



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**“CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE CANALES DE
POLLO OBTENIDAS DE RASTRO, MERCADOS PÚBLICOS Y SUPERMERCADOS POR
MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

PERLA MARLEN RAMÍREZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. CECILIA ROSARIO CORTÉS

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

Facultad de Medicina UNAM

DRA. MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi papá, porque siempre estas cuando te necesito, por ser además de un gran padre, un gran amigo.

A mi mamá, por enseñarme a superar todos los obstáculos de la vida y por demostrarme que a pesar de la distancia siempre voy a contar contigo.

A mis hermanos, Katia y Antonio, no hay mejores hermanos que ustedes, son un gran ejemplo en mi vida.

Los quiero mucho.

A ti Carlos, por la vida que estamos construyendo, por esas palabras de aliento que siempre me das cuando me siento perdida, por las risas de todos los días, por ese apoyo incondicional, por impulsarme a superarme y creer en mi...por ser el amor de mi vida. Te amo. Lo logré!!!!

A Dios, por la familia y la vida que tengo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mi tutora la Dra. Cecilia Rosario Cortes, por permitirme trabajar con ella en este gran proyecto el cual disfrute y aprendí mucho durante su realización. Por los comentarios en mi trabajo y el apoyo que siempre recibí.

A la Dra. María del Pilar Castañeda Serrano por formar parte de mi comité tutorial, por todo el apoyo y confianza que siempre me mostró. Gracias por toda su ayuda, por su amistad y consejos; es un gran ejemplo para el gremio y un ejemplo a seguir.

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, gracias por sus valiosos consejos y apoyo en todo momento.

A los miembros del jurado, Dra. Rosario Morales Espinosa, Dr. Ángel Hipolito Manjarrez Hernández, Dr. José Fernando Núñez Espinosa y al Dr. Guillermo Valdivia Anda, por enriquecer mi trabajo con sus comentarios y sugerencias.

Al departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ, al laboratorio de bacteriología especialmente a Martín y Mary.

Al departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, Al Dr. Armando Navarro Ocaña por abrirme las puertas de su laboratorio y por todos sus comentarios. Un agradecimiento muy especial a Delia Licona por su ayuda en la extracción de ADN y PRC pero sobre todo por ofrecerme su amistad y por esas pláticas en las tardes mientras trabajábamos, y a Luis y Gabriel por el apoyo. De verdad disfrute trabajar en el laboratorio, aprendí mucho y conocí personas increíbles.

RESUMEN

Debido a que la carne de pollo es el producto de origen animal con mayor demanda en nuestro país es relevante poder definir la importancia epidemiológica que tiene el pollo en la transmisión de patógenos, por tal motivo, este estudio se realizó para evaluar la calidad microbiológica de las canales de pollo del rastro y puntos de venta (supermercados y mercados públicos) utilizando como modelo de estudio a *Escherichia coli*. Se utilizaron 30 canales de pollo evisceradas de las cuales 10 fueron de un rastro TIF, 10 de 3 mercados públicos y 10 de 3 supermercados del Estado de Querétaro. Se realizó el lavado de las canales y a partir de este se hizo el conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales; por otro lado, se aisló un total de 150 cepas de *E. coli*, las cuales se caracterizaron serológicamente, se hizo sensibilidad a 14 antibióticos. Se determinó la presencia de genes de virulencia (*eaeA*, *bfpA*, *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *aggR*, *aap*) de los 5 grupos diarreogénicos de *E. coli* y el grupo filogenético al que pertenecía cada aislamiento mediante la detección de los genes *chuA*, *yjajA* y TSPE4.C2 mediante PCR. Los resultados mostraron un promedio de mesófilos aerobios para canales de rastro de 5.604 UFC/ml log₁₀, supermercados de 6.004 UFC/ml log₁₀ y mercados públicos de 6.835 UFC/ml log₁₀. Para coliformes totales el promedio de UFC/ml log₁₀ de las canales de rastro fue de 4.817, supermercados de 4.732 UFC/ml log₁₀ y mercados públicos de 6.015 UFC/ml log₁₀. Tanto para mesófilos aerobios como para coliformes totales, las canales muestreadas en mercados públicos presentaron los valores más altos, a diferencia de rastro y supermercados en donde no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$). Los serogrupos más comunes fueron O8 (7.33%), O7 (6%), O48 (6%) y ONT (6%). Se identificaron 78 serotipos diferentes, siendo los más comunes O103:H21 (5.33%) y O11:H6 (5.33%). En la búsqueda de genes asociados a virulencia se identificaron los genes *stx2* (8/150) de los cuales 6 aislamientos se obtuvieron de canales de supermercados (A y B) y 2 cepas de una canal del mercado público (A), por otro lado, 6 cepas fueron positivas al gen *eaeA*, de las cuales 5 de ellas se aislaron de los tres mercados públicos y solo una se aisló del rastro TIF. El análisis de grupos filogenéticos mostró 109 (73%) cepas de los filotipos comensales A (48 [32%]) y B1 (61 [40.67%]), y 41 (27%) de los grupos virulentos o extraintestinales B2 (5 [3.33%]) y D (36 [24%]). Se identificó que todos los aislamientos fueron multiresistentes con resistencia a tilosina (100%), oxitetraciclina (97%), ácido nalidíxico (96%), doxiciclina (94%), enrofloxacina (91%), lincomicina (89%), norfloxacina (78%), ampicilina (75%), fosfomicina (70%), estreptomycin (47%), cefotaxime (41%), ceftriaxona (39%), cefuroxime (34%) y neomicina (28%). El estudio permitió identificar que existen problemas de manejo del pollo que favorecen la contaminación durante el procesamiento y en los puntos de venta. La identificación de cepas multiresistentes con genes de virulencia, muestra el impacto epidemiológico del pollo en la transmisión de *E. coli* causante de diarrea

Palabras clave: calidad microbiológica, *Escherichia coli*, canales de pollo, mercado público, supermercado, rastro.

ABSTRACT

Since broiler meat is the most demanded animal product in Mexico, it is important to define its epidemiologic importance in the transmission of pathogens to humans, therefore, this experiment was conducted to evaluate microbiological quality of broiler carcasses purchased at from the processing plant and two retail poultry shops (supermarket and public market) using *Escherichia coli* as study model. Thirty broiler carcasses were used for the study; 10 from a TIF processing plant, 10 from 3 public markets and 10 from 3 supermarkets located at Queretaro and were rinsed in a phosphate buffered saline solution (PBS). Aerobic mesophiles and total coliforms counts were determined and 150 *E. coli* strains were recovered from the carcasses, and serotyped. The presence of virulence genes (*eaeA*, *bfpA*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *aggR*, *aap*) of the five diarrheagenic *E. coli* strains, and phylogenetic group was by detecting of the *chuA*, *yjajA* y TSPE4.C2 genes was determined by PCR. The results showed that to aerobic mesophiles from carcasses were 5.604 UFC/ml log₁₀ from processing plant, 6.004 UFC/ml log₁₀ from supermarket and 6.835 UFC/ml log₁₀ from public market. Regarding total coliforms, counts were 4.817 UFC/ml log₁₀ from processing plant, 4.732 UFC/ml log₁₀ from supermarket and 6.015 UFC/ml log₁₀ from public market. There was statistical difference (P<0.05) in mean counts which were higher in public market than the other two places. The most common serogroups were O8 (7.33%), O7 (6.0%), O48 (6.0%) and ONT (6.0%). Seventy-eight different serotypes were identified, the most common were O103:H21 (5.33%) and O11:H6 (5.33%). In the other hand, only *stx2* (8/150) and *eaeA* (6/150) were identified in this study. Regarding to phylogenetic groups it was established that 48 strains (32.0%) belonged to group A, 61 strains (40.67%) to group B1, 5 strains (3.33%) to group B2 and 36 strains (24.0%) to group D. All the isolates presented resistance to tylosin (100%) followed by oxytetracycline (96.67%), nalidixic acid (96%), doxycycline (94%), enrofloxacin (91.33%), lincomycin (88.67%), norfloxacin (78%), ampicilin (74.67%), fosfomicin (70%), streptomycin (47.33%), cefotaxime (40.67%), ceftriaxone (38.67%), cefuroxime (34%) y neomycin (28%). These results reveal an inappropriate handling of the carcasses during the slaughter and at the retail poultry shops, mainly in public markets where hygienic measures must be improved.

Keywords: microbiological quality, *Escherichia coli*, broiler carcasses, supermarket, public market, processing plant.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Calidad microbiológica de las canales de pollo.....	1
1.2 <i>Escherichia coli</i>	2
1.3 Serotipificación	4
1.4 Grupos filogenéticos	4
1.5 Resistencia antimicrobiana	6
1.6 <i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC).....	6
1.7 <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).....	8
1.8 <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	9
1.9 <i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	10
1.10 <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	10
2. ANTECEDENTES	11
3. GRUPOS DIARREOGÉNICOS PREDOMINANTES EN NUESTRO PAÍS	12
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo general	16
6.2 Objetivos particulares	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Obtención de muestras	17
7.2 Lavado de canales	17
7.3 Conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales	17
7.4 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	18
7.5 Identificación serológica.....	18
7.5.1 Preparación e identificación del antígeno somático	19
7.5.2 Preparación e identificación del antígeno flagelar.....	19
7.6 Extracción de ADN	20

7.7	Detección de genes asociados a virulencia	21
7.8	Identificación de grupos filogenéticos	21
7.9	Resistencia antimicrobiana	22
7.10	Análisis estadístico	23
8.	RESULTADOS	24
8.1	Calidad microbiológica de las canales de pollo	24
8.1.1	<i>Mesófilos aerobios</i>	24
8.1.2	<i>Coliformes totales</i>	24
8.2	Identificación serológica.....	25
8.3	Detección de genes asociados a virulencia	27
8.4	Grupos filogenéticos.....	27
8.5	Resistencia a antibióticos	27
9.	DISCUSIÓN	29
10.	CONCLUSIONES	38
11.	ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	39
12.	REFERENCIAS	41
13.	ANEXOS	51

LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Secuencia utilizadas para la amplificación de diferentes genes de virulencia asociados a los grupos diarreogénicos de <i>E. coli</i> .	51
Cuadro 2. Mezcla de reacción para la amplificación de genes de virulencia.	52
Cuadro 3. Condiciones del termociclador para cada PCR en la búsqueda de genes de virulencia y grupos filogenéticos.	52
Cuadro 4. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TSPE4.C2 para grupos filogenéticos.	53
Cuadro 5. Secuencia de iniciadores para la identificación de los grupos filogenéticos.	54
Cuadro 6. Serogrupos de <i>E. coli</i> obtenidos de canales muestreadas en rastro y puntos de venta.	55
Cuadro 7. Porcentaje total de serogrupos de <i>E. coli</i> obtenidos en el estudio sin considerar los puntos de muestreo.	56
Cuadro 8. Total de serotipos de <i>E. coli</i> aislados y su ocurrencia en canales de pollos.	57
Cuadro 9. Serogrupos encontrados por lugar de muestreo asociados a patotipos diarreogénicos de <i>E. coli</i> .	58
Cuadro 10. Resultados globales del análisis sobre el origen de las cepas de <i>E. coli</i> , grupos filogenéticos, serotipo y genes de virulencia.	59
Cuadro 11. Grupos filogenéticos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de canales de pollo de rastro, mercados públicos y supermercados.	60
Cuadro 12. Perfiles de resistencia de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de canales de pollo de rastro, mercados públicos y supermercados.	61

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Determinación de grupos filogenéticos en aislamientos de <i>E. coli</i> con la amplificación de los genes <i>chuA</i> , <i>yjajA</i> y un fragmento de DNA TSPE4.C2.	62
Figura 2. Promedio de mesófilos aerobios en canales de pollo de rastro y puntos de venta.	63
Figura 3. Promedio de mesófilos aerobios en canales de pollo en puntos de venta.	63
Figura 4. Promedio de coliformes totales en canales de pollo de rastro y puntos de venta.	64
Figura 5. Promedio de coliformes totales en canales de pollo en puntos de venta.	65
Figura 6. Amplificación de los genes <i>bfp</i> y <i>eaeA</i> .	65
Figura 7. Amplificación de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> .	66
Figura 8. Amplificación de los genes <i>aap</i> y <i>aggR</i> .	66
Figura 9. Amplificación de los genes <i>ipaH</i> .	67
Figura 10. Amplificación de los genes <i>lt</i> y <i>st</i> .	68
Figura 11. Porcentaje de los grupos filogenéticos de cepas aisladas de canales de pollo de rastro y puntos de venta.	68
Figura 12. Amplificación de los genes <i>chuA</i> , <i>yjajA</i> y TSPE4.C2 para las secuencias de los grupos filogenéticos.	69
Figura 13. Resistencia de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de canales de pollo de rastro y puntos de venta.	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Calidad microbiológica de las canales de pollo en México

La presencia de microorganismos patógenos durante la crianza y procesamiento de las aves, así como durante su transporte y comercialización son factores que favorecen la presencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA); las cuales constituyen uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (Richardson y Mead, 2001; Yun Lee *et al.*, 2009, Gonzales *et al.*, 2005); de hecho, la incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico sanitaria de los alimentos. La contaminación microbiana puede ocurrir durante el procesamiento de las canales de pollo en los rastros, como consecuencia de los procedimientos que se emplean. En cada etapa del proceso, existe la oportunidad para la contaminación de la canal por los microorganismos presentes en las instalaciones o por contaminación cruzada con otras aves (Arzú *et al.*, 2000).

Es importante destacar que en México, la comercialización del pollo en mercado público ocupa el 20% y en supermercado es del 15% (UNA, 2014). Durante el transporte de las canales de pollo a los diferentes puntos de venta y al llegar a estos lugares, la manipulación del producto muchas veces es inadecuada, además de que no se cumple con las medidas de higiene necesarias; no se conserva la cadena fría durante el transporte y venta del producto, lo que contribuye a deteriorar su calidad microbiológica, pues cabe destacar que no existe una normatividad que especifique las condiciones de higiene necesarias para su manipulación, transporte, conservación y venta del producto (Arzú *et al.*, 2000).

Como ya se ha mencionado, la seguridad microbiológica de los productos cárnicos es un problema de salud pública importante. En particular, los reportes de *Escherichia coli* como causa potencial de diarreas graves han aumentado (Yun Lee *et al.*, 2009). Las cepas diarrogénicas de *E. coli* en conjunto, son la principal causa de gastroenteritis en niños en países en vías de desarrollo y son

responsable del 30 al 40% de todos los casos de diarrea en niños (O'Ryan *et al.*, 2005; Parashar *et al.*, 2003). Aunque la mayoría de los productos cárnicos deben estar adecuadamente cocinados antes de su consumo, la presencia de *E. coli* en la carne pone a los consumidores en situación de riesgo, ya que puede ocurrir una contaminación cruzada de manos, utensilios o superficies a productos que no recibirán tratamientos térmicos antes de su consumo (Yun Lee *et al.*, 2009).

1.2 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, de la tribu *Escherichiae*. Para su comprensión se ha clasificado en tres grupos de importancia biológica para el humano: cepas comensales, cepas intestinales y cepas extraintestinales (Croxen y Finlay, 2010; Russo y Johnson, 2000). Es un habitante normal de la biota intestinal de animales, incluyendo el humano. Por lo que, se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y el agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto directo durante la preparación de los alimentos (Arzú *et al.*, 2000). Es por esto que se utiliza como el principal indicador sanitario para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y alimentos. La NOM-194-SSA1-2004 es el único instrumento para verificar la inocuidad de la carne de pollo en México y se limita a inspeccionar *E. coli* como microorganismo indicador de contaminación fecal, con un límite máximo permisible de 1000 UFC/g en carne refrigerada y 5000 UFC/g en carne molida refrigerada.

Existen diversas clonas de *E. coli* que han adquirido atributos específicos de virulencia, los cuales le confieren la habilidad de adaptarse a nuevos nichos, permitiéndole causar un amplio espectro de enfermedades. Esta persistencia exitosa de las combinaciones de factores génicos relacionados con virulencia, han llevado a la clasificación de *E. coli* en patotipos específicos o categorías que son

capaces de causar enfermedades intestinales y extraintestinales; tales como diarrea, infecciones del tracto urinario, septicemia y meningitis neonatal (Kaper *et al.*, 2004; Clermont *et al.*, 2011; Escobar-Páramo *et al.*, 2004).

Muchas cepas de *E. coli* son comensales; sin embargo, algunas de ellas poseen genes de virulencia que causan infecciones entéricas que afectan a humanos y animales (Bagheri *et al.*, 2014). Los genes de virulencia se localizan generalmente en plásmidos, islas de patogenicidad y fagos, que son altamente intercambiables entre las cepas bacterianas a través de transferencia horizontal (Hacker y Kaper, 2000; Escobar-Páramo *et al.*, 2004). *E. coli* es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, se ha reportado su participación en cerca del 50% de las infecciones de las vías urinarias (UTI por sus siglas en inglés, Urinary tract infection) intrahospitalarias y en el 90% de las infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios (Hernández *et al.*, 2011). Esta gran diversidad de hábitats se logra a través del alto grado de plasticidad en su genoma, con pérdida y ganancia de genes mediante transferencia horizontal (Clermont *et al.*, 2011; Rasko *et al.*, 2008).

Se han descrito cepas de *E. coli* patógenas, que han adquirido factores de virulencia que tienen la habilidad de causar diarreas en humanos. Estos patotipos se clasifican en al menos cinco grupos basados en sus rasgos de virulencia (López-Saucedo *et al.*, 2003; Nataro y Kaper, 1998) como Enterotoxigénica (ETEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC) y Enterohemorrágica (EHEC) (Nataro y Kaper, 1998). Cada uno de ellos, posee factores de virulencia particulares y ocasionan síndromes clínicos de diferente severidad. (Kaper *et al.*, 2004).

1.3 Serotipificación

La serotipificación es una herramienta útil para la diferenciación de cepas patógenas y no patógenas, así como el desarrollo de investigaciones epidemiológicas. A partir de 1947, Kauffmann propone clasificar las cepas de *E. coli* de acuerdo a los antígenos superficiales, somático (O), capsular (K) y flagelar (H). El antígeno somático "O" determina el serogrupo y su combinación con el flagelar (O:H) se denomina serotipo; que en ocasiones coincide con un cuadro clínico en particular. De acuerdo al origen de los aislamientos, los serotipos pueden dividirse en dos grupos; serotipos asociados a enfermedades diarreogénicas y serotipos de enfermedades extraintestinales (Orskov y Orskov, 1984; Orskov y Orskov, 1992). La técnica de serotipificación para la determinación del antígeno somático está basada en la aglutinación (Orskov y Orskov, 1992). La especificidad serológica del antígeno somático (O) se basa en la compleja estructura de la cadena lateral de polisacáridos del lipopolisacarido (LPS). Actualmente se conocen un total de 187 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares (Nataro *et al.*, 1998).

1.4 Grupos Filogenéticos

Herzer *et al.* (1990) desarrollaron un sistema de clasificación basado en el análisis de los patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas metabólicas de la estructura poblacional de una colección de 72 cepas de referencia de *E. coli* de diversos orígenes. Los análisis filogenéticos de esta colección revelaron 4 grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2 y D además de dos grupos accesorios denominados C y E. Estudios de bibliotecas genómicas realizados en cepas pertenecientes a los diferentes grupos filogenéticos pusieron en evidencia genes o fragmentos de DNA específicos de cada grupo, sugiriendo así, su uso como marcadores moleculares de cada uno de los grupos filogenéticos existentes. Con base en estos estudios, Clermont *et al.*, (2000) desarrollaron una técnica de

detección de los grupos filogenéticos de *E. coli*, basada en la presencia o ausencia de los genes, *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica) y *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, con función desconocida) y un fragmento de DNA llamado TSPE.C2 (Clermont *et al.*, 2000).

