióticos en la práctica clínica tienen dianas intracelulares, las bacterias han evolucionado para limitar la penetración de los antibióticos a través de la disminución de la permeabilidad de la membrana

celular (Reygaert, 2018). En este caso, las bacterias llevan a cabo el cierre de sus poros, por lo que el antibiótico no puede entrar y ejercer su acción. Principalmente son cambios en el diámetro y/o número de porinas que pueden bloquear el ingreso de las sustancias antimicrobianas a la bacteria.

Activación de bomba de eflujo

Algunas bacterias son capaces de rechazar los antibióticos por aspiración fuera de la célula. Hay microorganismos que transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin que este sufra alguna modificación ya que existen bombas de eflujo, las cuales son proteínas de transporte que se encuentran en la membrana de la pared celular bacteriana que transportan nutrientes y expulsan compuestos tóxicos del entorno celular, las cuales son empleadas para la expulsión del antibiótico (Pulingam et al., 2022). Las bombas de eflujo vienen en una variedad de formas en la mayoría de las bacterias. La familia de casetes de unión a ATP (ABC), la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR), la familia de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE), la familia de división de células de nodulación de resistencia (RND) y la superfamilia de facilitadores grandes (MFS) son las cinco principales familias de bombas de eflujo, las cuales se categorizan considerando su estructura y suministro de energía. En el caso de la figura 8 se muestra esquematizado las principales familias de bombas de eflujo que pueden presentar los microorganismos.

El caso de la resistencia a la tetraciclina es un ejemplo de resistencia mediada por eflujo, en el que las bombas de eflujo Tet (de la familia MFS) utilizan el intercambio de protones como fuente de energía para extruir tetraciclinas. Varias bombas de eflujo MDR, como MexAB-OprM en *P. aeruginosa* y AcrAB-TolC en enterobacterias (de la familia RND) pueden extruir tetraciclinas como parte de su contribución a la resistencia a diversos fármacos (Uddin et al., 2021).

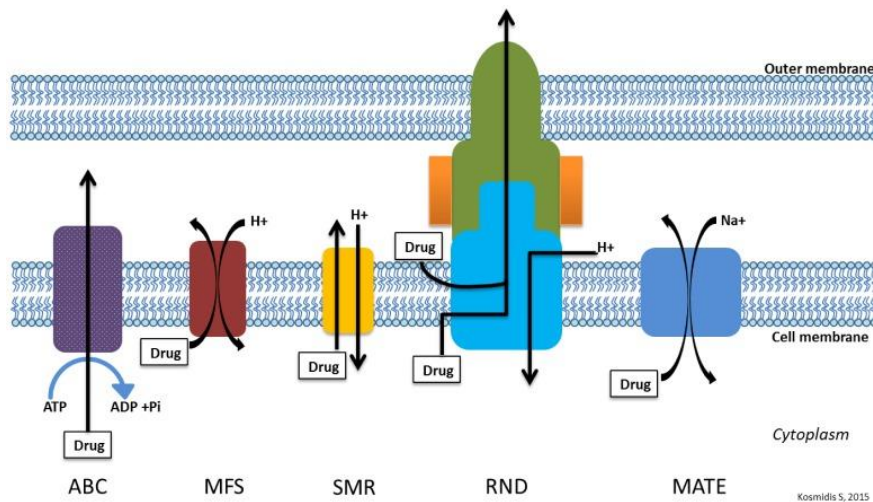


Figura 8. Estructura general de las principales familias de bombas de eflujo (Reygaert, 2018).

2.3 Transferencia horizontal de resistencia a los antimicrobianos

La transferencia horizontal de genes se define como el traspaso de información genética entre bacterias, el cual es un proceso diferente a la replicación (transferencia vertical). En este tipo de transferencia del material genético, se permite una mayor variabilidad genética y evolución bacteriana, generando la capacidad de adaptarse a los cambios del medio ambiente. Las bacterias utilizan diversas vías para transferir información genética: la conjugación, transducción y transformación son los mecanismos por los cuales esto se lleva a cabo (ver figura 9). Dichos mecanismos son los mayores determinantes en la evolución bacteriana, diseminando así diversos genes como son los de virulencia (Madigan et al., 2015).

La resistencia antimicrobiana en los microorganismos es una selección que se da por las mutaciones en los genes codificados del cromosoma microbiano. Estos procesos proporcionan al microorganismo un nuevo material genético que codifica la resistencia a los antimicrobianos. En este punto, es importante que la presencia de sustancias antimicrobianas en el medio en el que se encuentran los microorganismos hace que influya en la resistencia, ejerciendo una presión selectiva hacia la aparición de resistencia antimicrobiana, induciendo la transferencia de determinantes de resistencia entre los microorganismos (Holmes et al., 2016).

Transformación

La transformación es un proceso de transferencia genética por el cual se incorpora DNA libre en una célula receptora y se produce un cambio genético. Algunos procariontes son transformables de forma natural, y entre ellos se encuentran algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dado que en los procariotas el DNA está presente en la célula en forma de una sola molécula larga, cuando la célula se lisa poco a poco el DNA sale. Debido a su gran longitud los cromosomas bacterianos se rompen con facilidad y una célula individual incorpora solo uno o unos pocos fragmentos de DNA, de modo que una pequeña proporción de los genes de la célula se puede transferir a otra mediante un acto individual de transformación (Madigan et al., 2015).

En la figura 9 se puede observar la manera en la que se lleva a cabo este proceso en donde se da la captación del material genético proveniente de una célula bacteriana muerta es incorporado por una célula bacteriana viva y estos se integran a dicha bacteria generando así a una célula transformada.

Transducción

La transducción es el mecanismo de transferencia horizontal de una bacteria a otra mediante el empleo de un virus que infecta a las bacterias (bacteriófago). Este bacteriófago puede integrarse en el genoma bacteriano y al transferir a otra célula puede llevar parte del genoma de esta bacteria y así transferir genes, entre ellos los genes que aportan la resistencia antimicrobiana (Madigan et al., 2015). En la figura 9 se esquematiza la manera en que se lleva a cabo dicho mecanismo.

Conjugación

La conjugación es aquel mecanismo de transferencia horizontal genética en donde se requiere el contacto entre células. Dicho mecanismo está codificado por un plásmido que puede mediar la transferencia de DNA entre células no relacionadas, incluso entre géneros diferentes. Este proceso implica una bacteria

donadora, la cual contiene el plásmido conjugativo, y una célula receptora que no lo contiene (ver figura 9).

La conjugación es el mecanismo más común para la transmisión horizontal de genes de resistencia a los antimicrobianos. Por tanto, la transferencia horizontal mediada por plásmidos puede desempeñar un papel importante en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos entre los reservorios bacterianos animales y humanos. Dentro de la literatura se encontró que en un estudio demostró a partir de una electrotransformación que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentes en la carne de cerdo, particularmente *Serratia* spp., pudo recibir plásmidos de una cepa donante de *E. coli* tanto a 10 como a 37 ° C (Birk et al., 2020). Esto sugiere que las bacterias autóctonas de la carne pueden servir como vector intermedio para la exposición humana a genes de resistencia a los antimicrobianos que se originan en los animales de granja y en dicho estudio no se excluye que otras bacterias cárnicas puedan ser receptores potenciales de genes móviles de resistencia a los antimicrobianos.

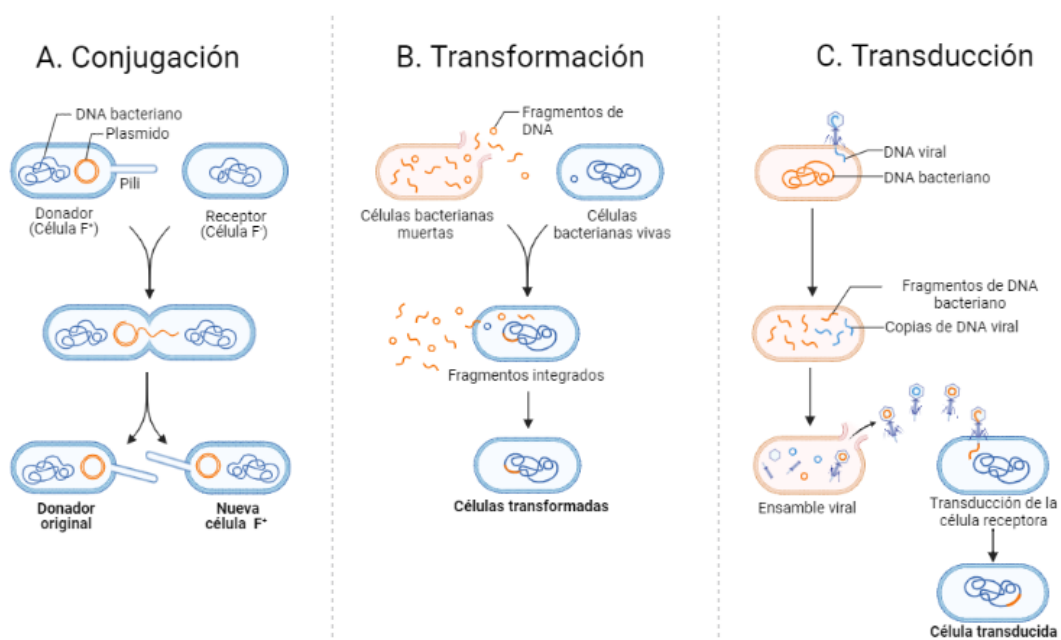


Figura 9. Esquema general de los mecanismos horizontales de genes.

Capítulo 3. Métodos para la determinación de resistencia a antimicrobianos

Para hacer frente a la resistencia a las sustancias antimicrobianas, se debe evitar el uso indebido y no controlado de estas sustancias, por lo que es importante llevar a cabo una investigación previa para poder establecer un plan que sea eficaz contra aquellos microorganismos que presenten SMR, por lo que determinar la resistencia antimicrobiana es una tarea de suma importancia. En este capítulo se desarrollará los diferentes tipos de métodos que existen en la actualidad para determinar la resistencia antimicrobiana en los microorganismos, así como la manera adecuada en la que se debe de llevar a cabo.

3.1 Métodos fenotípicos

Difusión en disco

El método de difusión por disco se encuentra entre unos de los métodos de prueba de susceptibilidad más flexibles en términos de agentes antimicrobianos que se pueden probar. Este método consiste en colocar discos de papel saturados con agentes antimicrobianos sobre un extendido de bacterias sembrado en la superficie de un medio de agar, se incuba la placa durante un tiempo aproximado de 16 a 24 horas y finalmente se mide la presencia o ausencia de una zona de inhibición alrededor de los discos como se muestra en la figura 10. Es importante mencionar que los estudios llevados a cabo en la Universidad de Washington a mediados de la década de 1960 dieron como resultado la técnica conocida como el "método Kirby-Bauer", que fue publicado por Bauer y sus colegas en 1966 (Tenover, 2019).

Para llevar a cabo este método en primer lugar se debe aislar las colonias que han sido identificadas como potencial patógeno y posteriormente emplear los discos de antibiótico deseados para realizar esta prueba de susceptibilidad.



Figura 10. Ejemplo de prueba de difusión en disco empleando diferentes antibióticos contra *Staphylococcus aureus* (Tenover, 2019).

Prueba MIC (Concentración mínima inhibitoria)

Este método proporciona un resultado cuantitativo (generalmente en $\mu\text{g/mL}$) junto con una interpretación categórica (susceptible, intermedia o resistente). La prueba de MIC se puede realizar mediante uno de varios métodos que incluyen dilución en agar, microdilución en caldo, dilución en gradiente de agar, o por uno de varios métodos automatizados o semiautomatizados (Tenover, 2019).

Para esta prueba se tiene que considerar que no siempre un valor de MIC más bajo indica mayor actividad de este antimicrobiano, ya que las MIC que definen la sensibilidad o resistencia son diferentes para cada especie bacteriana y cada antimicrobiano. Como se mencionó, entre los métodos fenotípicos como son las técnicas de dilución determinan la MIC utilizando un medio líquido (dilución en caldo) o un medio sólido (dilución en agar) para disolver las diferentes concentraciones del antimicrobiano (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2008).

En el caso de la técnica de difusión se emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico, las cuales se aplican en la superficie de un medio de agar sólido previamente inoculado con una suspensión bacteriana (en figura 11 se puede observar un ejemplo de esta técnica). Tras un período de incubación de 18 h, el diámetro del halo formado está en relación con

el grado de sensibilidad del microorganismo. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de MIC: halos pequeños se relacionan con valores altos de MIC (resistentes) y halos grandes con MIC bajas (sensibles).

Otra técnica de difusión es el E-test, que además permite la determinación directa del valor de la MIC. Este método emplea tiras de plástico impregnadas con una sustancia antimicrobiana en concentraciones decrecientes. Al contacto de la tira con el agar, el antibiótico difunde e impide el crecimiento del microorganismo. Después de la incubación se observa una zona de inhibición en forma de elipse: el valor de la MIC es el punto de intersección de la elipse con la tira y está indicado en la escala impresa sobre la superficie de la tira (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2008). En el caso de la figura 11 se observa un ejemplo de dicha técnica en donde se puede observar el eclipse de inhibición que genera el antibiótico evaluado.



Figura 11. Medio de cultivo de la izquierda: Antibiógrama por difusión en disco en el que se observa la presencia de halo de inhibición. Medio de cultivo de la derecha es el antibiógrama por E-test en donde se muestra el valor MIC (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2008).

Dilución en agar

El método de dilución en agar implica la preparación de una serie de placas de agar que contienen el agente antimicrobiano para ser probado en concentraciones crecientes, generalmente en diluciones duplicadas (1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, etc.) así como se ejemplifica en la figura 12. Se prepara una

suspensión del microorganismo que se va a analizar para igualar la turbidez de un estándar de 0,5 de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), y se coloca de 1 a 5 μ L de esta suspensión en cada una de las series de placas con un aumento de concentraciones del agente antimicrobiano utilizando un dispositivo replicador. Se pueden analizar treinta aislados bacterianos diferentes (más control de calidad) simultáneamente en cada placa de agar (Tenover, 2019).

Este método suele ser rentable para los laboratorios que analizan un gran número de aislamientos bacterianos frente a un conjunto limitados de agentes microbianos.