Los grupos filogenéticos presentan diferencias, las cuales están influenciadas por fronteras geográficas, factores dietéticos, el uso de antibióticos y su resistencia, así como la capacidad para aprovechar diferentes fuentes de azúcares, nichos ecológicos y el clima (Duriez *et al.*, 2001). En general se considera que las cepas virulentas extraintestinales pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor medida el grupo D. Mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A (Clermont *et al.*, 2000). Por otro lado, el grupo B2 se reporta como el grupo filogenético más ancestral, seguido por el grupo D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004; Herzer *et al.*, 1990). Por otro lado, En un estudio realizado por Escobar-Páramo *et al.* (2004) encontraron que las cepas típicas de EPEC, se distribuyen en los grupos B1 y B2; las cepas EHEC en los grupos A y B1, y el serotipo O157:H7 en el grupo E. El grupo ETEC se encuentran en los grupos A, B1 y C, mientras que el grupo de EAEC en todos los grupos filogenéticos, excepto en el grupo E (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Las patovariedades vinculadas a diarreas crónicas y leves como es el caso de EPEC y EAEC se distribuyen en todos los grupos filogenéticos. Por otro lado, las cepas ExPEC se encuentran agrupadas principalmente en el grupo B2, pero algunas cepas se localizan en el grupo D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004). Diversos estudios filogenéticos indican que las cepas de STEC y EHEC caen dentro de los grupos filogenéticos A, B1 y D (Bidet *et al.*, 2005, Escobar-Paramo *et al.*, 2004, Donnenberg y Whittam, 2001).

1.5 Resistencia antimicrobiana

Las bacterias con resistencia antimicrobiana presentes en los alimentos pueden ser un reservorio de genes de resistencia transferibles a bacterias patógenas y comensales presentes en el tracto digestivo del humano. El uso de agentes antimicrobianos en cualquier lugar, como en el caso de medicina terapéutica tanto en humanos como en veterinaria, o como promotores del crecimiento, ejerce una presión selectiva favorable para la propagación de bacterias con resistencia antimicrobiana (Schroeder *et al.*, 2003, Álvarez-Fernández *et al.*, 2013).

1.6 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)

EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, pues afecta a niños menores de 2 años de edad. Una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir con diversos grados de intensidad (Aktan *et al.*, 2004, Vidal *et al.*, 2007). En la actualidad los casos de diarrea por estas cepas en países industrializados son poco frecuentes, sin embargo, en los últimos años se han reportado varios brotes en diferentes países, principalmente en guarderías y otros centros de atención a niños. En los países en desarrollo, la incidencia de diarrea producida por EPEC sigue siendo alta. Diferentes estudios realizados en México, Brasil, y África del Sur refieren que entre 30 y 40% de los casos de diarrea puede ser atribuido a cepas EPEC (Vidal *et al.*, 2007).

Las cepas EPEC inducen una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) la cual se lleva a cabo mediante la degeneración de las microvellosidades y la alteración morfológica normal de la región apical del enterocito. El modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases; adherencia inicial, inyección de factores, transducción de señales y contacto íntimo (Kaper *et al.*, 2004, Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.*, 2007).

La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis, se pueden distinguir dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias a la célula del huésped. La adherencia inicial está relacionada con los BFP (bundle forming pilus) cuya información genética está codificada en el plásmido EAF. Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante el sistema de secreción tipo III (SSTT), entre las que se encuentra Tir. La mayor parte de estas proteínas está codificada en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad conocida como LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.*, 2007).

La inyección de Tir en el citosol es un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. Una vez en el citosol, un fragmento central de Tir se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, con lo que expone hacia el espacio extracelular un fragmento conocido como TIBA (área de unión a intimina), con el que se une a la proteína de membrana externa de EPEC llamada intimina (Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.*, 2007).

La última etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del huésped, así como la formación de los pedestales de actina. Tras la unión de Tir con intimina, todas estas proteínas activadas atraen la polimerización de actina hacia la zona donde está Tir fosforilada, lo que inicia la reorganización del citoesqueleto. Los pedestales se forman por debajo de donde está adherida la bacteria y se componen sobre todo de actina polimerizada. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final, a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Nataro y Kaper, 1998; Vidal *et al.*, 2007).

1.7 *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)

Se estima que ETEC causa 400 millones de casos y 700 mil muertes al año en todo el mundo en niños menores de 5 años. El principal vehículo de transmisión es el agua y los alimentos (Estrada-García *et al.*, 2002). Estas cepas son causa importante de diarrea infantil en países en desarrollo y es la principal causa de la diarrea del viajero. En México, se ha aislado hasta en 70% de los casos y su desarrollo se relaciona con zonas donde la higiene es precaria; así mismo, en el ámbito mundial es la categoría de mayor aislamiento (Bravo, 2007). Coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y elabora enterotoxinas que dan lugar a la secreción intestinal. Su virulencia incluye la adherencia al epitelio intestinal por factores de colonización (CFA) y la elaboración de las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) (Bravo, 2007, Kaper *et al.*, 2004, Shaheed *et al.*, 2009). Éstas actúan incrementando los niveles de Adenosina-5'- (AMPc) y Guanosina-5'- monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente; esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002). LT es semejante en estructura y función a la toxina causante del cólera (CT) producida por *Vibrio cholerae* O1. Los genes que codifican para la expresión de LT se localizan en plásmidos que también pueden tener los genes que codifican ST y los antígenos del factor de colonización (CFAs). La enterotoxina Sta descrita también como ST-I es producida tanto por cepas ETEC como por otras bacterias Gram negativas. Sin embargo STb, la otra variedad de esta enterotoxina, solo es elaborada por cepas ETEC. Con respecto a la enterotoxina STb, se le ha relacionado principalmente con cepas ETEC aisladas de cerdos, aunque se ha identificado también en cepas de origen humano (Bravo, 2007, Shaheed *et al.*, 2009).

1.8 *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Es el agente causante de los brotes de gastroenteritis grave en los países en desarrollo. En América del Norte, Japón y partes de Europa, la mayoría de los brotes de gastroenteritis por EHEC se deben al serotipo O157:H7, mientras que otros serotipos son de importancia médica en países en desarrollo. El ganado vacuno es el principal reservorio de EHEC, en humanos coloniza la parte distal del íleon y el intestino grueso. La transmisión a los seres humanos por lo general ocurre a través del alimento y agua contaminada. La infección por EHEC puede causar síntomas como colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (Aktan *et al.*, 2004, Kaper *et al.*, 2004, Giammanco *et al.*, 2002).

Al igual que las cepas EPEC, EHEC también producen lesiones del tipo de “adherencia y esfacelamiento”, además sintetiza dos citotoxinas, toxina Shiga-like I y II, que producen la lisis en cultivo celular. Los genes de estas toxinas se encuentran codificados en bacteriófagos. Se ha reportado que la estructura de estas toxinas es similar a la LT de las cepas ETEC y su mecanismo de acción es a nivel de la síntesis de proteínas. Además, poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para la enterohemolisina (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002). Stx1 es idéntica a Stx de *Shigella dysenteriae*. Otros factores que contribuyen a la virulencia son la Intimina (gen *eaeA*) proteína de membrana externa; y al hemolisina EHEC (gen *hlyA*) que actúa como una citolisina formadora de poros causando daño celular. Los serogrupos involucrados más comunes son: O26, O111, O121, O145 y particularmente O157. Hasta el momento no existen reportes de cuadros de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico en nuestro país relacionados con el aislamiento de *E. coli* O157:H7 o algún otro serotipo EHEC (Momtaz y Jamshidi, 2013).

1.9 *E coli* Enteroagregativa EAEC

En países en desarrollo y desarrollados EAEC es considerado un patógeno emergente y es la causa más común de diarrea del viajero después de ETEC (Kaper *et al.*, 2004, Nataro y Kaper, 1998). Puede colonizar el intestino delgado y grueso, además el paciente puede presentar una leve inflamación del colon (Kaper *et al.*, 2004).

La adherencia agregativa a la mucosa intestinal es el primer paso en la patogenia de EAEC (Huang *et al.*, 2004) y en ella están involucrados genes que se encuentran en el plásmido de virulencia (pAA) (Croxen y Finlay, 2010; Villaseca *et al.*, 2005). Estos genes codifican para fimbrias de adherencia agregativa (AAF) que presentan adhesinas agrupadas en la familia Dr y median la adherencia a la mucosa intestinal, de las cuales han sido identificadas cuatro variantes (AAF/I, AAF/II, AAF/III, Hda). Después de adherirse a la capa de moco intestinal, EAEC es capaz de penetrarla por actividad mucolítica de Pic, llegando a formar una biopelícula sobre los enterocitos. Además, EAEC causa daño a la mucosa por la secreción de citotoxinas como Pet (Villaseca *et al.*, 2005, Cerna *et al.*, 2003).

1.10 *E. coli* Enteroinvasiva EIEC

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea (Kaper *et al.*, 2004; Croxen y Finlay, 2010). EIEC presenta una distribución mundial y se ha reportado como causa frecuente de diarrea en Brasil, Estados Unidos y Europa. Estudios epidemiológicos realizados en México, muestran que las cepas EIEC son poco frecuentes como agentes causales de diarrea, identificándose preferentemente después del sexto mes de vida (Kaper *et al.*, 2004).

El grupo EIEC y *Shigella* spp. están relacionados genética y bioquímicamente ya que ambas son lisina descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas,

además invaden las células epiteliales y elaboran una o más enterotoxinas (Nataro y Kaper, 1998). Estas son bacterias intracelulares obligadas, carecen de flagelos y no tienen factores de adherencia (Kaper *et al.*, 2004). Su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, mediante mucinasas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, su posterior multiplicación dentro de ella y diseminación a células adyacentes sanas. Los genes necesarios para la invasividad se encuentran localizados en el plásmido pInV que poseen, entre otros genes, conocidos como *spa* y *mxi*, los cuales codifican un aparato de secreción tipo III. Este sistema segrega múltiples proteínas, como IpaA, IpaB, IpaC y IpgD, que median eventos epiteliales de señalización, reordenamientos del citoesqueleto celular, la absorción, la lisis de la vacuola endocítica y otras acciones.