Figura 12. Dilución en agar. La determinación del valor MIC se lleva a cabo encontrando la concentración más baja que no produce crecimiento.

Microdilución en caldo

La microdilución en caldo es uno de los métodos estándar más utilizado en la mayoría de los laboratorios de referencia. Se prepara una suspensión del microorganismo que se va a analizar en solución salina o caldo Müeller-Hinton hasta la turbidez de un estándar de 0,5 McFarland (1×10^8 UFC mL⁻¹). La suspensión se diluye 1:20 en solución salina, y de 1 a 5 μ L de esta suspensión se transfiere a todos los pocillos con excepción de uno la bandeja, la cual contiene 96 pocillos que posee diluciones dobles de los agentes antimicrobianos que se van a analizar (generalmente entre 8 y 12 agentes antimicrobianos por bandeja) utilizando un inoculador de plástico desechable (el pocillo restante es

un caldo de control de esterilidad). El tamaño final del inóculo es 5×10^5 UFC mL⁻¹ o 5×10^4 UFC / pocillo (Tenover, 2019). En el caso de la figura 13 se observa la bandeja que contiene los 96 pocillos, en donde la primera posición (1A se encuentra el control previamente mencionado y además conforme se desplazan los pocillos hacia abajo va en aumento la concentración del antibiótico a evaluar.

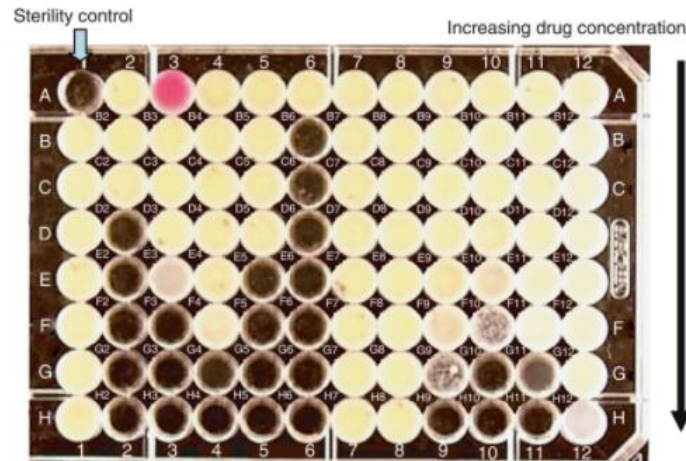


Figura 13. Microdilución en caldo en donde se determinó el MIC para *Staphylococcus aureus* (Tenover, 2019).

3.2 Métodos moleculares

Con el paso de los últimos años, se han desarrollado avances en las nuevas tecnologías aplicadas en las ciencias. En el caso de la ciencia y en el campo de la biología, bioquímica, microbiología y genética se han desarrollado una serie de ensayos como son los moleculares, que utilizan métodos de amplificación de ácidos nucleicos, sondas lineales y otras técnicas que pueden ser aplicadas con diferentes fines, como por ejemplo la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos y mutaciones asociadas con fenotipos de resistencia.

PCR

Las pruebas moleculares más utilizadas para realizar dichas determinaciones son los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para detectar el gen de resistencia a algún antibiótico como por ejemplo el gen de resistencia contra la meticilina *mecA*. Es importante destacar que una ventaja

que presentan los métodos moleculares es la rapidez con la que se obtienen los resultados, a menudo estos se obtienen en menos de dos horas y si se comparan con los métodos convencionales y automáticos, es un periodo de tiempo muy corto (Tenover, 2019).

Hoy en día existen diversos tipos de PCR, los cuales presentan una mayor ventaja sobre la PCR tradicional, la cual lleva a cabo tres etapas (extracción de material genético, amplificación y detección de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa) y presenta un periodo de 12 horas para obtener los resultados. La aparición de la PCR en tiempo real acorta los tiempos además de que paralelamente a la amplificación tiene lugar la detección de los amplicones sintetizados (March-Rosselló, 2017). En la actualidad se han comercializado varios tipos de PCR en tiempo real que permiten obtener la identificación bacteriana además de los genes que confieren a la resistencia antimicrobiana.

Por otro lado, existen otras versiones de PCR, como es la técnica de PCR Multiplex, la cual es una técnica rentable y se emplea un esfuerzo mínimo. Se utiliza para amplificar numerosos fragmentos de DNA simultáneamente y puede emplearse para la detección de grandes mutaciones genéticas. El uso de la PCR Multiplex para la detección de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas es muy eficaz, ya que se lleva a cabo una identificación más rápida de genes que confieren la resistencia antimicrobiana (Rehman et al., 2019).

MALDI-TOF MS

El MALDI-TOF MS (por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry), es considerado hoy en día como una de las mejores opciones para la identificación microbiana en los laboratorios de microbiología. Dentro de sus funciones se encuentran la identificación bacteriana, así como de hongos filamentosos y levaduriformes, esto mediante su análisis en las proteínas ribosomales, en donde las proteínas ribosomales 16s son consideradas el estándar de oro.

Este espectrómetro de masas se compone de tres unidades funcionales: una fuente ionizante para transferir iones a las moléculas de la muestra en forma gaseosa, un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un dispositivo de detección para monitorizar los iones separados. El método que se emplea para la identificación se basa en emplear células de microorganismos puros, proveniente de un medio de cultivo sólido. Dichas bacterias se depositan en una placa metálica conductora y en el caso de bacterias Gram positivas, cuya lisis es más difícil se requiere un tratamiento previo adicional con un ácido orgánico fuerte o lisis mecánica. Después, se debe agregar una solución de ácido acrílico 2-ciano-3-(4-hidroxifenil), denominada matriz. La muestra se debe dejar secar a temperatura ambiente, generando que la muestra del microorganismo y la matriz se cristalice.

Posterior a la cristalización, la placa metálica se introduce en el espectrómetro de masas y esta es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser. La interacción entre los fotones de las moléculas del láser y de la matriz, desencadena una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación. Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas, el cual se encarga de generar la información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), el cual se le puede considerar como la huella digital del microorganismo. Después de que se generó el perfil del microorganismo este es comparado automáticamente mediante un programa con una base de datos de espectros que es construida a partir de cepas de referencia, permitiendo así la identificación del microorganismo (Maldonado et al., 2018).

En la figura 14 se esquematiza el proceso de identificación microbiana a través del implemento del equipo MALDI-TOF, el cual parte desde la recolección de la muestra, la aplicación en la placa, el tratamiento previo que se le realiza a la muestra y el proceso que se lleva a cabo en el interior del equipo, hasta la emisión de los resultados.

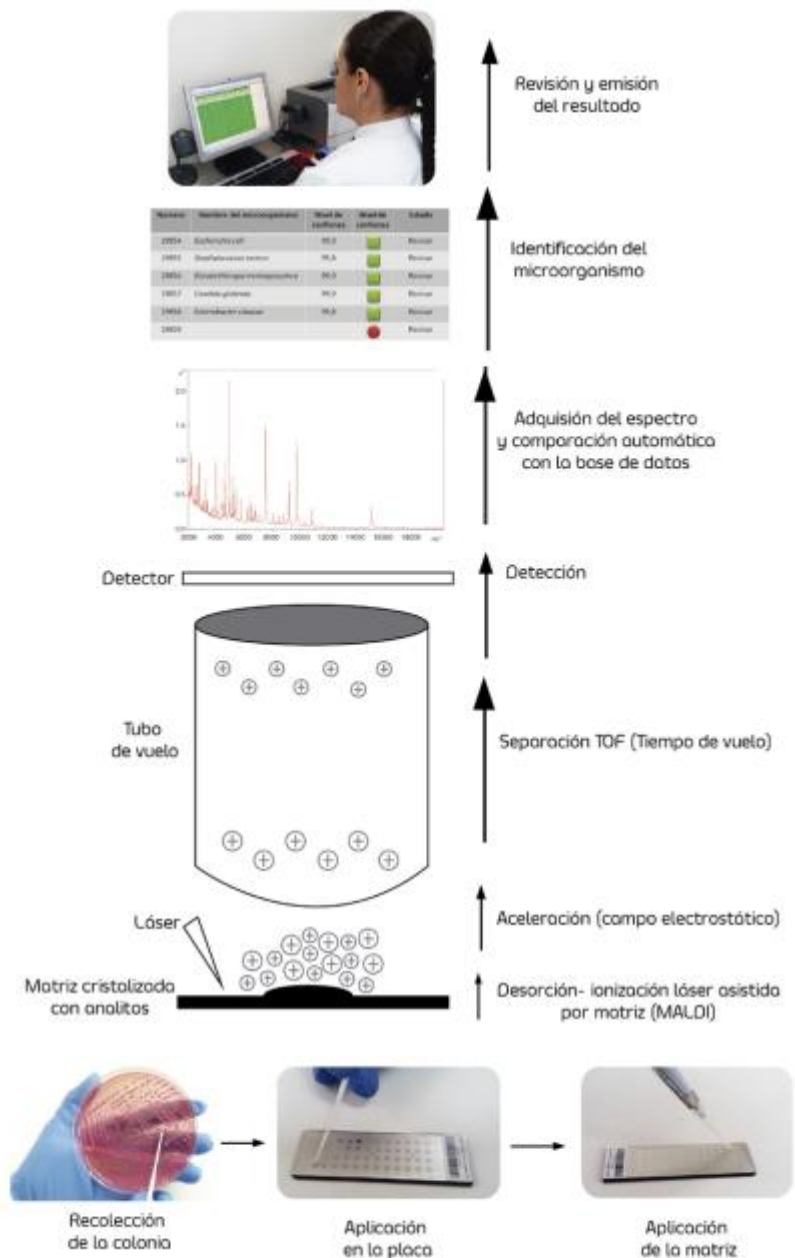


Figura 14. Esquema general de la identificación bacteriana de microorganismos mediante MALDI-TOF (Maldonado et al., 2018).

El MALDI-TOF hoy en día es empleado para determinar la resistencia antimicrobiana que pueden presentar algunos microorganismos. Los ensayos para detección de resistencia antimicrobiana que se pueden encontrar es la detección de hidrólisis de β -lactámicos. Este ensayo se basa en la observación de la actividad enzimática de las β -lactamasas, destruyendo los antibióticos por hidrólisis. Estas enzimas son sintetizadas y secretadas por microorganismos resistentes.

El ensayo MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- β -Lactamase (MBT STAR-BL) proporciona resultados en pocas horas. En este caso existe un rompimiento enzimático por hidrólisis del anillo β -lactámico del antibiótico en un primer paso conduce a la adición de una molécula de agua a su estructura química, lo que resulta en un aumento de la masa molecular de aproximadamente 18 Da. Otra reacción de hidrólisis puede provocar con frecuencia un cambio de masa de ~44 Da. Tales cambios de masa, aunque diminutos para las tecnologías clásicas conocidas de la microbiología y la biología molecular, pueden detectarse fácilmente mediante espectrometría de masas y por lo tanto el MALDI-TOF permite monitorear esta reacción (Kostrzewa & Pranada, 2016).

Por otra parte, recientemente se está llevando a cabo un método nuevo relacionado con la síntesis de proteínas en las células utilizando medios que contienen compuestos de nutrientes marcados con isótopos estables. Al estar presente un microorganismo que sea resistente en un medio con antibiótico este generará un aumento en su peso molecular y por lo tanto existirá un aumento de masas moleculares en el perfil proteico (Kostrzewa & Pranada, 2016).

Metagenómica

La determinación de resistencia antimicrobiana en los microorganismos no es una tarea sencilla, ya que hay ocasiones en los que los microorganismos que están presentes en una matriz compleja no pueden ser aislados para su análisis, por lo que la aplicación de la metagenómica en la determinación de la resistencia antimicrobiana es una herramienta molecular que hoy en día es de gran ayuda para los investigadores. La metagenómica se encarga del estudio de la colección del material genético que se presenta en una comunidad mixta de organismos (National Human Genome Research Institute, s.f.). Hoy en día la metagenómica tiene el potencial de hacer avances en la investigación moderna, como es en la inocuidad de los alimentos al centrarse en las comunidades microbianas, incluyendo los patógenos transmitidos por los alimentos, asociados con los alimentos o los animales destinados a la alimentación (Chen et al., 2015).

Capítulo 4. Reglamentación para la resistencia a los antimicrobianos

Los alimentos juegan un papel muy importante en el desarrollo y la propagación de la resistencia antimicrobiana, ya que sirven como una vía potencial de exposición para todos los consumidores. Los animales que son destinados para el consumo humano, al igual que las personas, portan microorganismos, en los cuales puede existir la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos y estos microorganismos pueden llegar a los alimentos de diversas maneras.

Como se puede observar en la figura 16 se esquematiza la propagación de la RAM, la cual puede provenir de los animales de abasto, en donde la carne se encuentra contaminada por dichos microorganismos o bien, en los cultivos se pueden contaminar por las heces animales presentes en el agua de riego o bien de personas que hayan presentado un cuadro clínico el cual al estar en tratamiento con antibióticos genera resistencia antimicrobiana y esta se puede transmitir de igual manera a las personas que nos rodean.

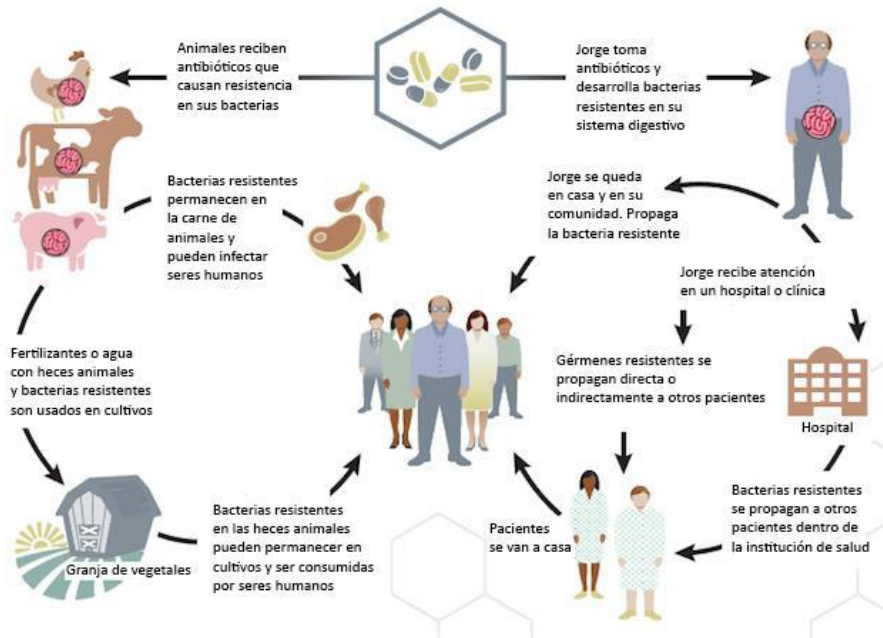


Figura 15. Diseminación de la resistencia antimicrobiana. Imagen recuperada de: (Consejo de Salubridad General, 2018).

La seguridad alimentaria además de estar a cargo de la empresa responsable de la distribución y venta de los alimentos debe ser una prioridad para instituciones que se encargan de inspeccionar la inocuidad de los alimentos, y también los mismos consumidores deben realizar acciones para evitar un cuadro de intoxicación alimentaria y por medio de acciones como el correcto lavado de como manos antes de manipular cualquier alimento, llevar a cabo un buen proceso de cocción (empleando la temperatura y tiempo correcto), evitando contaminación cruzada y refrigerando estos a una temperatura óptima en donde los microorganismos no puedan reproducirse, etc., se puede poner un alto a la propagación de los microorganismos resistentes. Debido a la presencia de dichos microorganismos resistentes en los alimentos, actualmente existen entidades internacionales que están trabajando y realizando acciones para prevenir infecciones causadas por aquellos microorganismos resistentes a las sustancias antimicrobianas.

4.1 Programas de vigilancia

FAO

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), a través del Codex Alimentarius estableció un primer grupo de acción especial sobre resistencia a los antimicrobianos, cuyo objetivo es la elaboración de orientaciones de base científica sobre cómo evaluar y gestionar los riesgos para la salud humana asociados a la presencia en los alimentos y piensos de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, así como su transmisión por medio de los alimentos y piensos.

En un segundo grupo de acciones se estableció recientemente en respuesta al aumento de la incidencia de la resistencia a los antimicrobianos, elaborar orientaciones con base científica para facilitar la gestión coherente de la resistencia a los antimicrobianos a lo largo de la cadena alimentaria. Además, de que se han desarrollado de otros textos del Codex Alimentarius referente a los medicamentos veterinarios y sus residuos, la higiene alimentaria y la alimentación animal contribuyen también a combatir la resistencia a los

antimicrobianos al prevenir el desarrollo de dicha resistencia y minimizar su transmisión a lo largo de la cadena alimentaria (Codex Alimentarius, s.f.).

CDC

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), es la agencia nacional de salud pública de los Estados Unidos. Es una agencia federal norteamericana que está bajo la dirección del Departamento de Salud y Servicios Humanos. Esta agencia especializada en el área de seguridad de la salud lleva a cabo campañas sobre la resistencia antimicrobiana, en donde menciona que la salud de los consumidores está estrechamente relacionada con la salud de los animales y del entorno. Principalmente la CDC lleva a cabo estrategias para enfrentar la resistencia antimicrobiana como es la prevención mediante campañas en la que se divulga el uso apropiado de los antibióticos, vigilancia de la salud mediante colaboraciones con otras instituciones como es la FDA, la EPA y el USDA para establecer el monitoreo de la resistencia antimicrobiana en bacterias entéricas entre las personas, los animales para el consumo humano, así como los alimentos. (CDC, 2021)

Situación actual en México

En México son pocos los institutos que se dedican a la investigación sobre la resistencia antimicrobiana, sin embargo el Instituto Nacional de Salud Pública, es una entidad que se encarga de la vigilancia epidemiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana, con el fin de apoyar la prescripción y las políticas sobre los antibióticos, dicho instituto lleva a cabo el trabajo con más de 20 hospitales en la República Mexicana, alrededor de 8 laboratorios en el extranjero y presenta colaboraciones con diversas redes de vigilancia (Instituto Nacional de Salud Pública , 2020).

Las acciones que están llevando a cabo otros órganos regulatorios a nivel internacional por la FAO, la OMS, así como la OIE, también involucran algunas repercusiones en nuestro país, pues estos órganos hacen un llamado para que se implementen acciones locales, nacionales y globales, basados en un planteamiento multidisciplinario, bajo la premisa “One health”, en donde se busca

que los países puedan contribuir en minimizar la aparición y propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, así como asegurar que los agentes antimicrobianos sigan siendo efectivos y útiles para curar enfermedades, promover su uso de manera prudente y responsable así como garantizar el acceso a medicamentos de buena calidad.

Con el fin de dar cumplimiento a los compromisos hechos por México ante la OMS, en México se cuenta con la “Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos”, en donde México se ha comprometido a establecer los mecanismos necesarios para poder reducir al máximo la resistencia antimicrobiana con lo establecido a nivel tanto nacional como internacional (COFEPRIS, 2018).

La estrategia nacional de acción contra la resistencia a los antimicrobianos tiene como objetivo general contener las acciones necesarias que vinculen la salud humana y la salud animal, así como la producción de alimentos, encaminadas a controlar, reducir o, en su caso, eliminar el riesgo que implica la resistencia antimicrobiana. Al mismo tiempo que el uso de los antimicrobianos sea responsable en México, se busca garantizar a la población, en la medida de lo posible, la accesibilidad y continuidad de tratamientos exitosos para las enfermedades infecciosas, así como contar con medidas eficaces para su prevención, incluyendo a todos los involucrados en las acciones específicas, la academia, los profesionales de la salud, tanto del sector público como privado, las organizaciones civiles, la industria de los insumos para la salud, así como las asociaciones de profesionales afines (Consejo de Salubridad General , 2018).

4.2 Control microbiológico y de calidad en la carne

El lavado y la desinfección en la industria alimentaria son las principales operaciones que afectan la seguridad y la estabilidad de los productos finales y por lo tanto son puntos críticos de los procesos de producción. En la producción de alimentos, la limpieza y la higiene tienen que mantenerse dentro de las Buenas Prácticas de Higiene (BPH), las cuales son la base de los principios del sistema HACCP. Con respecto a la resistencia antimicrobiana que existe dentro

de la industria alimentaria, el proceso de lavado, así como de desinfección, son procesos claves que tienen un efecto en el control de los microorganismos que presentan resistencia antimicrobiana, así como aquellos otros patógenos que pueden generar una posible afección en los consumidores.

El lavado es un proceso que consiste en la completa eliminación de la suciedad de las superficies sometidas a este proceso, usando de forma típica agentes físicos como son el cepillado, enjuagado (alta presión y baja presión), o bien el uso de agentes químicos como son ácidos orgánicos, mientras que la desinfección consiste en la eliminación selectiva de microorganismos indeseables que causan descomposición de los productos alimenticios o perturban el curso apropiado del proceso tecnológico, siendo el principal enfoque los patógenos, los cuales representan un alto riesgo para la salud humana y animal. La desinfección destruye los microorganismos gracias a su efecto en la estructura o metabolismo de estos. Así pues, la desinfección depende de factores como la duración del proceso y la concentración del desinfectante (Bilskah, 2015).

El lavado y la desinfección son dos procesos diferentes, los cuales deben llevarse a cabo para tener limpias y sanitizadas las instalaciones, maquinaria, así como instrumentos que son empleadas en la industria alimentaria con el objetivo de preservar la inocuidad de los alimentos.

Etapas de lavado y desinfección

El proceso de lavado y desinfección se llevan a cabo en la noche en las plantas de procesamiento de carne (se realizan en este horario debido a que es la hora en la que finaliza el último turno y debe prepararse todo para el comienzo del nuevo turno). Las máquinas individuales (moledoras, cortadoras, etc.) así como aquellos equipos que tienen contacto con el producto como pueden ser bandas transportadoras y los implementos auxiliares (navajas, contenedores) deben de limpiarse con frecuencia. Dentro de la literatura se encontró que las etapas que se llevan dentro de la industria cárnica son las que se mencionan a continuación (Bilskah, 2015):

1. **Preparación del enjuagado:** se realiza la remoción de grandes fragmentos del producto (tejido muscular, pedazos de hueso, sangre, etc.). Se lleva a cabo para proporcionar las condiciones adecuadas para el lavado, solo dura unos segundos y remueve el 30% de los residuos.
2. **Procedimiento de lavado:** se lleva a cabo la eliminación de suciedad y residuos que pueden permanecer después del proceso de producción en las superficies de las máquinas y equipos. Es importante que esta etapa se lleve con profundidad.
3. **Enjuagado:** para remover residuos de las sustancias químicas que se han aplicado en el lavado, además que en esta etapa se “arranca” la suciedad, dejando expuesta así la biopelícula de microorganismo que se encuentre.
4. **Desinfección:** es la penetración de la biopelícula e inactivación de los microorganismos. Esta se puede realizar solo en superficies lavadas profundamente, en donde se emplean preparaciones a base de varios tipos de sustancias activas. Dentro del mercado se puede encontrar una amplia gama de sustancias que pueden emplearse, de las cuales cada una tiene sus propias limitaciones y ventajas.
5. **Enjuagado final:** se debe realizar con agua potable. La calidad microbiológica del agua determina la posibilidad de una contaminación secundaria de las superficies que se encuentren adecuadamente desinfectadas.

Agentes de lavado y desinfección

Para aplicar un desinfectante primero se necesita identificar la microbiota que se encuentra en mayor cantidad, ya que la acción que puede ejercer está en entomo a la membrana citoplasmática, la desnaturalización de proteínas, degradación de ácidos nucleicos, oxidación de grupos sulfhídrico y la formación de enlaces estables con otros compuestos. Las células bacterianas bajo la protección de la capa de biopelícula son 1000 veces más resistentes a la acción de los agentes desinfectantes que las células en estado planctónico (bacterias que se encuentran aisladas en una fase líquida).

Para reducir las biopelículas, los procedimientos utilizados con mayor frecuencia son (Bilskah, 2015):

- **Proceso físico:** acción mecánica; fregado y raspado, proceso térmico; agua caliente aire caliente, rayos láser, ultrasonido, procesamiento por radiación.
- **Procesos químicos:** agua electrolizada, ozono, EDTA, ácido peracético, oxoclorato de sodio, cloros.
- **Procesos biológicos:** bacterias antagonistas, bacteriófagos, bacteriocinas, enzimas.

En la práctica, son usados frecuentemente los métodos químicos, ya que los agentes de lavado que presentan acción bactericida y así disminuyendo la microbiota presente, los más usados son (Bilskah, 2015):

1. **Compuestos clorados:** oxoclorato de sodio, cloraminas, etc. En contacto con las células microbianas liberan oxígeno ionizado, el cual desnaturaliza las proteínas y destruye estructuras de la membrana citoplasmática y la desactivación de enzimas que contienen el grupo -SH. El dióxido de cloro es efectivo contra bacterias y virus; destruyen la membrana celular y el núcleo de las bacterias.
2. **Compuestos de amonio cuaternario:** tensoactivos catiónicos. Alteran la permeabilidad de la pared celular y su membrana de las bacterias. Actúan en un amplio rango de pH y no causan corrosión.
3. **Peróxidos:** comprende principalmente al peróxido de hidrógeno. Actúa en bacterias, virus, bacterias y hongos. El ácido peracético se usa a menudo contra esporas, virus y hongos, su acción consiste en: oxidación de grupos -SH y oxidación de dobles enlaces encontrados en las membranas celulares. Con respecto a los microorganismos, consiste en la liberación de oxígeno activo, el cual destruye proteínas, ácidos nucleicos y grasas.
4. **Alcoholes:** propanol y etanol. Causan la desnaturalización de todas las proteínas y la disolución de lípidos.
5. **Aldehídos:** formaldehído y el glutaraldehído

La efectividad del lavado y la desinfección puede estar sujeta a varios factores, tales como: la duración del ciclo de lavado, la temperatura, conductividad, pH de los agentes de lavado, velocidad del flujo, presión, etc. La limpieza se puede asegurar mediante la aplicación de (Bilskah, 2015):

- **Evaluación visual de la limpieza de las instalaciones y equipo:** ésta es una evaluación cualitativa y subjetiva. Sin embargo, no es recomendable a nivel industrial o profesional.
- **Método óptico (turbidimétrico):** consiste en la determinación del grado de turbidez de la solución de lavado.
- **Método eléctrico:** consiste en la determinación de la conductividad eléctrica del líquido que fluye.
- **Métodos microbiológicos:** los cuales pueden consistir en:
 - Recolección de frotis (el cual puede ser de las superficies, así como de las manos de los empleados), preparación de cultivos y verificación de unidades formadoras de colonias (UFC).
 - Evaluación de la pureza del aire, en donde se puede emplear el método de sedimentación o impactación.
 - Determinación de concentración de ATP, por bioluminiscencia. La presencia de ATP en las muestras recolectadas indica la existencia de contaminantes orgánicos (residuos animales y vegetales, así como microorganismos).

Capítulo 5. Protocolo: Aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos a partir de productos cárnicos

Objetivos

- Determinar la presencia de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas a partir de muestras cárnicas (de productos bovinos y avícolas)
- Explicar el fundamento de la identificación microbiana mediante el uso del analizador analítico MALDI-TOF.
- Resaltar la importancia de la identificación óptima de la probable presencia de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas en muestras procedentes de alimentos.

Fundamento de la técnica

En los alimentos, los microorganismos presentes en cada matriz alimentaria posiblemente se encuentren dañados por el proceso de elaboración o por los factores intrínsecos asociados al alimento y generalmente, están acompañados por un gran número de microorganismos competidores similares a ella (microbiota acompañante). Por estas características previamente mencionadas, es importante llevar a cabo una metodología en la cual se pueda aislar el microorganismo de interés; particular para el presente trabajo se desea aislar aquellos microorganismos que presenten resistencia antimicrobiana. El procedimiento para la determinación y el aislamiento de dichos microorganismos consta de cuatro etapas; en la primera etapa se lleva a cabo un pre-enriquecimiento en un medio nutritivo no selectivo para facilitar la recuperación de los microorganismos hasta restaurar a una condición fisiológica estable, sin embargo para las muestras cárnicas a analizar al ser parte del tracto gastrointestinal de las especies de las que provienen (bovino y avícola), la carga microbiana es elevada, por lo que esta etapa se llevará por un periodo de tiempo reducido, con el fin de que la carga microbiana no aumente.