2. ANTECEDENTES

Existen diversos estudios alrededor del mundo que demuestran la prevalencia de *E. coli* en alimentos y la presencia de genes de virulencia, tal es el caso de Yun Lee *et al.* (2009) quienes estudiaron la prevalencia de *E. coli* aislada de carne de res, cerdo y pollo en Corea en el periodo comprendido del 2004 al 2006; y determinaron que las cepas aisladas poseían genes de virulencia; este estudio demostró la presencia de cepas de *E. coli* patógenas en la carne de Corea y que ésta podría actuar como un vehículo de transmisión para el humano. Por su parte, Minami *et al.* (2010) realizaron un estudio sobre la prevalencia de patógenos transmitidos por alimentos en mercados abiertos y supermercados de Tailandia. Las cepas se aislaron a partir de carne de pollo, res, cerdo y mariscos en el periodo comprendido del 2006 al 2007. El estudio se enfocó en la búsqueda de diferentes patógenos entre los que se encontraba *E. coli* O157. De todas las muestras obtenidas ninguna fue positiva a este serogrupo.

En nuestro país existen algunos estudios sobre la prevalencia de *E. coli* en alimentos, pero no existen estudios relacionados con la calidad sanitaria y aislamientos de *E. coli* en canales de pollo que se comercializan en los diferentes puntos de venta de México. Los trabajos más cercanos fueron realizados por Estrada-García *et al.* (2002, 2004) quienes evaluaron la prevalencia de *E. coli* y *Salmonella* spp en los ingredientes con los que son aderezados los tacos que son vendidos en los tianguis de la ciudad de México (2000) con el propósito de demostrar las malas prácticas de higiene que se tienen en estos lugares. Estrada-García también realizó un estudio sobre la calidad de las salsas picantes; en el que demostraron que éstas pueden hospedar cepas de *E. coli* diarreogénicas (Estrada-García *et al* 2002; Estrada-Garcia *et al* 2004). Por otro lado, Vigil *et al.* (2009) realizaron un estudio para evaluar diferentes postres vendidos en restaurantes de la ciudad de Guadalajara y de Houston Texas y determinaron la presencia de *E. coli*, específicamente de los grupos involucrados en la diarrea del viajero (ETEC, EAEC).

Referente a la carne de pollo, existen algunos estudios de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de canales de pollo de mercados públicos y supermercados de la ciudad de México, en los cuales se observó una resistencia a la colistina (95%), novobiocina (95%), enrofloxacina (75%), oxitetraciclina (85%) y doxiciclina (80%) (Sánchez *et al* 2013).

3. GRUPOS DIARREOGÉNICOS PREDOMINANTES EN NUESTRO PAÍS

Cravioto *et al.* (1985) en su trabajo realizado en una localidad rural en el estado de Morelos entre 1982 y 1985, reportaron a ETEC como principal agente productor de diarrea (33.5%) seguido por EPEC (8.1%). En el caso del trabajo de Sepúlveda *et al.* (1984), reportaron 28% de aislamiento para EPEC y 13% para ETEC en un estudio de casos y controles en el área del sur de la Ciudad de México. Por su parte, Cortés-Ortiz *et al.* (2002) realizaron un estudio del brote que se presentó en

el Valle de Chalco en el año 2000 a raíz del desbordamiento del canal de aguas negras, ellos encontraron 62.2% a ETEC (44.6 % con LT, 11.2% con ST, y 44.1% con ambas), 0.84% a EIEC y 0.84% a EPEC. Finalmente, en los estudios realizados por el InDRE (Instituto de Referencia Epidemiológica) se encontró la presencia de ETEC (48%), EIEC (9%), EPEC (4%) y EHEC (1%) las cuales no pertenecían al serotipo O157:H7 (Hernández *et al.*, 2011). En el 2007 Paniagua *et al* reportaron que en niños el 32% de los casos en los que *E coli* fue el causante de las diarreas, el 13.3% de aislamientos fueron ETEC, 9.3% EPEC, 8.6% en el caso de STEC y 1% para EIEC.

4. JUSTIFICACIÓN

La carne de pollo es uno de los productos de origen animal con mayor demanda en nuestro país; sin embargo, durante la crianza, procesamiento y comercialización del pollo de engorda se puede presentar una contaminación con microorganismos patógenos que podría representar un riesgo para la salud de los consumidores, por lo que es necesario evaluar la calidad microbiológica de las canales de pollo para definir la importancia epidemiológica que tiene el pollo en la transmisión de patógenos, utilizando como modelo a *E. coli*, ya que es un patógeno importante que afecta tanto a aves como a humanos, por lo que se propone una evaluación sobre las características que tienen las cepas de *E. coli* aisladas a partir de canales de pollo obtenidas de rastro, mercados públicos y supermercados. Lo cual es de suma importancia ya que en nuestro país no existe información sobre la situación sanitaria del pollo y la presencia de grupos diarreogénicos de *E. coli* durante su procesamiento y comercialización.

5. HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* aisladas de canales de pollo de los diferentes puntos de venta corresponden a grupos virulentos, por lo que representan un problema de salud pública pues son un vehículo de transmisión indirecto de patógenos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la calidad microbiológica de las canales de pollo del rastro y de los puntos de venta utilizando como modelo de estudio *E. coli*.

6.2 Objetivos particulares

- Realizar lavados de canales de pollo obtenidas de rastro, mercados públicos y supermercados para su posterior aislamiento de *E. coli*.
- Realizar el conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales.
- Identificar bioquímicamente a *E. coli*.
- Caracterizar serológicamente las cepas de *E. coli*.
- Mediante el método de Kirby Bauer determinar la resistencia antimicrobiana de los aislamientos.
- Determinar la presencia de genes de virulencia de las cepas de *E. coli* (*eaeA*, *bfpA*, *lt*, *st*, *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *aggR*, *aap*) mediante PCR.
- Identificar los grupos filogenéticos de las cepas aisladas de *E. coli* mediante la detección de los genes *chuA*, *yjajA* y TSPE4.C2 por PCR multiplex.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención de muestras

Para este experimento, se trabajaron con 30 canales de pollo evisceradas, de las cuales se aislaron un total de 150 cepas de *E. coli* que se aislaron a partir de 10 canales de pollo de un rastro TIF (Tipo Inspección Federal), 10 canales de 3 mercados públicos y 10 canales de 3 supermercados del estado de Querétaro. Las canales del rastro se muestrearon después de salir del tanque de enfriamiento, durante el enhielado. Mientras que las correspondientes a los puntos de venta, se compraron y fueron colocadas en bolsas de plástico estériles, se mantuvieron a 4°C hasta su análisis que ocurrió antes de 24 horas después de su adquisición.

7.2 Lavado de canales

Cada canal eviscerada se colocó en una bolsa de plástico a la que se le agregaron 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1x estéril, el lavado de la canal se realizó durante 1 minuto mediante frotamiento cubriendo con el PBS superficies internas y externas, por último se retiró la canal de la bolsa y se conservó el líquido restante para su posterior análisis (Altekruse *et al.*, 2006; Gill y Badoni, 2004).

7.3 Conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales

Para el conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales, se tomó 1 ml del lavado de las canales a partir del cual se realizaron 4 diluciones décuples seriadas y de cada una se sembró 1 ml en una microplaca de cultivo para aerobios totales y coliformes totales RIDA COUNT total (R-Biopharm AG). Las microplacas se incubaron por 48 horas a 37°C para su posterior contabilización.

7.4 Aislamiento e identificación de *E. coli*

Para el aislamiento de *E. coli*, por cada canal de pollo se tomaron 5 alícuotas del PBS (1ml) y cada muestra se sembró en 10 ml de caldo nutritivo, posteriormente se incubó a 37°C durante 24h. De cada muestra de caldo nutritivo se tomó una asada y se sembró en agar MacConkey; se incubaron durante 24hr a 37°C. Por cada muestra se seleccionó una colonia de acuerdo a su morfología y se realizaron aislamientos en cultivo puro para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas, tales como: agar de Hierro Tres Azucres (TSI), Citrato, Urea, agar Hierro y Lisina (LIA) y medio SIM.

Se aislaron un total de 150 cepas de *E. coli*, 5 cepas por cada canal de pollo, las cuales se sembraron en gelosa especial para conservarlas como copias de trabajo y en Dorset para su almacenamiento.

7.5 Identificación serológica

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó mediante la técnica empleada en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con Orskov y Orskov (1984), con la utilización de sueros monovalentes específicos (SERUNAM), obtenidos de conejo Nueva Zelanda.

Las reacciones de aglutinación se realizaron en placas de 96 pozos de fondo redondo. Se analizó el antígeno somático de cada cepa empleando una batería con 186 sueros monovalentes obtenidos de los antígenos somáticos conocidos, además de 50 para diferentes especies de *Shigella*, más diez obtenidos a partir de cepas aisladas en el propio laboratorio (29733, 44037, 49766, 56836, 64474, 108308, 108414, 110538, 112198 y 117308). En el caso de los antígenos flagelares, se utilizaron 56 sueros específicos correspondientes a los antígenos conocidos, más 9 de cepas aisladas en el propio laboratorio.

7.5.1 Preparación e identificación del antígeno somático

Las cepas se sembraron individualmente en tubos con 10 ml de TSA (pH de 7.2), los cuales se incubaron por 24h a 37°C, posteriormente, se cosechó el crecimiento bacteriano en 10 ml de solución salina 0.15 M; la suspensión obtenida se transfirió a otro tubo y se inactivó por esterilización a vapor fluente a 100°C durante 1h. Después se añadió a cada tubo solución salina con formaldehído al 0.6 % (v/v). Por último, los tubos se sellaron con parafilm y se almacenaron para ser usados como antígeno somático.

Las microplacas se prepararon colocando en cada pozo 50µl de suero monovalente con un dispensador Quick Spense Controller Model 96-200 DYNATECH LABORATORIES. Posteriormente, se colocaron 50µl del antígeno somático previamente preparado. Las placas se envolvieron con papel adherente para evitar la evaporación y se incubaron a 50°C de 18 a 24 h y se revisaron para determinar la reacción de aglutinación.