En la segunda etapa, el aislamiento selectivo de los microorganismos resistentes presentes en las muestras cárnicas se lleva a cabo empleando medios de cultivos selectivos, como los son el medio Eosina y Azul de metileno (EMB) y Endo, en este caso ambos medios son selectivos e ideales para el desarrollo de microorganismos Gram negativos. Para el caso del medio EMB la selectividad es conferida gracias a la eosina y el azul de metileno, los cuales son sustancias que ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas y, por otra parte, en el medio Endo, es ligeramente menor selectivo ya que en su formulación presenta sulfito de sodio con fucsina básica, evitan el crecimiento de bacterias Gram positivas y otros bacilos Gram negativos

Con respecto al medio Luria-Bertani (LB), este se emplea como un medio no selectivo con el propósito de obtener el crecimiento microbiano de aquellas bacterias que tuvieron una supresión en los medios selectivos. Para todos los medios se les suplementa con un antibiótico, el cual ejercerá la selección selectiva de los microorganismos resistentes a dicho antibiótico empleado. En la tabla 4 se enlistan las sustancias a evaluar:

Tabla 4. Antibióticos y concentraciones empleadas para la etapa de aislamiento selectivo.

Antibiótico	Espectro de inhibición ¹	Concentración de stock ² mg/mL	Concentración final en caja Petri ² µg/mL
Cloranfenicol	Se une de manera reversible a la proteína L16 de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, donde se evita la transferencia de aminoácidos a las cadenas peptídicas en crecimiento (quizás mediante la supresión de la actividad de la peptidil transferasa), lo que inhibe la formación de enlaces peptídicos y la subsiguiente síntesis proteica (OPS, 2019). Es un antibiótico de amplio espectro cuyo espectro incluye varias bacterias Gram positivas y Gram negativas.	34	25
Tetraciclina	Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al impedir la asociación de aminoacil-tRNA con el ribosoma bacteriano (Kumar, 2017). Presenta actividad contra bacterias	5	10

	Gram positivas y bacterias Gram negativas.		
Kanamicina	Los aminoglucósidos son compuestos que actúan sobre los ribosomas. Por acción del antibiótico se induce el reordenamiento de los lipopolisacáridos de la pared bacteriana, produciéndose orificios transitorios en la pared celular y, como consecuencia, un aumento de su permeabilidad. Una vez en el interior de la bacteria, el antibiótico se fija a los ribosomas bacterianos e inhibe la síntesis proteica (OPS, 2019).	1	10
Gentamicina	Los aminoglucósidos son útiles principalmente en infecciones que involucran bacterias aerobias Gram negativas	1	20
Estreptomycin		1	20

¹ (Kumar, 2017) y (OPS, 2019).

²(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021).

En la tercera etapa, también conocida como la etapa de purificación se lleva a cabo la siembra de aquellas colonias aisladas obtenidas de la etapa previa de aislamiento selectivo (en este caso se seleccionan colonias que presenten características morfológicas diferentes, las cuales pueden ser el color, el tamaño y en aquellos medios selectivos si son o no fermentadores de lactosa) con el fin de obtener microorganismos aislados. Esta etapa de purificación se complementa con la elaboración de tinciones de Gram para poder verificar la pureza. Finalmente, en la cuarta y última etapa, al obtener colonias purificadas, estas se siembran en medio no selectivo (agar LB + antibiótico) ya que estas serán empleadas para su posterior identificación bacteriana.

Con respecto a la segunda parte de este protocolo, relacionada con la identificación bacteriana de los microorganismos resistentes, se lleva a cabo mediante el empleo del equipo MALDI-TOF, que permite la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (Maldonado

et al., 2018). Con esta nueva tecnología se obtiene de manera más precisa la identificación de las bacterias en comparación de los métodos fenotípicos, los cuales dependen de los procesos metabólicos que los microorganismos llevan a cabo y donde además los tiempos de incubación mínimos son importantes para resultados confiables.

Medios y diluyentes empleados

- 225 mL de caldo lactosado
- Solución isotónica estéril
- Agar EMB + antibiótico
- Agar Endo + antibiótico
- Agar LB + antibiótico
- Soluciones Stock de antibiótico a evaluar (ver tabla 4)

Materiales y equipo

- Gradilla
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Micropipeta de 100 a 1000 μ L
- Puntas estériles para micropipeta de 100 a 1000 μ L
- Varillas en "L" estériles
- Asa bacteriológica
- Palillos de maderas estériles
- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, pinzas) para toma de muestra
- Mechero
- Piseta con agua
- Portaobjetos
- Balanza granataria
- Stomacher (homogeneizador peristáltico)
- Bolsas de plástico estériles para Stomacher
- Incubadora a 37°C
- Refrigerador
- Microscopio óptico
- Equipo analizador MALDI-TOF-MS Biotyper BRUKER

Muestra

25 g de muestra a analizar, perteneciente al tracto gastrointestinal del animal de abasto, como puede ser, intestino, hígado, estomago, o bien molleja en caso de muestras provenientes de aves. Se recomienda que la muestra sea proveniente de rastros municipales y que esta permanezca a una temperatura de refrigeración desde su obtención hasta su recepción en el laboratorio.

Es importante que todas las muestras a analizar se encuentran etiquetadas. En este caso, como se puede ver en la tabla 5 se muestra un ejemplo de los datos que debe de contener.

Tabla 5. Ejemplo de etiqueta empleada para muestras

Facultad de Química, UNAM. Aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos a partir de productos cárnicos.	Código: 02RH050922
Nombre y descripción del producto: Hígado de res	Fecha: 05 de septiembre de 2022
Hora y lugar del muestreo: 08:45 am Rastro de Ferrería. Av. De las Granjas s/n, Santa Barbara, Azcapotzalco, 02230, CDMX.	Temperatura de la muestra: 14°C
Condiciones del empaque: Bolsa de plástico	Temperatura de muestra en el laboratorio: 18°C
Condiciones generales del producto: Producto perecedero de color característico. Sin presencia de olores extraños.	Muestreado por: Lorena Garcia Romero

Diagrama general para la etapa de determinación y aislamiento de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas

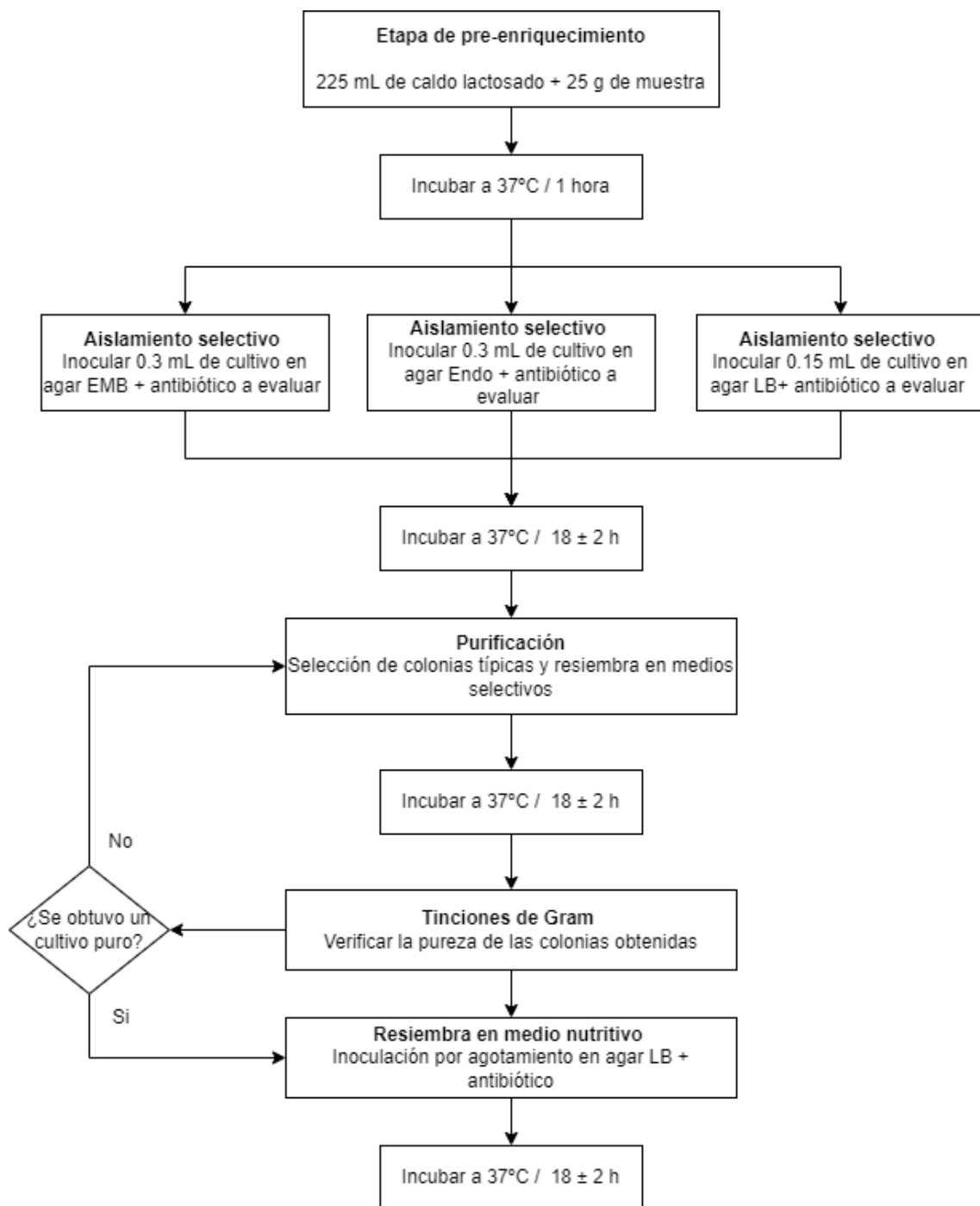


Figura 16. Procedimiento general para la determinación y aislamiento de microorganismos resistentes a antimicrobianos.

Diagrama general para identificación bacteriana mediante el analizador MALDI-TOF

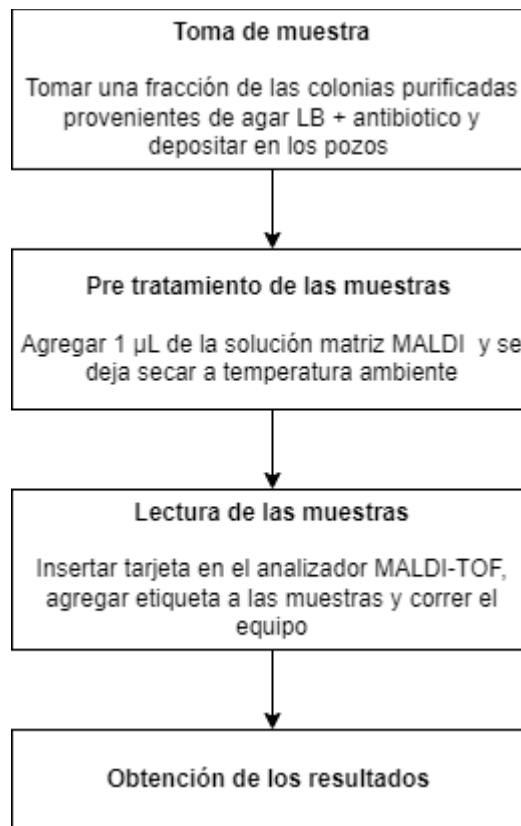


Figura 17. Procedimiento general para la tipificación de microorganismos resistentes a antimicrobianos mediante el uso del analizador MALDI-TOF Biotyper Bruker Daltonik.

Procedimiento experimental

a) Aislamiento de microorganismos resistentes a antimicrobianos

I. Etapa de pre-enriquecimiento

1. Con ayuda de los cubiertos estériles muestrear 25 g de la muestra (ya sea hígado, intestino o bien molleja) en zona aséptica y poner la muestra en bolsa de plástico

2. Agregar aproximadamente la mitad del caldo de pre-enriquecimiento a la bolsa de plástico que contiene la muestra y homogeneizar con ayuda del Stomacher por 2 minutos a velocidad normal.
3. Llevar la muestra a incubar a una temperatura de 37°C durante una hora.

II. Etapa de aislamiento selectivo

1. Al terminar el periodo de incubación, agregar a los medios selectivos en condiciones asépticas (agar EMB + antibiótico y agar Endo + antibiótico) 300 µL en las placas y distribuir el inóculo con ayuda de la varilla en "L" estéril con el fin de obtener colonias aisladas. Para el caso del agar LB + antibiótico se agregan 150 µL del caldo de pre-enriquecimiento y se esparce nuevamente con ayuda de la varilla en "L" estéril.
2. Los medios de cultivo se incuban a 37°C durante 16-20 horas.
3. Observar y anotar las características morfológicas de las colonias obtenidas.

III. Etapa de purificación

1. De las colonias obtenidas de la etapa de aislamiento selectivo se seleccionan 6 colonias con características diferentes (principalmente físicas como puede ser coloración, tamaño o cambio de color del medio que señalen que sean fermentadoras) esto será para cada medio de cultivo con antibiótico y estas se siembran en una caja del mismo agar selectivo del que proviene respectivamente.
2. Incubar a 37°C durante 16-20 horas.
3. Llevar a cabo tinción de Gram para identificar si se cuentan con colonias purificadas (se debe de observar que se encuentre un solo tipo de microorganismo y por lo tanto de morfología).
4. En el caso de que se observe diferentes morfologías o bien diferentes bacterias (Gram positivas o Gram negativas) se resiembró nuevamente en los medios selectivos con antibiótico, hasta obtener colonias puras.

IV. Etapa de resiembra en medio nutritivo

1. Con ayuda de palillos de madera estériles, tomar una fracción de colonia proveniente de los medios selectivos y sembrar en un medio no selectivo, como es el agar LB suplementado con el antibiótico del que proviene.
2. Llevar a cabo la inoculación por cuadrante con el fin de obtener colonias aisladas.
3. Incubar a 37°C durante 16-20 horas.

b) Identificación bacteriana de los microorganismos aislados de las muestras

1. De los microorganismos aislados y purificados del punto anterior, se tomar en zona aséptica una colonia con ayuda de un palillo estéril y esta se deposita en un pocillo de la tarjeta de lectura del equipo analizador MALDI-TOF Biotyper. Es importante esparcir una cantidad considerable de la muestra en el pocillo para tener una correcta lectura.
2. Se realiza un pretratamiento de la muestra, se agregará 1 µL de la solución de matriz MALDI (Bruker IVD HCCA (Ácido acrílico 2-ciano-3-(4-hidroxifenil) disuelto en solvente estándar (50% acetonitrilo, 47.5% agua y 2.5% de ácido trifluoroacético) y se deja secar a temperatura ambiente.
3. Colocar la tarjeta en el equipo y con ayuda del software agregar una etiqueta a cada una de las muestras a identificar.
4. Correr la lectura y esperar al reporte final con los resultados obtenidos de la identificación bacteriana.
5. Después de que los microorganismos problema hayan sido identificados mediante el MALDI-TOF, se pueden obtener tres resultados; una única identificación con un nivel de confianza elevado (calificación de 2.0 - 3.0), resultados de identificación con niveles de confianza próximos (calificación 1.70 – 1.99) o ningún resultado (calificación de 0.00 – 1.69).

Capítulo 6. Resultados experimentales

Para el presente proyecto se llevó a cabo el análisis de tres diferentes muestras cárnicas, las cuales fueron hígado e intestino de res y molleja de pollo, a cada una se le aplicó el protocolo establecido (ver capítulo 5). A continuación, se encontrarán los resultados que se obtuvieron.

6.1 Resultados experimentales de la muestra de hígado de res

Del aislamiento de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas provenientes de la muestra de hígado de res, se llevó a cabo el análisis de 31 colonias aisladas. Se realizó su identificación bacteriana, solo en el caso de una colonia el equipo analizador MALDI-TOF no pudo expresar ningún resultado, lo cual se le puede atribuir a la cantidad de muestra que se utilizó (Kostrzewa & Pranada, 2016).

En la tabla 6 se puede observar los resultados condensados del crecimiento presentado en los diferentes medios con antibiótico.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la muestra de hígado de res

Antibiótico	Microorganismos aislados de muestra de hígado de res		Total	Porcentaje de crecimiento
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia alvei</i>		
Tetraciclina	8	3	11	37%
Cloranfenicol	7	0	7	23%
Kanamicina	6	0	6	20%
Estreptomina	5	1	6	20%
Gentamicina	0	0	0	0%
Total	26	4	30	100%

Se identificó la presencia principalmente de dos tipos de género, en donde la mayor cantidad de microorganismos aislados corresponden a *Escherichia coli* (87%), y en menor cantidad *Hafnia alvei* (13%), en ambos casos dichos géneros de microorganismos pertenecen a la familia de las Enterobacterias (ver figura 18).

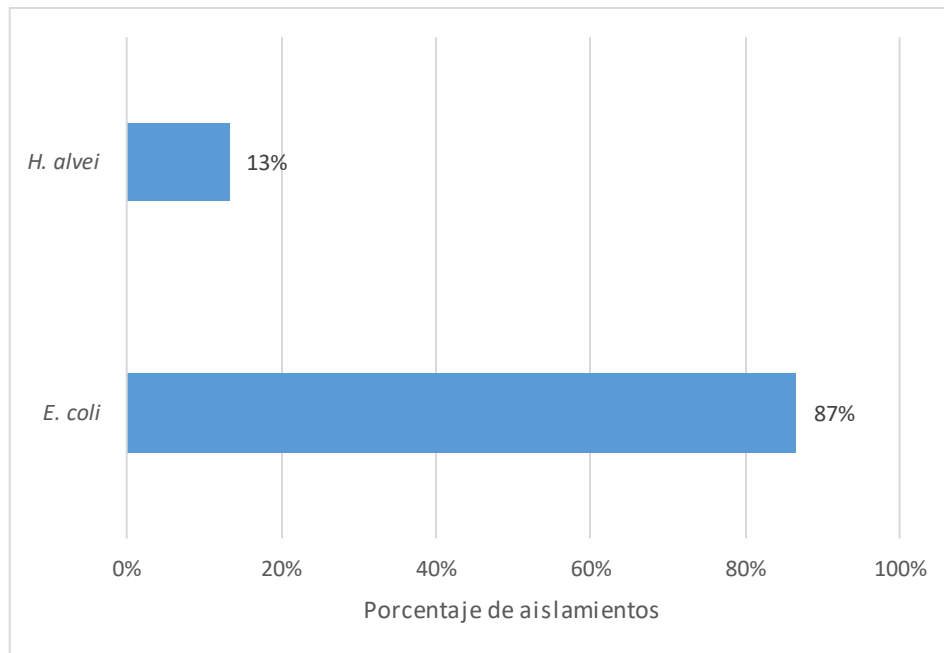


Figura 18. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de hígado de res.

6.2 Resultados experimentales de la muestra de vísceras de res

Para esta muestra, las vísceras que se analizaron fueron las abdominales, de las cuales se seleccionó una porción del intestino del animal, por lo que la presencia de diferentes microorganismos era algo esperado debido a que existe una gran diversidad microbiana en esta zona. Se aisló e identificó una mayor cantidad de microorganismos en comparación a muestra de hígado de res, pues en total fueron 60 aislamientos analizados. De los microorganismos que se aislaron e identificaron, *Escherichia coli*, que como en el caso de la muestra de hígado, fue el microorganismo que se aisló en mayor proporción (46%), en segundo lugar, el que se aisló en mayor cantidad fue del género *Aeromonas* (34%) y para este caso se obtuvieron diferentes especies, como son *Aeromonas* sp., *Aeromonas veronii*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas eucrenophila*, y *Aeromonas salmonicida*. En tercer lugar, se encontró *Hafnia alvei* (15%) y finalmente se pudo determinar la presencia de *Lelliottia amnigena*, *Moellerella wisconsensis* y *Enterococcus faecalis* (ver figura 19).

De igual manera, en la tabla 7 se puede observar los resultados condensados del crecimiento presentado en los diferentes medios con antibiótico.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la muestra de vísceras de res.

Antibiótico	Microorganismos aislados de muestra de vísceras de res						Total	Porcentaje de crecimiento
	<i>E. coli</i> ¹	<i>H. alvei</i> ²	<i>Aeromonas</i> ³	<i>L. amnigena</i> ⁴	<i>M. wisconsensis</i> ⁵	<i>E. faecalis</i> ⁶		
Tetraciclina	7	3	1	1	0	0	12	20%
Cloranfenicol	15	4	0	0	0	0	19	32%
Kanamicina	0	0	6	0	0	0	6	10%
Estreptomicina	5	2	4	0	1	0	12	20%
Gentamicina	0	0	10	0	0	1	11	18%
Total	27	9	21	1	1	1	60	100%

¹Microorganismos pertenecientes al género *Escherichia*

²Microorganismos pertenecientes al género *Hafnia*

³Microorganismos pertenecientes al género *Lelliottia*

⁴Microorganismos pertenecientes al género *Moellerella*

⁵Microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus*

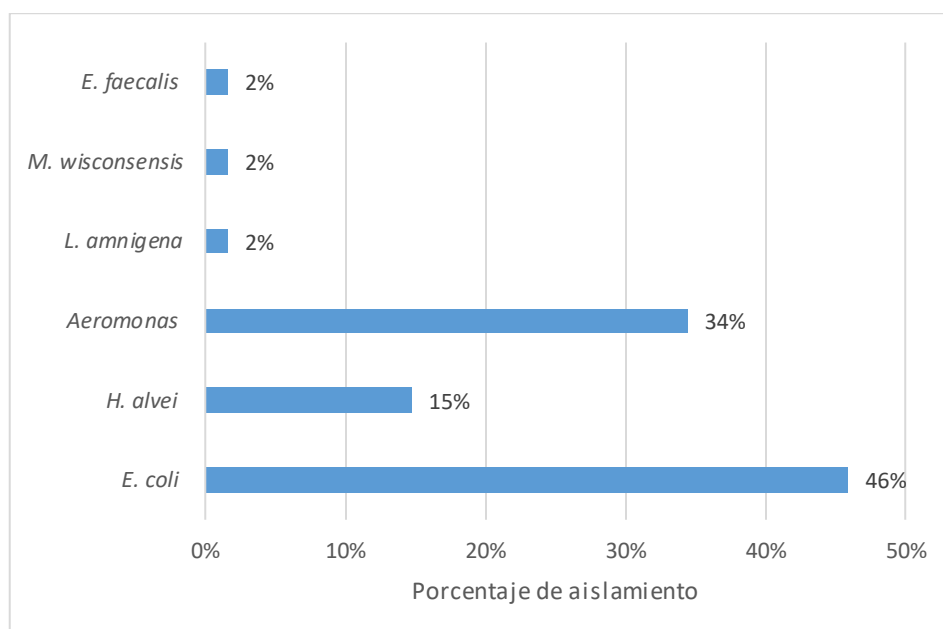


Figura 19. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de vísceras de res.

6.3 Resultados experimentales de la muestra de mollejas de pollo

Finalmente, con respecto a la tercera y última muestra analizada, la cual corresponde a una muestra de molleja de pollo. Se aisló un total de 71 microorganismos de los cuales se logró llevar a cabo la identificación de 26 microorganismos (aproximadamente el 37%, posteriormente se llevará a cabo la identificación bacteriana de los microorganismos faltantes). El mayor microorganismo aislado de los medios suplementados con antibiótico fue *E. coli* (73%) y además se identificó al género *Aeromonas* (15%), de los cuales se aisló

A. veronii y *A. medio*. Con respecto al aislamiento de microorganismos Gram positivo se determinó la presencia de *Micrococcus caseolyticus* y *Micrococcus canis* (15%) (ver figura 20).

En la tabla 8 se puede observar los resultados condensados del crecimiento presentado en los diferentes medios con antibiótico de la muestra de molleja de pollo.

Tabla 8. Resultados obtenidos de la muestra de molleja de pollo

Antibiótico	Microorganismos aislados de muestra de hígado de res			Total	Porcentaje de crecimiento
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Micrococcus</i> ¹		
Tetraciclina	8	3	2	6	23%
Cloranfenicol	7	0	1	3	12%
Kanamicina	6	0	0	6	23%
Estreptomina	5	1	1	5	19%
Gentamicina	0	0	0	6	23%
Total	26	4	1	26	100%

¹Microorganismos pertenecientes al género *Micrococcus*

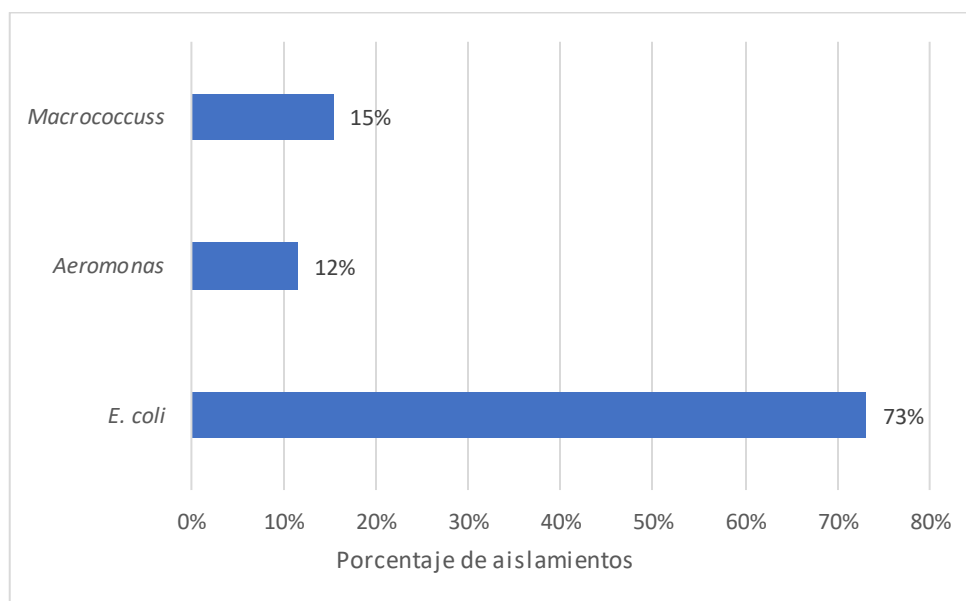


Figura 20. Microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas aislados de la muestra de mollejas de pollo (Representación del 37% de los aislamientos identificados de la muestra).

Capítulo 7. Discusión de resultados

Con respecto a los resultados obtenidos, se pudo llevar a cabo el aislamiento de bacterias resistentes a sustancias antimicrobianas a partir de diferentes productos cárnicos (hígado y vísceras de res y mollejas de pollo), provenientes de dos diferentes especies (bovina y avícola). Se emplearon cinco diferentes antibióticos; tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomina y gentamicina, que pertenecen a diferentes categorías de antibióticos; tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos. Las concentraciones a las que se trabajaron los antibióticos fueron aquellas establecidas por el CLSI (ver tabla 4). Toda la metodología realizada para obtener los resultados fue una propuesta experimental (capítulo 5) de la cual se obtuvieron resultados experimentales satisfactorios.

Algo a destacar es el uso del equipo MALDI-TOF biotyper, el cual fue una herramienta de gran ayuda en la identificación bacteriana de los aislamientos obtenidos. Con respecto a lo encontrado en la bibliografía esta tecnología es altamente reproducible, según Kostrzewa y Pranada (2016) en un estudio internacional, ocho laboratorios analizaron 60 muestras y lograron obtener una reproducibilidad entre laboratorios del 98.75%. Las ventajas que tiene este equipo es que acorta el tiempo del análisis, el equipo es capaz de analizar 96 muestras en una sola corrida. Si se compara con otros métodos convencionales para la identificación bacteriana, como son las pruebas bioquímicas, se ahorra tiempo, medios de cultivo y así mismos errores en la caracterización de los microorganismos, ya que los métodos convencionales conllevan a que existan problemas en la interpretación de resultados, así como la existencia de resultados falsos en algunas de las reacciones que se pueden llevar a cabo (Kostrzewa & Pranada, 2016).