Se identificaron los sueros que reconocieron al antígeno bacteriano y se hicieron diluciones de éstos, desde 1:100 hasta 1:12,800. Se utilizaron sueros absorbidos y diluidos 1:50 cuando se presentó una reacción cruzada. Para definir el serogrupo de una cepa, se identificó el mayor grado de aglutinación de la dilución más alta del suero comparada con la que se presentó con el antígeno homólogo, se consideró sin aglutinación cuando se observó un botón de antígeno en el fondo del pozo, OR (rugosa) cuando hubo reacción de aglutinación contra todos los antisueros. Las cepas que no presentaron aglutinación con ningún antisuero del esquema fueron designadas como OND (No Determinadas).

7.5.2 Preparación e identificación del antígeno flagelar

Las cepas se sembraron por picadura en el medio semisólido Colindale (peptona de caseína 10g, extracto de carne 3g, gelatina bacteriológica 80g, NaCl 5g, agar agar 4g, agua destilada 1000 ml, pH 6.9) en el interior del tubo de Craigie y se

incubaron a 25°C durante 3 semanas hasta que se observó un enturbiamiento del medio de cultivo.

Se consideró un cultivo móvil, cuando se presentó crecimiento dentro y fuera del tubo de Craigie, aquellas cepas en las que no se observó turbidez se consideraron como No Móviles (NM). De los tubos que presentaron movilidad se tomó una muestra con asa bacteriológica y se sembró en 10 ml de caldo peptona de biotriptasa al 2% (pH 7.2), los tubos se incubaron a 30°C por 24 h y se inactivaron con solución salina con formalina al 0.6% (SSF). Para identificar el antígeno flagelar se realizó un procedimiento similar al descrito para el antígeno somático (tiempo de incubación en las placas, de 2 h a 50°C).

7.6 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por técnica de hervido. Los aislamientos puros se sembraron en 2 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron durante 12h. Se tomó 1 ml del caldo y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de agua milli Q para poder resuspender la pastilla que quedó en el fondo del tubo Eppendorf. Los tubos se colocaron en un vaso de precipitados con agua y se mantuvieron en ebullición durante 10 minutos; seguido de esto se colocaron inmediatamente en hielo por 5 minutos. Por último cada tubo se homogeneizó en el vórtex y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos. Para su almacenamiento se colectaron 100 µl del sobrenadante, se transfirieron a otro tubo Eppendorf de 600 µl y se refrigeraron hasta su uso (Hegde *et al.*, 2012).

Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (1.2%) TBE (TRIS-Ácido bórico-EDTA) a 80mVolts por 40 minutos. El gel se tiñó con Gelred (BioLabs™) durante 15 a 30 minutos y posteriormente se observó en un fotodocumentador (Biosens SC805 Gel Image Systems).

7.7 Detección de genes asociados a virulencia

Para determinar la presencia de genes de virulencia se utilizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR) descrita por López-Saucedo *et al.* (2003), Navarro *et al.* (2010), Huang *et al.* (2007) modificadas (Cuadro1) en el termociclador Axigen Maxigen ®. Se usaron nueve secuencias específicas para el análisis de genes relacionados con factores de virulencia de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, el volumen de la mezcla de reacción para la PCR de cada una de las muestras de ADN de las cepas fue de 25µl, esta mezcla de reacción consistió de los iniciadores específicos para cada gen (Sigma Aldrich), agua milli Q estéril, buffer 10X, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), MgCl₂ (50mM) y Taq polimerasa (Invitrogen™) (Cuadro 2). La PCR para cada gen se realizó bajo diferentes condiciones de temperatura de desnaturalización, alineamiento y extensión de acuerdo a como se muestra en el cuadro 3, el total de genes identificados fueron: *lt*, *st*, *bfpA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *ipaH*, *aggR*, *aap*.

Los productos amplificados se observaron en geles de agarosa de 1%-1.2% TAE (TRIS-Ácido acético-EDTA). El gel se tiñó con Gelred (BioLabs™) durante 15 a 30 minutos y posteriormente se observó en un fotodocumentador (Biosens SC805 Gel Image Systems).

7.8 Identificación de grupos filogenéticos

La determinación de grupos filogenéticos se realizó mediante PCR múltiple, la mezcla de PCR consistió de 25µl totales (Cuadro 4), las condiciones de temperatura de desnaturalización, alineamiento y extensión se observan en el cuadro 3. Los iniciadores que se utilizaron fueron descritos por Clermont *et al.* (2000) (Cuadro 5), para detectar los genes *chuA*, *yjajA* y un fragmento de ADN TSPE4.C2. La amplificación de *chuA*⁺, *yjajA*⁺, corresponde al grupo filogenético B2; *chuA*⁺, *yjajA*⁻ corresponde al grupo D; *chuA*⁻, TSPE4.C2 + al grupo B1 y *chuA*⁻, TSPE4.C2 – grupo A (Figura 1).

Los productos amplificados se observaron en geles de agarosa de 1.2% TAE (TRIS-Ácido acético-EDTA). El gel se tiñó con Gelred (BioLabs™) durante 15 a 30 minutos y posteriormente se observó en un fotodocumentador (Biosens SC805 Gel Image Systems).

7.9 Resistencia antimicrobiana

Para determinar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos, se utilizó el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar). Los halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano se reportaron de acuerdo a los criterios de interpretación propuestos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).

Las cepas de *E. coli* se sembraron en medio TSA y se incubaron durante 24h a 37°C, después del cultivo puro se tomó una colonia y se transfirió a un tubo con caldo nutritivo que se incubó a 37°C hasta que alcanzó una turbidez correspondiente a 0.5 de McFarland, luego se sembró con un hisopo por estría continua cerrada en agar Mueller-Hinton teniendo el cuidado de no dejar ningún espacio libre para poder realizar la prueba de manera eficiente. Por último se colocaron en la superficie de la caja y con ayuda de unas pinzas los sensidiscos impregnados con los antibióticos y se incubó por 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se midieron los halos de inhibición de cada sensidisco con ayuda de una regla y se determinó si eran resistentes, intermedios o sensibles al comparar los diámetros obtenidos con los estándares de la CLSI.

Los sensidiscos que se utilizaron fueron cefuroxime (CXM) 30 µg, lincomicina (L) 2 µg, fosfomicina (FO) 200 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, tilosina (TLS) 30 µg, neomicina (N) 30 µg, estreptomina (S) 10 µg, enrofloxacina (ENR) 5 µg, doxiciclina (DXP) 30 µg, norfloxacina (NOR) 10 µg, oxitetraciclina (OXD) 30 µg, ácido nalidixico (NA) 30 µg y ceftriaxona (CRO) 30 µg de HIMEDIA LABORATORIOS. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922.

7.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados para el conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales se realizó mediante un diseño completamente al azar (análisis de varianza), la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey. Los datos se corrieron y analizaron con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.

8. RESULTADOS

8.1 Calidad microbiológica de las canales

8.1.1 *Mesófilos aerobios*

El promedio de UFC/ml \log_{10} de las canales de rastro fue de 5.604, las de los tres supermercados tuvieron un promedio de 6.004 UFC/ml \log_{10} y para las de mercados públicos fue de 6.835 UFC/ml \log_{10} (Figura 2).

Al comparar los resultados obtenidos entre los tres supermercados, el A tuvo la cuenta más baja con un promedio de 5.457 UFC/ml \log_{10} , seguido por el B 6.245 UFC/ml \log_{10} , y el C cuyo promedio fue de 6.234 UFC/ml \log_{10} (Figura 3).

Para los mercados públicos las cuentas fueron muy similares, el mercado A tuvo un promedio de 6.885 UFC/ml \log_{10} , para el mercado B fue 6.701 UFC/ml \log_{10} y el mercado C de 6.900 (Figura 3).

8.1.2 *Coliformes totales*

El promedio de las canales de rastro fue de 4.817 UFC/ml \log_{10} . Mientras que las de los tres supermercados tuvieron un promedio de 4.732 UFC/ml \log_{10} y 6.015 UFC/ml \log_{10} para las de mercados públicos (Figura 4).

Al igual que en el caso de los mesófilos, el supermercado A tuvo el conteo más bajo con un promedio de 4.116 UFC/ml \log_{10} , seguido por el supermercado C con un promedio de 4.979 UFC/ml \log_{10} , y finalmente el supermercado B fue el más alto con 5.020 UFC/ml \log_{10} , (Figura 5).

Para los mercados públicos, el que tuvo el conteo más bajo fue el mercado B con 5.603 UFC/ml \log_{10} seguido del C con un promedio de 6.158 UFC/ml \log_{10} y el promedio más alto se encontró en las canales adquiridas en el mercado A que fue de 6.236 UFC/ml \log_{10} y el (Figura 5).

Tanto para mesófilos aerobios como para coliformes totales, las canales muestreadas en mercados públicos presentaron los valores más altos, con

respecto a aquellas de rastro y supermercados, de hecho, entre estos últimos no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

8.2 Identificación serológica

En total se aislaron 150 cepas de *E. coli* a partir de las canales procedentes de los diferentes puntos de muestreo, entre las cuales se identificaron 48 serogrupos diferentes (Cuadro 6), siendo O8 (7.33%), O7 (6%), O48 (6%), ONT (6%), O103 (5.33%), O11 (5.33%), O15 (5.33%) y O6 (4.67%) los más frecuentes (Cuadro 7).

Se identificaron 15 cepas no móviles, mientras que en las móviles se logró detectar 26 antígenos flagelares diferentes. Los más frecuentes fueron H21 (12.67%), H16 (8%) y H4 (7.33%).

En los aislamientos del rastro TIF, los serogrupos que se aislaron con mayor frecuencia fueron O8, O11 y O103. En cuatro canales predominaron los serotipos O8:H9 (3), O11:H6 (4), O8:H53 (3) y O36:NM; lo que indica una posible colonización de las aves. De los aislamientos de las canales de pollo obtenidas de los 3 mercados públicos, se encontraron 30 serogrupos diferentes; en estos puntos de venta hubo una mayor cantidad de serogrupos a diferencia de los supermercados y rastro donde se encontraron 19 serogrupos respectivamente (Cuadro 6). Respecto a los 3 mercados públicos, los serogrupos de *E. coli* que predominaron fueron O5 con 5 aislamientos, O15 con 4 aislamientos y, O9, O172 y O20 con 3 aislamientos respectivamente. En el mercado B se encontró que en una de las canales predominó el serotipo O9:H21 con 3 aislamientos y O138:NM en dos de los aislamientos. En el caso del mercado C una de las canales presentó el serotipo O20:H4 en 3 de los aislamientos y O172:H20 en los otros dos aislamientos lo que podría indicar una posible colonización de estas aves (Cuadro 8). Cabe mencionar que en las canales de mercados públicos hubo un aislamiento del serogrupo O157.