Dentro de los resultados obtenidos de la identificación bacteriana, solo uno que pertenece a la muestra de hígado, no se pudo identificar esto se pudo deber a una señal insuficiente (atribuido a la cantidad de muestra utilizada) (Kostrzewa & Pranada, 2016).

7.1 Discusión de resultados experimentales de muestra de hígado de res

De los resultados obtenidos de la muestra de hígado de res se determinó la presencia de dos tipos de género, en donde la mayor cantidad de microorganismos aislados corresponden a *Escherichia coli* (87%), y en menor cantidad *Hafnia alvei* (13%), en este caso ambos géneros de microorganismos pertenecen a la familia de las Enterobacterias.

De los aislamientos que se realizaron se obtuvo una mayor cantidad de microorganismos resistentes a tetraciclina (37%) y para el caso de cloranfenicol, kanamicina y estreptomina se obtuvieron porcentajes muy similares. Solo para el caso de la gentamicina no se pudieron obtener aislamientos. Se puede decir que para esta muestra existe una mayor resistencia antimicrobiana para las tetraciclinas, sin embargo, para los aminoglucósidos, como es el caso de la kanamicina y estreptomina se obtuvo un porcentaje de resistencia similar y para el caso de la gentamicina, el cual también es un aminoglucósido, no se pudo aislar ninguna colonia en la etapa de aislamiento selectivo debido a que se obtuvo un crecimiento microbiano excesivo.

Esto contrapone los resultados obtenidos de los otros dos aminoglucósidos empleados, ya que al ser de la misma familia de antibióticos se esperaría un crecimiento similar a los otros. Dentro de la literatura se encontró que en el caso de los aminoglucósidos la presencia de iones magnesio y calcio en el medio de crecimiento, así como situaciones que disminuyen el potencial transmembrana (pH ácido, ambiente anaerobio o hiperosmolaridad), pueden reducir la difusión del aminoglucósido al interior de la bacteria (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). En este caso se tendría que volver a realizar los aislamientos considerando los puntos anteriores con el fin de disminuir aquellas interferencias que puedan conllevar a resultados erróneos.

De los microorganismos identificados como *Hafnia alvei*, la mayor cantidad de estas bacterias resistentes provienen de aquellos medios suplementados con tetraciclina y solo un aislamiento de gentamicina. Para el caso de *E. coli*, el mayor aislamiento se obtuvo de los medios suplementados por tetraciclina, seguidos por cloranfenicol, kanamicina y estreptomina (ver resultados en el capítulo 6).

Hafnia alvei es una bacteria Gram negativa que de acuerdo con la literatura es un microorganismo perteneciente a la microbiota intestinal humana y para este caso, también en diferentes mamíferos como es el caso de la res. La peculiaridad de este microorganismo reside en que su aislamiento en casos clínicos sigue siendo poco frecuente. *Hafnia alvei* ha evidenciado un aumento de la resistencia a los antibióticos y además de que este microorganismo comparte algunos mecanismos de virulencia con otros patógenos Gram negativos como es *E. coli* (Ramos-Vivas, 2020).

Esta bacteria se ha asociado con una amplia colección de infecciones como son septicemia, neumonía, síndrome urémico hemolítico, meningitis, etc. Cabe destacar que este microorganismo presenta genes para la comunicación bacteriana (quorum-sensing), movilidad, quimiotaxis, formación de apéndices superficiales (fimbrias) y para formación de películas (biofilms) (Ramos-Vivas, 2020). La presencia de este microorganismo dentro de la muestra cárnica analizada indica un riesgo para los consumidores. Ramos-Vivas (2020) considera que *H. alvei* es un patógeno fácil de tratar, sin embargo, el aumento de la resistencia antimicrobiana hace que este microorganismo en un futuro genere una alerta y tenga más relevancia.

Como bien se menciona, la resistencia antimicrobiana que poseen los microorganismos se encuentra mediada por su material genético. Dentro de la literatura se encontró que los plásmidos IncF (50-200 pb) que se encuentran en *E. coli* puede presentar determinantes de resistencia contra todas las clases principales de antimicrobianos como pueden ser los β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y quinolonas (McAuley & Fegan, 2021). La presencia de este tipo de plásmidos en cepas de *E. coli* genera la presencia de microorganismos multirresistentes a sustancias antimicrobianas. Para el caso de este proyecto no se puede establecer la multirresistencia (esta característica ocurre cuando una bacteria exhibe resistencia a tres o más clases diferentes de antibióticos) de los aislamientos de *E. coli* que se obtuvieron ya que, en el caso de la identificación microbiana, solo el equipo analizador proporciona el género y especie del microorganismo en cuestión. Sin embargo, los aislamientos que se realizaron provienen de los antibióticos evaluados, a excepción de la gentamicina. Para determinar si los aislamientos provienen de

una misma cepa se debe de llevar a cabo una PCR (en donde se podría llevar a cabo la amplificación de un gen en particular o bien llevar a cabo la secuenciación del DNA y compararlos con una base de datos como es el BLAST) para conocer si los microorganismos identificados dentro de este género y especie corresponden a la misma cepa y presentan una multirresistencia.

En relación con la muestra analizada, el hígado, es el principal órgano que lleva a cabo las reacciones de biotransformación de las sustancias que entran al organismo, como los son los antibióticos. En un estudio realizado en la Universidad de Guanajuato se demostró la presencia de antibióticos en muestras de hígado de res mediante el método de Kirby- Bauer, en donde placas de Müller-Hinton inoculadas con la cepa *de E. coli* ATCC 25922 se colocaban porciones de hígado (similar a los discos de antibióticos) y se evaluó la formación de halos de inhibición (Monroy et al., 2015).

Con base a estos resultados se puede considerar que en la muestra analizada proveniente del hígado podría contar la presencia de antibióticos, lo que puede conllevar a que los microorganismos presentes puedan desarrollar una resistencia antimicrobiana y en consecuencia generar un problema ya que la resistencia antimicrobiana se puede propagar entre los animales destinados al consumo humano y a su vez a los consumidores. La mejor manera de contener la resistencia antimicrobiana y mejorar la prevención de infecciones es mediante el uso adecuado de los antibióticos además de la implementación de herramientas para su trazabilidad y que esté en correlación con centros especiales para que este problema se vea disminuido.

7.2 Discusión de resultados experimentales de muestra de vísceras de res

Para esta muestra se obtuvieron una mayor cantidad de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas, lo cual era algo esperado ya que esta muestra pertenece a una parte del sistema gastrointestinal del animal de abasto. Es importante mencionar que el aislamiento de los microorganismos fue complicado debido al excesivo crecimiento microbiano de las bacterias además de que la muestra con la que se trabajó presentaba hongos filamentosos y levaduriformes.

De los microorganismos aislados *E. coli* como fue en el caso de la muestra de hígado, fue el microorganismo con un mayor porcentaje de aislamiento (46%). Los aislamientos realizados de *E. coli* se obtuvieron de aquellos medios de cultivo suplementados con los antibióticos: cloranfenicol, tetraciclina y estreptomycin. No existió un crecimiento microbiano en los antibióticos de kanamicina y gentamicina debido a que las pocas colonias que se pudieron aislar pertenecían a otro tipo de microorganismos. Con ello se, se puede decir que *E. coli* puede ser susceptible a estos antibióticos, sin embargo, se debe de realizar una prueba de sensibilidad para determinar y comprobar esta hipótesis.

Con respecto a los otros aislamientos realizados, se encontró una amplia presencia de bacterias pertenecientes al género *Aeromonas*, de los cuales se identificaron *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. eucrenophila* y *Aeromonas* spp. La presencia de este microorganismo en el medio se debe a su distribución en el ambiente y que de acuerdo con la literatura se pueden encontrar en diferentes ecosistemas y que generalmente son aislados de peces y crustáceos, sin embargo, pueden colonizar ambientes terrestres y pueden ser identificados de diferentes fuentes como son suelos, plantas, frutas, animales, aves, entre otros (Qu et al., 2022).

La presencia de *Aeromonas* en los alimentos es alta. Con base en la literatura se estipula que los aislamientos de este microorganismo en carne presentan un porcentaje del 5 al 10% (Qu et al., 2022). Para esta muestra los microorganismos pertenecientes a este género presentaron una incidencia de aislamientos del 34%, lo cual es mayor a lo señalado en la literatura.

Aeromonas tiene diversos factores de virulencia, que promueven la adhesión, colonización e invasión en las células huésped. Estos microorganismos que pertenecen a la familia *Aeromonadaceae* son capaces de causar infecciones del sistema gastrointestinal, los cuales si no son tratados adecuadamente pueden evolucionar y generar septicemia. De las bacterias aisladas pertenecientes al género *Aeromonas*, se encontró la presencia de *A. salmonicida* y *A. veronii* las cuales tienen la capacidad de causar infecciones y enfermedades en humanos (Bastos et al., 2019).

Se puede cuestionar que la presencia de los microorganismos que pertenecen al género *Aeromonas* se debe a que en los lugares en donde los animales de abasto son alimentados, puedan estar diseminados en el suelo o bien que el agua que los animales consumen no sea potable o que inclusive sean transportados a lugares en donde haya ríos o arroyos y que estos realicen ingesta de agua en estos posibles lugares. Para esta hipótesis se debe establecer un sistema de trazabilidad que permita conocer el lugar de donde provienen dichos microorganismos y así conocer la manera en que se propaga (CDC, 2019).

Con respecto a los microorganismos aislados se encontró en la literatura que *Lelliottia amnigena* y *Moellerella wisconsensis* son bacterias Gram negativas que pertenecen al género *Enterobacteriaceae*. *L. amnigena*, es una bacteria fitopatógena que causa enfermedades en plantas se puede encontrar en una variedad de ambientes. Este microorganismo puede penetrar las plantas y causar infecciones debido a su potencial para sintetizar una gama amplia de enzimas/isoenzimas más rápidamente y en grandes cantidades que las bacterias saprófitas pectolíticas, un ejemplo de daño que genera es que causa putrefacción blanda en algunas plantas como los tubérculos (Osei et al., 2022).

Dentro de la investigación realizada para este microorganismo se encontró que esta bacteria ha tenido una reclasificación, pues originalmente en 1960 se incluyó dentro del género *Enterobacter*, hasta que en 2013 se propuso la creación de este género, *Lelliottia* spp, en donde dos especies componen este género: *Lelliottia amnigena* y *Lelliottia nimipressuralis*. Dentro de una fuente consultada se menciona la patogenicidad de *Lelliottia amnigena*, la cual fue causante de pionefrosis (dilatación de la pelvis renal y de los cálices) en un

paciente de 63 años y tratada con artapenem, sin embargo, debido a la desactualización y limitada evidencia de los patrones de sensibilidad de *L. amnigena*, no es posible establecer recomendaciones específicas para el tratamiento de esta infección. A pesar de su papel patógeno conocido, sus sensibilidades o resistencias naturales han sido difíciles de establecer (Martín et al., 2018).

Una hipótesis que se estableció gracias a su presencia en la muestra analizada es que el animal de abasto pudo estar en contacto en campos en donde el follaje destinado para su alimentación se encontraba contaminado por este microorganismo, sin embargo, se debería de llevar a cabo la trazabilidad de dicha bacteria para determinar su origen y conocer la manera en que este se propaga entre los animales y como finalmente puede llegar a los consumidores.

Referente a *M. wisconsensis*, se encontró que es una bacteria que puede aislarse de diferentes muestras ambientales, alimentos, aparato digestivo y respiratorio humano e inclusive hemocultivos y heridas, por otra parte, lo particular de este microorganismo es que en ocasiones puede existir una identificación microbiana errónea con *E. coli* o *K. pneumoniae* subespecie *ozaenae* debido a la gran similitud en términos de crecimiento según los medios y las características bioquímicas (Leroy et al., 2016). En una de las fuentes bibliográficas consultadas se mencionaron el aislamiento de *M. wisconsensis* a partir de un hemocultivo de un paciente con colecistitis aguda, sin embargo, los investigadores mencionan que se requieren más aislamientos clínicos de este microorganismo para dilucidar el posible papel de *M. wisconsensis* en la colecistitis aguda. Sin embargo, no se ha establecido su patogenicidad en los humanos, aunque se ha aislado de muestras clínicas distintas de las heces, como el tejido de la vesícula biliar o la bilis (Aller et al., 2009).

Finalmente, también se aislaron cocos Gram positivos en esta muestra. *Enterococcus faecalis*, es una bacteria intestinal común que se encuentra en humanos y animales, incluidos mamíferos y aves, que se asocia con diversas enfermedades bacterianas zoonóticas clínicas. La mayor parte de los microorganismos aislados fueron bacterias Gram negativas ya que provienen de los medios Endo y EMB y con respecto al único microorganismo Gram positivo, este provenía de los medios de agar LB más antibiótico.

Enterococcus faecalis es un microorganismo que con base en la literatura causa infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infección de prótesis articulares, infecciones abdominopélvicas y endocarditis, además de que una de sus características más importantes es su alta adaptabilidad en condiciones ambientales adversas y su potencial desarrollo de resistencia a los antibióticos (Ali et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, al analizar la parte del tracto gastrointestinal donde se encuentra la mayor diversidad y cantidad de microorganismos se esperaba aislar una mayor cantidad de estos y los resultados obtenidos así lo demostraron. Para los antibióticos analizados, existió para esta muestra una mayor resistencia al cloranfenicol, ya que en los medios suplementados con este antibiótico se obtuvo un mayor crecimiento microbiano (32%). Para el caso de la tetraciclina, estreptomina y gentamicina, se obtuvieron resultados similares (20%) y finalmente, para la kanamicina se obtuvo un menor crecimiento de microorganismos resistentes (10%).

De los resultados obtenidos, se observó que en el caso de los microorganismos que pertenecen al género *Aeromonas* tuvieron el mayor crecimiento en aquellos medios que fueron suplementados con gentamicina, después kanamicina y finalmente en estreptomina. Solo un aislamiento de este género, *Aeromonas veronii*, provino de medios que fueron suplementados con tetraciclina. Con estos resultados se observó que *Aeromonas* presenta una resistencia antimicrobiana para los aminoglucósidos. Para el caso de *Enterococcus faecalis*, la presencia de dicho microorganismo en los medios adicionados con gentamicina indicó su resistencia ante este aminoglucósido. Dentro de la literatura se encontró una alta incidencia de resistencia antimicrobiana para este grupo de antibióticos por parte de *E. faecalis*, en donde se probaron estreptomina y gentamicina, la tasa de farmacoresistencia fue de 72.13% y 67.21% para estos antibióticos respectivamente (Yu et al., 2022).

7.3 Discusión de resultados experimentales de muestra de molleja de pollo

La muestra analizada de mollejas de pollo corresponde a una muestra de diferente animal de abasto a las dos muestras anteriores. De los microorganismos que se pudieron identificar de esta muestra fue *E. coli* (73%), el género de *Aeromonas* (15%), de los cuales se aisló las especies *A. veronii* y *A. media* y con respecto al aislamiento de microorganismos Gram positivo se determinó la presencia de *Micrococcus caseolyticus* y *Micrococcus canis* (15%).

Los aislamientos realizados de *E. coli* se obtuvieron de los medios suplementados con todos los antibióticos evaluados. Para determinar que los aislamientos de *E. coli* realizados provienen de una misma cepa se deberá de realizar una PCR y por lo tanto si estos presentan multirresistencia a los antibióticos. Con respecto a los microorganismos aislados pertenecientes al género *Aeromonas*, *A. veronii* es un patógeno al igual que *A. media*. Ambas son de importancia clínica, porque pueden causar gastroenteritis, infecciones de heridas y tejidos blando y septicemia (Persson et al., 2015).

Con respecto a *Micrococcus* spp. dentro de la literatura se encontró que son cocos Gram positivos que pertenecen a la familia *Staphylococcaceae*; están estrechamente relacionados con los estafilococos, pero, a diferencia de los estafilococos, no se consideran patógenos humanos. *Micrococcus* spp. son reconocidos como patógenos veterinarios relevantes, y su presencia ha sido reportada en productos alimenticios de origen animal. *Micrococcus caseolyticus* es la especie más estudiada del género *Micrococcus*, está asociada con el desarrollo de aroma y sabor en alimentos fermentados y, por lo tanto, se utiliza como cultivo iniciador en fermentaciones (Ramos et al., 2021).

Sin embargo, se deben tener en cuenta ciertos aspectos importantes relacionados con la seguridad alimentaria cuando se emplean estos microorganismos en las fermentaciones. Estudios recientes han reportado la presencia de genes asociados con resistencia a la metilina y otros antibióticos en *M. caseolyticus*. Esto puede ser perjudicial para la salud de los consumidores ya que los genes de la resistencia antimicrobiana pueden transferirse a otras

bacterias presentes en los alimentos, principalmente especies de estafilococos (Ramos et al., 2021).

En el caso de *Micrococcus canis* es un microorganismo patógeno el cual puede causar otitis, rinitis, mastitis y dermatitis en perros, sin embargo, dentro de la literatura se encontró un caso reportado este microorganismo el cual generó una infección grave en la piel humana la cual puede ser proveniente de un perro (Jost et al., 2021).

Dentro de la literatura se encontró que este microorganismo presenta una resistencia antimicrobiana a la penicilina y la cefoxitina y por otra parte puede ser susceptible a otros antibióticos como el cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, sulfametoxazol entre otros. El aislamiento de *M. canis* proviene del medio Endo suplementado con cloranfenicol, lo cual se contrasta con lo investigado, ya que la susceptibilidad reportada es de $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (Jost et al., 2021) y en este proyecto se trabajó a una concentración de $20 \mu\text{g/mL}$. Para confirmar esta discrepancia se requeriría llevar a cabo una prueba de susceptibilidad a este antibiótico.

Para esta muestra no se puede dar la relevancia a qué sustancia antimicrobiana fue la que existió una mayor resistencia antimicrobiana debido a que en la etapa de identificación bacteriana solo se logró identificar el 37% de los microorganismos aislados, pero se llevará a cabo la identificación de las bacterias restantes.

7.4 Discusión referente a los antibióticos evaluados

Se recolectaron todos los datos obtenidos de las tres muestras cárnicas evaluadas y se agruparon aquellas bacterias que presentaron resistencia antimicrobiana a cada uno de los antibióticos evaluados, tal como se observa en la figura 21. Es importante destacar que el número total de microorganismos aislados e identificados fue de 116, de los cuales, *E. coli* representó un porcentaje de 62%, los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas* el 21%, *Hafnia alvei* tuvo una incidencia de 11%, los microorganismos pertenecientes al género *Macrococcus* el 3% y *L. amnigena*, *M. wisconsensis* y *E. faecalis* el 1%.

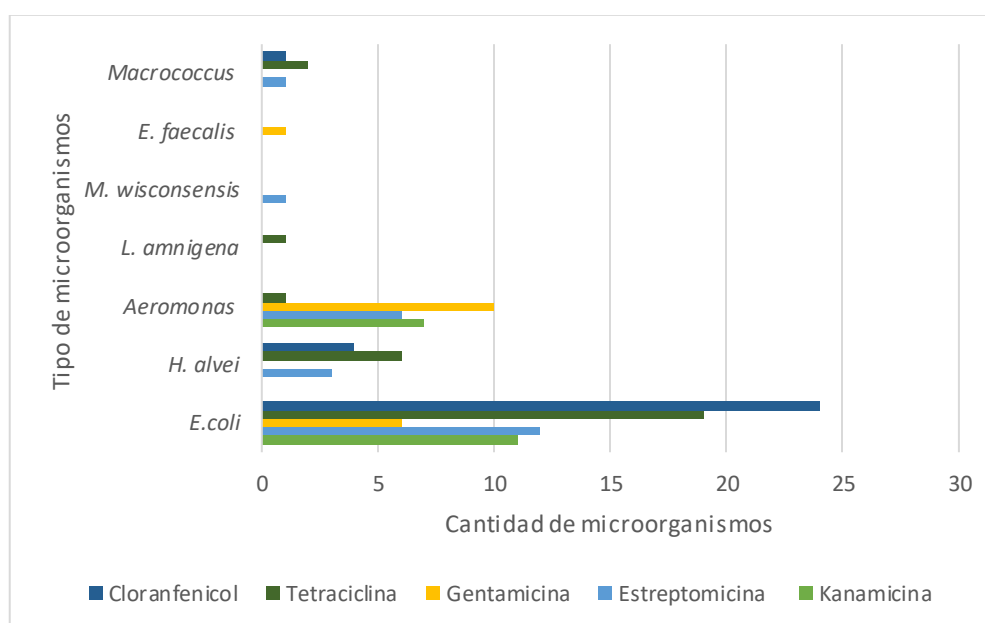


Figura 21. Distribución de los microorganismos resistentes a los antibióticos evaluados en las tres muestras analizadas.

En la figura 21, se puede observar que *E. coli* es el microorganismo que mayor número de aislamientos e incidencia tuvo en las tres muestras analizadas además de ser el microorganismo que presentó una mayor resistencia a las sustancias antimicrobianas. La presencia de este microorganismo es sumamente amplia, por lo que es un patógeno que debe vigilarse y tomarse en cuenta en este tipo de matrices alimentarias. Aunque la resistencia antimicrobiana que desarrollaron es de importancia en el sector salud se requiere

conocer si este microorganismo no corresponde a patógeno de importancia clínica como pueden ser: *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC). Para la determinación de la patogenicidad que pudiera presentar los aislamientos que se realizaron de *E. coli* se tendría que llevar a cabo diferentes técnicas como son las pruebas serológicas o bien reacciones de PCR.

Por otro lado, con los datos experimentales se agruparon aquellos microorganismos que presentaron resistencia antimicrobiana para cada una de las sustancias evaluadas. Como se puede apreciar en la figura 22, con respecto a la tetraciclina y al cloranfenicol se obtuvo la misma cantidad de microorganismos resistentes y para el caso de los aminoglucósidos empleados (kanamicina, gentamicina y estreptomicina), la cantidad de microorganismos resistentes fue menor que a los dos primeros antibióticos.

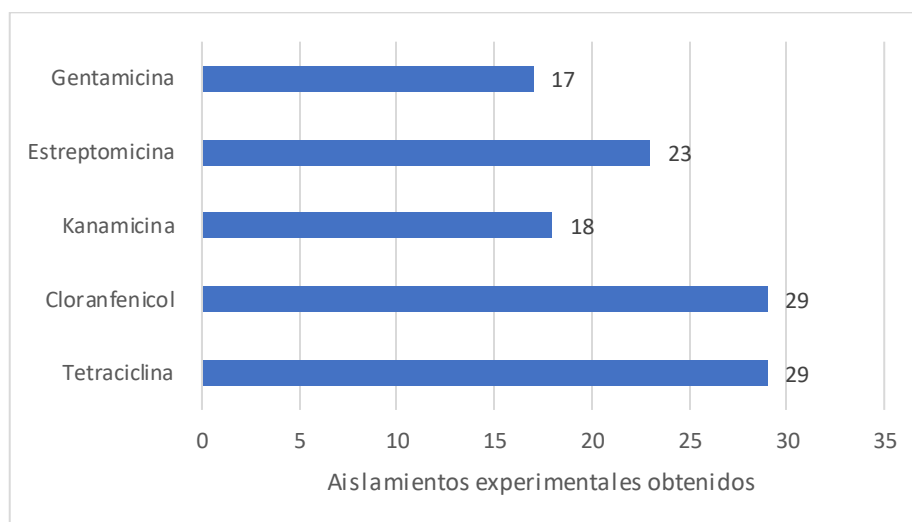


Figura 22. Distribución de los microorganismos aislados resistentes a los antibióticos evaluados.

Sin embargo, se optó por llevar a cabo un análisis estadístico para determinar si existe una diferencia entre los antibióticos kanamicina, gentamicina y estreptomicina o bien, no existe una diferencia significativa y por lo tanto la resistencia antimicrobiana para estos tres aminoglucósidos es la misma. Tal y como se presenta en la tabla 9, se calculó el valor de la chi cuadrada con un nivel de significancia del 5%, en este caso la hipótesis nula que se estableció es

que no existe una diferencia de resistencia antimicrobiana entre los tres antibióticos que pertenecen al grupo de los aminoglucósidos y la hipótesis alterna fue que si existía una diferencia de resistencia antimicrobiana entre estos tres antibióticos.

Tabla 9. Tabla de contingencia para los resultados experimentales obtenidos de los antibióticos aminoglucósidos.

Microorganismo	Kanamicina	Gentamicina	Estreptomicina	Total
<i>E. coli</i>	11	12	6	29
<i>H. alvie</i>	0	3	0	3
<i>Aeromonas</i>	7	6	10	23
<i>L. amnigena</i>	0	0	0	0
<i>M. wisconsensis</i>	0	1	0	1
<i>E. faecalis</i>	0	0	1	1
<i>Macrococcus</i>	0	1	0	1
Total	18	23	17	58
Grados de libertad	12	$x^2_{calculada}$		13.9
		x^2_{tabla}		18.3

Con estos resultados obtenidos, se tiene que la $x^2_{calculada} < x^2_{tabla}$ y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que no existe una diferencia entre estos tres antibióticos y se puede concluir que no existe una mayor o menor resistencia antimicrobiana que presentan los microorganismos aislados en las tres muestras cárnicas hacia los aminoglucósidos.

Capítulo 8. Conclusiones

En este proyecto se llevó a cabo el aislamiento de bacterias resistentes a sustancias antimicrobianas a partir de una propuesta experimental constituido de cuatro etapas, el cual se basa en normas y estándares internacionales. Es importante destacar que durante el proceso se llevaron modificaciones a este para finalmente obtener los resultados deseados. Al llevar a cabo el análisis de 3 diferentes productos cárnicos (hígado de res, vísceras de res y mollejas de pollo) se pudo aislar bacterias resistentes a sustancias antimicrobianas, en este caso a los antibióticos evaluados: tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, gentamicina y estreptomycin. La implementación del equipo analizador MALDI-TOF biotyper resulto ser una herramienta clave para la identificación microbiana de los aislamientos obtenidos, ya que la identificación microbiana se llevó rápidamente en comparación con los métodos convencionales como es el caso de las pruebas bioquímicas.

En relación con los resultados experimentales obtenidos se aisló en mayor proporción a *Escherichia coli* con un porcentaje de 62%, al género *Aeromonas* con un 21% (de las cuales se aislaron las especies *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. eucrenophila* y *Aeromonas* sp.), *Hafnia alvei* el 11%, *Macrocooccus* (*M. caseolyticus* y *M. canis*) el 3% y *Lelliottia amnigena*, *Moellerella wisconsensis* y *Enterococcus faecalis* el 1%. Es importante destacar que la muestra de vísceras de res fue la muestra en la que se aisló una mayor cantidad de microorganismos debido a que en la parte muestreada (el intestino) se encuentra la mayor diversidad y cantidad de microorganismos.

Del análisis de resultados se destacó que la mayoría de los microorganismos aislados presentan una patogenicidad hacia los humanos, por lo que la presencia de estos en las tres muestras cárnicas genera una controversia sobre la diseminación de resistencia antimicrobiana. En este proyecto no se determinó la patogenicidad de los microorganismos aislados e identificados, sin embargo, como propuesta experimental se recomienda llevar a cabo la determinación de la patogenicidad de estos microorganismos.

Como bien se mencionó en el presente trabajo, la microbiota de la carne está en función de diferentes factores como son los intrínsecos, los que provienen del

mismo animal y los extrínsecos, que están mediados por el proceso de obtención, así como las instalaciones (el ambiente) en las que se lleva a cabo la matanza y el faenado.

Una de las repercusiones que puede tener un alimento cárnico contaminado de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas es que podría generar infecciones en los consumidores, las cuales pueden ser difíciles de eliminar, además de que son un vehículo para la diseminación de la RAM. Además, es importante mencionar que el uso de antibióticos como herramienta en la eliminación de aquellos microorganismos causantes de enfermedades, en una dosis inadecuada puede contribuir al desarrollo de la resistencia antimicrobiana.

La presencia de microorganismos que tienen la capacidad de generar un daño en los hospederos además de que estos presenten resistencia antimicrobiana es un tema a considerar y de prioridad alta, ya que hoy en día la acción de las sustancias antimicrobianas, tales como los antibióticos, ponen en juicio su efectividad contra las infecciones y además genera una preocupación en el sector salud ya que los métodos para su eliminación son cada vez menores.