Al realizar el análisis por lugar de muestreo se observó que el serogrupo O7 fue el más común en los supermercados, seguidos de O6 y ONT, O48 (Cuadro 6). El serogrupo O7 solo se aisló en uno de los supermercados (C).

Por otro lado de los 19 serogrupos de *E. coli* que se aislaron de las canales de pollo del rastro TIF, 12 serogrupos también se encontraron ya sea en canales de mercados públicos o de supermercados. Un hecho interesante es que el serogrupo O8 que fue el que más aislamiento tuvo, predominó en las canales de rastro y solo hubo dos aislamientos en el mercado C; mientras que los serogrupos O7, O15, O36, ONT y O48 se aislaron de las canales del rastro y de los puntos de venta; a diferencia de los serogrupos O103, O40, O53 que sólo se aislaron de canales de rastro y de supermercados. Por otro lado, los serogrupos O11, O140, O150 se encontraron en las canales de rastro y de mercados públicos y los serogrupos O166, O84, O78, O153, O119, O167 y O4 únicamente se aislaron de las canales del rastro TIF.

Al realizar un análisis de la formula antigénica completa (O:H), vemos que se identificaron 78 serotipos diferentes (Cuadro 8), entre los que O103:H21 (5.33%) y O11:H6 (5.33%) fueron los más frecuentes, seguido de O7:H4 (4.67%) y O8:H9 (3.33%).

En el caso de las cepas con el serotipo O103:H21 se aislaron de 4 canales del rastro TIF y una canal de un supermercado, ésta canal se encontraba colonizada ya que 4 colonias presentaron este mismo serotipo. Siete cepas aisladas en el supermercado C pertenecieron a O7:H4, las cuales se aislaron de 5 canales, ya que en una de ellas se aisló 3 veces. El serotipo O11:H6, se aisló de una canal de mercado público y 4 canales del rastro TIF, en el caso de una de las canales del rastro, 4 de las colonias de *E.coli* tuvieron este serotipo.

Al realizar una asociación entre serogrupos encontrados por lugar de muestreo y los patotipos diarreogénicos de *E. coli*, podemos observar que la mayoría de ellos pertenecen al grupo de las STEC, seguido por EPEC y ETEC (Cuadro 9).

8.3 Detección de genes asociados a virulencia

En la búsqueda de genes asociados a virulencia (*stx1*, *stx2*, *st*, *lt*, *eaeA*, *bfpA*, *ipaH*, *aap*, *aggR*) (Figuras 6-10), se determinó la presencia de los genes *eaeA* (4%, n=6) (Figura 6b) y *stx2* (5.3%, n=8) (Figura 7b) de estas últimas, 6 aislamientos se obtuvieron de canales de supermercados (A y B) y 2 cepas de una canal del mercado público A, ambas correspondieron al serotipo O138:NM. (Cuadro 10). Por otro lado, de las 6 cepas positivas al gen *eaeA*, 5 se aislaron de los tres mercados públicos y sólo una se aisló del rastro TIF (Cuadro 10).

8.4 Grupos filogenéticos

Con respecto a los grupos filogenéticos, de los 150 aislamientos se determinó que 48 cepas (32%) pertenecieron al grupo A, 61 cepas (40.67%) al grupo B1, 5 cepas (3.33%) al grupo B2 y 36 cepas (24%) al grupo D (Figura 11, 12).

Las canales que tuvieron una mayor cantidad de cepas del grupo D fueron las de rastro, seguidas por las de supermercado y mercados públicos. Por otro lado el grupo B2 se presentó más en aislamientos de los mercados públicos y estuvo ausente en cepas de canales de rastro. En las cepas de mercados públicos el grupo A fue el más frecuente con 20 aislamientos, seguido por las cepas aisladas de canales de supermercados. Tanto en rastro como en supermercados el grupo B1 fue el más prevalente (Cuadro 11).

De las cepas que presentaron el gen *stx2*, 5 pertenecieron al grupo D, 2 al grupo A y 1 al grupo B1. En el caso de las cepas positivas al gen *eaeA*, 3 correspondieron al grupo D y 3 al grupo B1 (Cuadro 10). Se puede observar que el 57.7% de las cepas que presentaron algún gen de virulencia pertenecieron al grupo filogenético D (cuadro 10).

8.5 Resistencia a antibióticos

Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron un alto porcentaje de cepas resistentes a los 14 antibióticos utilizados (Figura 13). También se observó que

todas las cepas presentaron multirresistencia a los antibióticos probados en este estudio.

Se encontró que todos los aislamientos fueron resistentes a la tilosina (100%) seguido por oxitetraciclina (96.67%), ácido nalidíxico (96%), doxiciclina (94%), enrofloxacina (91.33%), lincomicina (88.67%), norfloxacina (78%), ampicilina (74.67%), fosfomicina (70%), estreptomina (47.33%), cefotaxime (40.67%), ceftriaxona (38.67%), cefuroxime (34%) y neomicina (28%) (Figura 13). Al analizar los resultados obtenidos por lugar de muestreo, las cepas del rastro TIF mostraron porcentajes del 100% de resistencia para tilosina y lincomicina; mientras que cefotaxime, tuvo un 70% de sensibilidad, seguido por ceftriaxona 66%. Podemos observar que los aislamientos de los supermercados presentaron resistencia del 100% (los 50 aislamientos) para la tilosina, doxiciclina, oxitetraciclina y ácido nalidíxico. Respecto a los antibióticos que tuvieron porcentajes altos de sensibilidad fueron; neomicina (52%), cefuroxime (46%), cefotaxime (44%) y ceftriaxona (42%).

Los aislamientos de mercados públicos mostraron resistencia del 100% para la tilosina; en el caso del ácido nalidíxico, doxiciclina, oxitetraciclina, enrofloxacina y lincomicina mostraron porcentajes de resistencia por arriba del 90%. En general las cefalosporinas y la neomicina fueron los antibióticos que presentaron los porcentajes de sensibilidad más altos para todos los aislamientos del rastro y puntos de venta.

De las cepas que presentaron los genes de virulencia *eaeA* o *stx2*, mostraron ser resistentes a la mayoría de los antibióticos probados (cuadro 10).

Los perfiles de resistencia más frecuente fueron (NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, AMP, NA) con 10 aislamientos, y (NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA, CXM) con 9 aislamientos (cuadro 12).

9. DISCUSIÓN

El pollo es el producto de origen animal de mayor consumo a nivel mundial. En nuestro país se producen semanalmente alrededor de 28 millones de pollos, los cuales se comercializan en cinco clasificaciones reconocidas en el mercado mexicano como; vivo 33%, rosticero 26%, mercado público 19%, supermercado 12%, en piezas 6% y productos con valor agregado 4%. Además de que el consumo *per capita* de carne de pollo es de 25.5kg (UNA, 2014), debido a que la carne de pollo es un producto con gran demanda, y el consumidor adquiere la carne de pollo principalmente de mercados y supermercados; los resultados de este trabajo proporcionan información sobre la calidad microbiológica de la carne de pollo y el impacto que tiene el manejo del pollo en la incidencia de *E. coli* diarreogénicas.

La calidad microbiológica de las canales depende en gran medida de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de las aves en granja, la contaminación durante el procesamiento en rastro, transporte y comercialización. Dainty y Mackey (1992), reportaron que después de la evisceración, las canales de pollo pueden alcanzar 10^2 a 10^4 bacterias/cm² debido a que las aves que llegan a la planta procesadora generalmente se encuentran sucias con heces, polvo, y partículas propias de la cama y al momento de ser transportadas por el contacto con otras aves, por lo que la superficie de la piel se puede contaminar con una gran variedad de bacterias de descomposición, patógenas, levaduras y mohos (Bilgili, 2001; Mead y Dodd, 1990).

Debido a que el crecimiento microbiano es un factor importante en la descomposición de la carne de pollo, el uso del conteo de mesófilos aerobios y coliformes totales es una herramienta para el control de la calidad de productos de origen animal, pues un conteo alto es indicativo de malas prácticas de higiene y de una inadecuada temperatura de almacenaje. Además de que existe la posibilidad

de que las canales pudieran estar contaminadas por microorganismos patógenos (*Campylobacter* spp, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7), ya que éstos se clasifican como mesófilos (Mataragas *et al.*, 2008, Gonzales *et al.*, 2005). En el presente trabajo se obtuvieron cuentas elevadas de mesófilos aerobios y coliformes totales en las muestras obtenidas de mercados públicos en comparación al rastro y supermercados (Figura 2), lo cual puede indicar malas prácticas de higiene, deficiencias en la conservación del producto, excesiva manipulación, falta de refrigeración o el contacto con el medio ambiente, ya que incluso las canales de rastro y supermercados tuvieron conteos altos a diferencia de otros estudios realizados en nuestro país (Castañeda *et al.*, 2013), estos hallazgos sugieren que los métodos de conservación y manejo de las canales en los diversos rastros y puntos de venta de nuestro país no están homologados.

Un estudio realizado en Marruecos, en el cual se tomaron muestras de pechugas de pollo con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica y los niveles de contaminación en mercados públicos y supermercados, los conteos de mesófilos en mercados fueron de 6.18 UFC/g Log₁₀, para las muestras de supermercados 4.74 UFC/g Log₁₀, para la cuenta de coliformes totales en mercado público 4.64 UFC/g Log₁₀ y supermercado 3.54 UFC/g Log₁₀. (Chaiba *et al.*, 2007), al igual que lo reportado en este estudio, podemos observar que los niveles de mesófilos y coliformes son altos para las canales de los mercados; uno de los puntos relevantes citados por Chaiba *et al*, que influye en estas cuentas elevadas es que las canales se mantuvieron a temperatura ambiente.