El aumento de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por estos microorganismos y las pocas sustancias antimicrobianas que son capaces de eliminarlos hace que hoy en día en el sector de la medicina y otros como son la farmacéutica, química, entre otras, sintetizen nuevas generaciones de fármacos que sean capaz de eliminarlos, sin embargo las mejores acciones que se pueden tomar en relación a los alimentos es realizando campañas dentro de aquellas fábricas en donde se elaboran productos cárnicos para poder detener su propagación, como lo son el uso adecuado de los antibióticos en los animales destinados para el consumo humano, la sanidad en los establos, zonas de desarrollo de estos animales y de los centros donde se lleva a cabo el proceso de obtención de la carne, y claramente una correcta implementación de regulaciones y normas con el objetivo de que los consumidores dispongan de alimentos inocuos.

La importancia de llevar a cabo este proyecto es conocer el gran problema actual que se tiene con respecto a la resistencia antimicrobiana en relación con los alimentos cárnicos. La evolución de los microorganismos y su adaptación al medio ambiente genera una gran preocupación cuando estos generan una resistencia antimicrobiana. No solo el sector salud se ve comprometido en esta situación, sino que el sector alimentario se puede ver afectado por la presencia de alimentos contaminados por microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas y esto puede generar problemas no solo en la salud de los consumidores como bien se mencionó, sino que también puede generar problemas económicos al tener que intervenir en retirar productos del anaquel, la generación de nuevos fármacos, el material y equipo que se requiere para su detección.

En relación con la seguridad alimentaria de la carne se debe de disponer de productos inocuos, con condiciones higiénicas, así como su distribución sea equitativa, por lo que se debe tomar acción por parte de organizaciones gubernamentales e internacionales para que se cuente con alimentos de calidad y que además estos no generen un daño en la salud de los consumidores. Finalmente se invita a realizar más investigaciones relacionadas a este tema para contribuir con nueva información y con esto pueda generar más acciones para detener la propagación de los microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, T., Braun, P., Saffaf, J., & Wiacek, C. (2021). Physical Methods for the Decontamination of Meat Surfaces. *Current Clinical Microbiology Reports*, 8-20.
- Ali, L., Ullah, M., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.-L., & Yu, D. (2017). Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-19.
- Aller, A.I., Castro, C., Medina, M., González, M., . . . Martín-Manzuelos, E. (2009). Isolation of *Moellerella wisconsensis* from blood culture from a patient with acute cholecystitis. *Clinical Microbiology and Infection*, 1193-1194.
- Austin, J. (2014). *Clostridium botulinum* and Botulism. En C. Devine, & M. Dikeman, *Encyclopedia of Meat Sciences*. Londres: Elsevier, 330-334.
- BANSS . (s.f.). *Bovino. Rutina de trabajo desollado* . Obtenido de BANSS New Meat Technologies Web site : <https://banss.de/es/bovino/#desollado>
- Bastos, R., Felix de Oliveira, W., Santa Clara, D., Dos Santos, M., Matoso, E., & Breitenbach, L. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, 81-94.
- Bilskah, A. (2015). Organización de lavado y desinfección durante el proceso de producción en la industria cárnica. *Industria Cárnica*, 8-27.
- BIOMERIEUX. (s.f.). *Etest. Tiras de antibiograma listas para su uso para determinar gradiente de MICs*. Obtenido de biomerieux.es: <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/etest>
- Birk, T., Fuentes, M., Aabo, S., & Jensen, L. (2020). Horizontal transmission of antimicrobial resistance genes from *E.coli* to *Serratia* spp. in minced meat using a gfp tagged. *Research in Veterinary Science*, 481-484.
- Bloomfield, S., Zomer, A., Justin, O., Kay, G., Wain, J., Janecko, N., Mather, A. (2022). Determination and quantification of microbial communities and

antimicrobial resistance on food through host DNA-depleted metagenomics. *Food Microbiology*, 1-12.

Butaye, P., Argudín, M., & Threlfall, J. (2015). Introduction to Antimicrobial-Resistant Foodborne Pathogens. En C. Chen, X. Yan, & C. Jackson, *Antimicrobial Resistance and Food Safety. Methods and Techniques*. Estados Unidos : Academic Press, 1-17.

Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 44-52.

CDC. (29 de Marzo de 2018). *Seguridad Alimentaria, Microbios y enfermedades transmitidas por los alimentos*. Obtenido de Centros para el control y la prevención de Enfermedades: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>

CDC. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States* . Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services .

CDC. (07 de Diciembre de 2021). *CDC Actions to Prevent the Spread of Antibiotic Resistance in Enteric Bacteria*. Obtenido de Center of disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/arx-enteric-fact-sheet-508.pdf>

CDC. (7 de Diciembre de 2021). *La resistencia a los antibióticos, los alimentos y los animales de producción* . Obtenido de Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades Web site : <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/challenges/antibiotic-resistance.html>

Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría*, 214-217.

Chaudhari, R., Singh, K., & Kodgire, P. (2022). Biochemical and Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Salmonella spp. *Research in Microbiology*, 1-60.

Chen, C.-Y., Yan, X., & Jackson, C. (2015). Application of Metagenomic Technologies for Antimicrobial Resistance and Food Safety Research and Beyond. En C. Chen, X. Yan, & C. Jackson, *Antimicrobial Resistance and*

Food Safety. Methods and Techniques. Wyndmoor: Academic Press, 401-422.

Clinical and Laboratory Standards Institute . (2022). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* . Estados Unidos : CLSI.

Codex Alimentarius . (2005). *CÓDIGO DE Prácticas para reducir al mínimo y contener la resistencia a los antimicrobianos CAC/RCP61-2005*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura Web site : https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B61-2005%252FCXP_061s.pdf

Codex Alimentarius. (2011). *Directrices para el análisis de riesgos de resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos CAC/GL 77-2011*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Codex Alimentarius. (s.f.). *Resistencia a los antimicrobianos* . Obtenido de FAO web site : https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/antimicrobial-resistance/es/?page=1&ipp=3&no_cache=1#:~:text=El%20papel%20del%20Codex%20en%20relaci%C3%B3n%20con%20la%20resistencia%20a%20los%20antimicrobianos&text=Cuando%20las%20personas%20ingeren%20

COFEPRIS. (06 de Julio de 2018). *Estrategia Nacional de Accion contra la Resistencia a los antimicrobianos en México*. Obtenido de Gobierno de México Web site : <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/estrategia-nacional-de-accion-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-en-mexico>

Consejo de Salubridad General . (05 de Junio de 2018). *ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos*. Obtenido de Diario Oficial de la Federación :

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018

Consejo Mexicano de la Carne . (2018). *Compendio Estadístico 2018*. Obtenido de [comercarne.org: https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadi%CC%81stico-2018-VF.pdf](https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadi%CC%81stico-2018-VF.pdf)

Consejo Mexicano de la Carne. (Noviembre de 2022). *Compendio Estadístico 2022*. Obtenido de [comecarne.org: https://comecarne.org/wp-content/uploads/2022/05/compendio_estadistico_2022.pdf](https://comecarne.org/wp-content/uploads/2022/05/compendio_estadistico_2022.pdf)

Contreras, M., Medrano, J., Ibarra, J., Martínez, J., Chaidez, Q., & Castro, N. (2019). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista bio ciencias*, https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33802019000200101&script=sci_arttext&tlng=es.

Coque, M. T. (2005). Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 251-253.

Darnell, R., Paxie, O., Todd, F., & Morris, S. (2022). Antimicrobial tolerance and its role in the development of resistance: Lessons from enterococci. *Advances in Microbial Physiology*, 1-41.

FAO. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents>

Fernandes, R. (2009). *Microbiology Handbook Meat Products*. Cambridge: Leatherhead Food International Ltd.

Goel, N., Fatima, S., Kumar, S., Sinha, R., & Khare, S. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potencial source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*, 1-8.

González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., & Domínguez, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibioticos. *Revista Médica de Chile*, 619-629.

- Holmes, A., Moore, L., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., . . . Piddock, L. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 1-12.
- Instituto Nacional de Salud Pública . (26 de Agosto de 2020). *Resistencia Antimicrobiana* . Obtenido de Gobierno de México Web site : <https://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-publica/investigacion/resistencia-antimicrobiana.html>
- Jost, G., Schwendener, S., Liassine, N., & Perreten, V. (2021). Methicillin-resistant *Micrococcus canis* in a human wound. *Infection, Genetics and Evolution*, 1-3.
- Kostrzewa, M., & Pranada, A. (2016). Future Applications of MALDI-TOF MS in Microbiology. En R. Cramer, *Advances in MALDI and Laser-Indiced Soft Ionization Mass Spectrometry*. Berkshire: Springer, 232-236.
- Kraft, A. (1986). *Meat Microbiology*. Orlando: Academic Press.
- Kumar, P. (2017). Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy . En F. Dowd, B. Johnson, & A. Mariotti, *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. Nebraska: Elsevier, 457-487.
- Leroy, A.-G., Malandain, D., Duchalais, E., Meurette, G., & Corvec, S. (2016). Accurate MALDI-TOF mass spectrometry identification of a colistin-resistant *Moellerella wisconsensis* strain. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 233-235.
- Lonergan, S., Topel, D., & Marple, D. (2019). Meat microbiology and safety. En S. Lonergan, D. Topel, & D. Marple, *The Science of Animal Growth and Meat Technology* (Segunda ed.). Estados Unidos: Academic Press, 183-204.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14 ed.). Estados Unidos: Pearson Educación .
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio* , 35-45.

- March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 182-188.
- Martín, J., Asenjo, M., & Dueñas, J. (2018). Pionefrosis por *Lelliottia amnigena*. *Medicina Clínica*, 419-420.
- Monroy, R., Linares, B., & Ramírez, X. (2015). Desarrollo de una técnica para la detección in vitro de la presencia de antibióticos en muestras de hígado de res, cerdo y pollo. *CienciaUAT*, 68-73.
- National Human Genome Research Institute. (s.f.). *Metagenómica*. Obtenido de genome.gov: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Metagenomica>
- OMS. (13 de Octubre de 2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud Web site : <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OPS. (2019). *Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022* (Octava ed.). Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud Web site .
- OPS. (s.f.). *Resistencia Antimicrobiana en Producción Animal*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud Web site : <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20la%20resistencia%20a,%2C%20bacterias%2C%20hongos%20y%20par%C3%A1sitos>.
- Osei, R., Yang, C., Cui, L., Ma, T., Li, Z., Boamah, & Solomon. (2022). Isolation, identification, and pathogenicity of *Lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. *Microbial Pathogenesis*, 1-6.
- Persson, S., Al-Shuweli, S., Yapici, S., Jensen, J., & Olsen, K. (2014). Identification of Clinical *Aeromonas* Species by *rpoB* and *gyrB* Sequencing and Development of a Multiplex PCR Method for Detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *Journal of Clinical Microbiology*, 653-656.

- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A., Sulaiman, A., Chee, J., Laksmanan, M., . . . Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* , 1-18.
- Qu, F., Wang, W., Liu, Q., Zhoi, H., Hu, J., Du, X., . . . Meng, S. (2022). Genetic Diversity, Antibiotic Resistance, and Pathogenicity of *Aeromonas* Species from Food Products in Shanghai, China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 842-853.
- Ramos, G. L., Vigoder, H. C., & Nascimento, J. S. (2021). Technological Applications of *Macroccoccus caseolyticus* and its Impact on Food Safety. *Current Microbiology*, 11-16.
- Ramos, J. (2020). Microbiología de *Hafnia alvei*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1-6.
- Rehman, K., Jabeen, K., Ali Chohan, T., & Hamid, M. (2019). Databases, multiplexed PCR, and next-generation sequencing technologies for tracking AMR genes in the environment. En M. Zaffar, *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*. Pakistan: Elsevier, 223-233.
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 482-501.
- Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2020). *Escherichia coli* . En I. Samanta, & S. Bandyopadhyay, *Antimicrobial Resistance in Agriculture*. Kolkata: Academic Press, 171-193.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (18 de Agosto de 2017). *¿Conoces el proceso del ganado dentro de un Rastro TIF?* Obtenido de Gobierno de México Web site : <https://www.gob.mx/firco/es/articulos/conoces-el-proceso-del-ganado-dentro-de-un-rastro-tif?idiom=es>
- Secretaría de Salud . (26 de Junio de 2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores.*

Determinación de microorganismos patógenos. Obtenido de Diario Oficial de la Federación Web site: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015

Secretaría de Salud. (18 de Septiembre de 2004). *NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.* Obtenido de [salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx): <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/194ssa104.html#:~:text=1.1%20Esta%20Norma%20Oficial%20Mexicana,y%20expendio%20de%20sus%20productos>.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (11 de Octubre de 2016). *Más de 57 por ciento de la carne que se sacrifica en México proviene de establecimientos Tipo Inspección Federal.* Obtenido de Gobierno de México Web site: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/mas-de-57-por-ciento-de-la-carne-que-se-sacrifica-en-mexico-proviene-de-establecimientos-tipo-inspeccion-federal?idiom=es>

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 116-129.

Tenover, F. (2019). Antibiotic Susceptibility Testing. En M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology*. Estados Unidos : Academic Press, 166-176.

Uddin, T., Chakraborty, A., Khusro, A., Zidan, R., Mitra, S., Emran, T., . . . Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 1-17.

Upmanyu, N., & Malviya, V. (2020). Antibiotics: mechanisms of action and modern challenges. En P. Chowdhary, A. Raj, D. Verma, & Y. Akhter, *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. Amsterdam: Elsevier, 367-382.

- Uribe, P. (2014). *Análisis comparativo de islas de resistencia en los genomas de las cepas multiresistentes de Acinetobacter baumannii, Acinetobacter nosocomialis y Acinetobacter pittii aislados en Colombia*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia : <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/52134/1019017241.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, J., & Gu, D. (2021). Determination of Antimicrobial Resistance of Salmonella in Pork. En J. Walker, *Methods in Molecular Biology*. Springer, 179-186.
- Yu, L., Liu, Y., Liu, M., Li, Z., Li, L., & Wang, F. (2022). Research Note: Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence gene analysis of Enterococcus faecalis in poultry in Tai'an, China. *Poultry Science*, 1-4.