En nuestro país no hay información que marque los límites máximos de coliformes totales y mesófilos aerobios en carne cruda de pollo, la NOM-194-SSA1-2004 se limita a inspeccionar *E. coli* como microorganismo indicador de contaminación fecal, la presencia de estas normas sería una herramienta útil para el control de dichos microorganismos Pero en otros países existe valores de referencia, como

es el caso de Francia, el "Centre Nationale d'Etudes et de Recomendaciones sur la Nutrición et l'Alimentation" (CNERNA-CNRS, 1996) estableció una pauta con un nivel máximo de 5.70 log₁₀ ufc / g para mesófilos aerobios. Pascual-Anderson mencionan que tasas superiores 10⁶ y 10⁷ UFC por gramo en la carne ya que es posible observar signos de descomposición. De acuerdo los valores reportados en este estudio de las cuentas elevadas de mesófilos y en comparación con los límites permitidos en otros países y de acuerdo a la información reportada por diversos autores (Pascual-Anderson, 1999; Bilgili 2001) sugiere que la vida de anaquel de las canales de pollo se verá reducida.

Al realizar la identificación de *E. coli*, se encontró que estuvo presente en todas las canales muestreadas. El resultado en conjunto con las elevadas cuentas de coliformes fecales, confirman que el pollo es un vehículo importante en la transmisión de patógenos que ocasionan infección intestinal. Su presencia, sin embargo, es entendible ya que la bacteria es parte de la biota intestinal de animales por lo que su presencia en los alimentos es considerada como indicador de la contaminación fecal directa o indirecta. Nuestros resultados son muy parecidos a lo reportado por Zhao *et al.* (2001), quienes identifican en el 82% de las muestras de canales de pollo de supermercados la presencia de *E. coli*.

Al realizar un análisis de los serogrupos obtenidos por lugar de muestreo, observamos que en los tres mercados públicos se encontraron 30 serogrupos diferentes. En estos puntos de venta se encontró una mayor cantidad de serogrupos a diferencia del rastro y los supermercados ya que se encontraron 19 serogrupos respectivamente. Lo que sugiere que en los mercados públicos existen malas prácticas de higiene, que hace que aumenten la diversidad de serogrupos en estos lugares y por lo tanto el riesgo para la salud del consumidor. De acuerdo a los diferentes serogrupos identificados podemos observar que la mayoría de ellos pertenecen al grupo diarreogénico STEC, seguido de EPEC y ETEC (Amézquita *et al.*, 2012; Momtaz y Jamshidi, 2013; Trabulsi *et al.*, 2002; Villaseca

et al., 2005; Nataro y Kaper, 1998; Campos *et al* 2004; Jana y Mondal 2013). Cabe mencionar que dentro de los serogrupos encontrados en las canales de mercados públicos hubo un aislamiento del serogrupo O157 el cual es poco común en nuestro país, ya que, datos serológicos de aproximadamente 16,000 aislamientos de *E. coli* obtenidos los últimos 20 años han mostrado una frecuencia de *E. coli* O157:H7 del 1% (Navarro *et al.* 2003). De igual modo, Callaway *et al.* (2004) mostraron una frecuencia del 1.25% para *E. coli* O157 en ganado bovino y 2.1% en porcinos. Amézquita *et al.* (2012) tomaron muestras de heces de diversas especies animales en el norte de nuestro país, incluidas gallinas, de las que se aislaron dos cepas O157:H7. Samadpour *et al.*, 1994 y Doyle *et al.*, 1987 sugieren que es raro aislar *E. coli* O157 de carne de pollo; ya sea de aves vivas o de canales y cuando se han encontrado, normalmente no presentan genes de virulencia (Samadpour *et al.*, 1994, Doyle *et al.*, 1987). Los datos anteriores sugieren que probablemente la cepa O157 que se encontró en las canales pudiera ser de origen humano, esta teoría se refuerza con el hecho de que esta cepa fue aislada en una canal de mercado público.

Por otra parte, de los 19 serogrupos de *E. coli* que se aislaron de las canales de pollo del rastro TIF, 12 de ellos se identificaron en las muestras de mercados públicos y de supermercados, lo que podría indicar que la contaminación está presente desde rastro. En un estudio realizado por Blanco *et al.* (1998) quienes identificaron a O2, O8, O18, O5, O78, O115, O116, O1, O81, O132, O14, O20, O53, O102, O12, O15, O83 y O103 entre los serogrupos de *E. coli* más comunes causantes de septicemias en pollos. De igual manera, en nuestro país Rosario *et al* (2004) reportaron los serogrupos O8, O103, O15 y O84 aislados a partir de huevos fértiles e infértiles y en pollos con infección de saco vitelino y Morales *et al.* (2009) aisló los serogrupos O7, O8, O15 y O20 en aves de traspatio en el Estado de Veracruz, algunos de ellos coinciden con los encontrados en canales de aves en el presente trabajo, lo que sugiere que algunas de las cepas encontradas en las canales de este estudio pudieran tener su origen incluso desde granja.

González (2011) aisló cepas de *E. coli* de diferentes alimentos en el estado de Sinaloa, incluida la carne de pollo, la mayoría de las muestras fueron negativas a genes de virulencia de los grupos diarreogénicos, y se encontró que de 412 muestras, únicamente el 13.2% (n=54) fueron positivas a algún gen y el grupo más frecuente fue EPEC seguido por STEC con un 9%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en el que la presencia de genes de virulencia en las muestras de canales de ave fue muy baja.

En países desarrollados como Estados Unidos, Australia, se han presentado diversos brotes de STEC, en donde los pacientes han presentado colitis hemorrágica, diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico. Algunas cepas STEC están consideradas como patógenos emergentes transmitidos por alimentos con gran importancia dentro de la salud pública, se han identificado más de 200 serotipos de *E. coli* productoras de Shiga toxinas (STEC) (Barlow *et al.*, 2006, Bagheri *et al.*, 2014). En nuestro estudio no se obtuvieron cepas que presentaran el gen *stx1*, sin embargo, se encontró que el 5.3% presentaron el gen *stx2* del grupo diarreogénico STEC, lo que coincide con Alonso *et al.* (2012) obtuvieron un 3.3% de cepas STEC y 3.9% de EPEC en canales muestreadas de puntos de venta, además de que en el caso de las cepas de STEC el gen que predominó fue *stx2*. Este hecho tiene gran importancia dado que se sabe que las cepas que poseen el gen *stx2* están más asociadas a enfermedades severas comparados con aquellas que únicamente poseen *stx1* o ambas (Girardeau *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado en un rastro en Irán (Bagheri *et al.*, 2014) donde se obtuvieron porcentajes bajos de genes asociados a virulencia, esto muy probablemente nos indica que los aislamientos identificados de *E. coli* son parte de la biota entérica de los animales o el hombre.

En los resultados obtenidos dentro de este estudio, se observa que las cepas STEC no presentaron el gen *eaeA* el cual está asociado comúnmente con las

STEC causantes de brotes y enfermedades severas (Barlow *et al.*, 2006). De hecho se ha demostrado que no todas las cepas STEC productoras de shiga toxinas clínicamente sean relevantes, (Ghanbarpour *et al.*, 2011). Las cepas de STEC se han aislado de diversas especies animales y es bien sabido que el ganado bovino es el mayor reservorio, sin embargo diversos estudios han demostrado que borregos y cabras también son reservorios, también algunas ellas se han detectado en muestras fecales de aves sanas (Amézquita *et al.* 2012; Karmali, 1998; Barlow *et al.*, 2006; Bagheri *et al.*, 2014), como en un estudio realizado en Iran, mostró que en cepas de *E. coli* aisladas de heces de aves con colisepticemia y aves sanas, el 4.5% de las cepas fueron positivas al gen *stx1* y 1.8% al gen *eae*, que corresponden a los patotipos EPEC y STEC. (Momtaz y Jamshidi, 2013). Otro estudio realizado por Ghanbarpour *et al.*, (2011) en aislamientos de *E. coli* obtenidos heces de aves (APEC) reveló que 4.5% (5 cepas) y 1.8% (2 cepas) de los aislamientos fueron positivos a los genes *stx2* y *eae* respectivamente.

También se encontró que el 4% de las cepas caracterizadas en este estudio presentaron el gen *eaeA* del grupo EPEC, se han aislado cepas EPEC de heces fecales de gallinas (Kobayashi 2002, Farooq 2009), tal es el caso de un estudio que se realizó para determinar la presencia de EPEC en pollos en Argentina, donde se encontró que en muestras de hisopos cloacales el 19% de las cepas fueron positivas al gen *eaeA*. Aunque, al igual que en nuestro trabajo, estuvo ausente *bfp* (Alonso *et al.*, 2011 y 2012).

La presencia de EPEC y STEC en canales de pollo puede estar relacionada con el proceso de evisceración, principalmente con la ruptura del intestino, o la posible contaminación cruzada durante el procesamiento y el manejo en los puntos de venta.

El análisis filogenético se ha convertido en una herramienta importante para la evaluación de la virulencia de las cepas de *E. coli*, aunque la distribución geográfica, el clima, diversos factores socioeconómicos que están relacionados con la alimentación y las medidas de higiene también están asociados a la distribución filogenética de las cepas de *E. coli* (Escobar-Páramo *et al.*, 2004 b). Walk *et al* (2007) demostraron que la mayoría de las cepas de *E. coli* que son capaces de persistir en el ambiente pertenecen al grupo B1. Ji Koo *et al* (2012) realizó un estudio en el cual muestreo diferentes tipos de carne incluida la de pollo, donde reportó que la mayoría de las cepas de *E. coli* que aisló pertenecieron al grupo filogenético A, seguido del grupo filogenético B1, lo que coincide con lo encontrado en el presente estudio ya que los aislamientos pertenecieron principalmente a los grupos A y B1 (Bagheri *et al* 2014; Drugdová 2010). Por otro lado, Higgins *et al.* (2007) obtuvieron 40 aislamientos de muestras de heces fecales de 20 pollos, de los cuales, el 50% pertenecieron al filogrupo A, lo que sugiere que la mayor parte de los aislamientos que se obtuvieron en nuestro estudio pudieran ser parte de la biota intestinal como lo indican los serogrupos aislados. Sin embargo, en otros trabajos, los resultados no coinciden con esta teoría, como por ejemplo en un estudio realizado en Eslovaquia en donde se muestreó carne y heces de gallinas sanas y se observó que de las muestras de heces fecales el 62.5% fueron del grupo D y el 37.5% del grupo B2 y de las muestras de carne el 53% de las cepas pertenecieron al grupo A y B1 (Drugdová *et al.*, 2010).

Recientes estudios filogenéticos indican que las cepas de STEC y EHEC pertenecen a los grupos filogenéticos A, B1 y D (Escobar-Páramo *et al.*, 2004), como lo encontrado en el presente trabajo, en el cual, de las cepas positivas a *stx2*, cinco pertenecieron al grupo D, dos al A y una al B1. Estudios previos muestran que las cepas de STEC son mayormente cepas comensales en animales con un alto potencial de cepas que pueden causar enfermedades en humanos. (Momtaz y Jamshidi, 2013).

Los datos obtenidos en el antibiograma mostraron una alta resistencia a los 14 antibióticos probados, un hecho interesante fue que en los aislamientos de rastro y los de punto de venta presentaron porcentajes altos de sensibilidad para neomicina, cefuroxima, ceftriaxona y cefotaxima, estos antibióticos son más utilizados para en la salud humana.

En las canales de pollo de mercado publico muestreadas en este estudio, hubo porcentajes altos de resistencia para enrofloxacin (90%), doxiciclina y oxitetraciclina (96%), similar a lo encontrado en un estudio realizado en la Ciudad de México en canales de pollo de mercados públicos mostraron una alta resistencia a la enrofloxacin (75%), oxitetraciclina (85%) y doxiciclina (80%) y la resistencia más baja se observó para la neomicina para ambos estudios (Sánchez 2013) debido a que estos antibióticos son utilizados en la industria avícola podría ser el resultado de estos altos niveles de resistencia. Saénz *et al.*, 2011 encontraron un alto porcentaje de resistencia al ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina y kanamicina en aislamientos de heces de pollos y en sus productos (piel, pechuga, alimentos precocidos), además la resistencia a ampicilina fue de 47% en productos. Otro estudio realizado en EU, se obtuvieron mayor resistencia a las tetraciclinas, seguido de estreptomycin, sulfametoxazol, cefalotin y ampicilina. Además todas las cepas fueron sensibles a la ciprofloxacina (Schroeder *et al.*, 2003). En la India, Manoj y Saikia (2011) encontraron niveles altos de resistencia a ampicilina (70%) y cefotaxima (60%). La presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos en los alimentos puede servir como una fuente de genes de resistencia que pueden ser transferidos a la biota intestinal de los humanos (Schroeder *et al.*, 2003).

En los resultados obtenidos en este estudio se observaron que todas las cepas presentaron cierto grado de multiresistencia, como Schroeder *et al.*, 2004 que reportan cepas aisladas de *E.coli* resistentes a antibióticos. Similar a nuestro estudio, Álvarez-Fernández *et al* 2013 obtuvieron cepas con alta resistencia a la ampicilina y ácido nalidíxico, esto nos podría indicar que las canales de pollo podrían ser un reservorio de cepas resistentes.

Los resultados de este estudio presentaron aislamientos pertenecientes principalmente a los filogrupos comensales con bajo perfil de factores de virulencia y elevada resistencia. Moreno *en al.*, 2006 mencionan que las cepas que han adquirido una gran diversidad de factores de virulencia, generalmente cuentan con poca resistencia y viceversa.

10. CONCLUSIONES

- En los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que todas las canales fueron positivas a *E. coli*, y dentro de los aislamientos se encontraron cepas de los grupos diarreogénicos EPEC y STEC lo que indica un riesgo potencial para el consumidor.
- De las cepas que presentaron algún gen de virulencia, únicamente se encontró una en rastro, todas las demás se encontraron en los puntos de venta
- Es de importancia destacar la elevada resistencia a los antibióticos y la multirresistencia, lo que podría ser un riesgo para el consumidor.
- La presencia de conteos elevados de mesófilos aerobios y coliformes totales en las canales de pollo en el rastro y puntos de venta son un indicativo de algunos problemas de manejo durante el procesamiento.
- Este es el primer trabajo en nuestro país que muestra información sobre la calidad microbiológica de las canales de pollo, por lo que se necesita hacer más estudios sobre el tema.

11. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: ampicilina

BFP: Bundle forming pilus

CFA: Factores de colonización

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (por sus siglas en inglés).

CRO: ceftriaxona

CTX: cefotaxima

CXM: cefuroxima

DXP: doxiciclina

E. coli: *Escherichia coli*

EAEC: Enteroagregativa

EHEC: Enterohemorrágica

EIEC: Enteroinvasiva

ENR: enrofloxacin

EPEC: Enteropatógena

ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

ETEC: Enterotoxigénica

FO: fosfomicina

H: Antígeno flagelar

K: Antígeno capsular

L: lincomicina

LB: caldo Luria Bertani

LEE: Locus of Enterocyte Effacement

Lesión A/E: Adherencia y esfacelamiento

LIA: Agar Hierro y Lisina

LPS: Lipopolisacárido

LT: enterotoxinas termolábil

N: neomicina

NA: ácido nalidixico
NM: cepas no móviles
NOR: norfloxacin
O: antígeno somático
OND: no determinada
OR: cepa rugosa
OXD: oxitetraciclina
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate buffered saline)
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rastro TIF: Tipo Inspección Federal
S: estreptomicina
SSF: solución salina con formalina
SSTT: sistema de secreción tipo 3
ST: enterotoxina termoestable
TBE: TRIS-Ácido bórico-EDTA
TLS: tilosina
TSI: Agar de Hierro Tres Azucres
UNA: Unión Nacional de Avicultores
UTI: Urinary tract infection

12. REFERENCIAS

1. Aktan I, Sprigings, KA, La Ragione RM, Faulkner LM, Paiba GA, Woodward MJ. Characterization of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet Microbiol* 2004; 102:43–53.
2. Alonso MZ, Lucchesi PMA, Rogríguez EM, Parma AE, Padola NL. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *F Control* 2012; 23: 351-355.
3. Alonso MZ, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA. Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of chicken slaughtering process. *Poult Sci* 2011; 90: 2638-2641.
4. Altekruze S, Bauer N, Chanlongbutra A, DeSagun R, Naugle A, Schlosser W, Umholtz R, White P. *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chickens, United States, 2000–2005. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(12): 1848-1852.
5. Álvarez-Fernández E, Cancelo A, Dáiz- Vega C, Capita R, Alonso Calleja C. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of Agar disc diffusion and Sensi Test Gram- negative methods. *F Control* 2013; 30: 227-234.
6. Amézquita-López BA, Quiñones B, Cooley MB, León-Felix J, Castro del Campo N, Mandrell RE, Jiménez M, Chaidez C. Genotypic analyses of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 and non O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. 2012; 7: 12.
7. Arzú OR, Peiretti HA, Rolla RA, Walter R. Evaluación de riesgo microbiológico en superficies inertes y vivas de manipuladores en áreas de producción de un supermercado del Nordeste Argentino. *Universidad Nacional del Nordeste* 2000; 17:6-10.
8. Bagheri M, Ghanbarpour R, Alizade H. Shiga toxin and Beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. *Int J Food Microbiol* 2014; 177: 16-20.

9. Barlow RS, Gobius KS, Desmarchelier PM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one year study. *Int J Food Microbiol* 2006; 111(1): 1-5.
10. Bidet, P., P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, N. Brahimi, C. Courroux, P. Grimont, and E. Bingen. 2005. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing hemolytic uraemic syndrome in France. *J. Med. Microbiol.* 54:71–75.
11. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet Microbiol* 1998; 61: 229-235.
12. Bravo E, Gómez L, Cedillo M, Gil C, Avelino F, Castañeda E. Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enf Inf Microbiol* 2007; 27 (3): 70-74.
13. Callaway TR, Anderson RC, Tellez G, Rosario C, Nava GM, Eslava C, Blanco MA, Quiroz MA, Olguin A. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and swine in central Mexico. *J Food Prot* 2004; 67: 2274–2276.
14. Castañeda SMP, Braña VD, Rosario CC, Martínez VW. Calidad microbiológica de la carne de pollo. SAGARPA 2013; 1-90.
15. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid-Borne Genes of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):2138–2140.
16. Chaiba A, Rhazi FF, Chahlaoui A, Zerhouni M. Microbiological quality of poultry meat on the meknès market (Morocco). *Int J Food Safety* 2007; 9: 67-71.
17. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4555-4558.
18. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol* 2011; 11:654-662.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. M2-Disk-Diffusion. Enterobacteriaceae. Vol. 27, January 2007
20. Cortés-Ortiz I, Rodríguez G, Moreno E, Tenorio J, Torres B, Montiel E. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública Mex* 2002; 44: 297-302.
21. Cravioto A, Ortega R, Rodríguez P, Reyes R, López D, Fernández G. Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1985;42:287-296.
22. Croxen MA y Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol* 2010; 8(1):36-38.
23. Dainty RH, Mackey BM. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bact* 1992; 73:103S-114S.
24. Donnenberg, M. S., and T. S. Whittam. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Investig* 2001; 107:539–548.
25. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(10): 2394-2396.
26. Drugdová Z, Kmet V, Bujňáková D. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. *J Food Nutr Res* 2010; 49.
27. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001; 147:1671–1676.
28. Escobar-Páramo P, Sabbagh A, Darlu P, Pradillon O, Vaury C, Denamur E, y Lecointre G, Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Mol Phylogenet Evol* 2004; 30:243–250.

29. Escobar-Páramo, Clermont O, Blanc-Potard A, Bui H, Bouguéneq C, Denamur E. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 2004; 21(6):1085-1094.
30. Estrada- Garcia T, Lopez -Saucedo C, Zamarripa –Ayala B, Thompson M. R, Gutierrez-Cogco, Mancera-Martinez A, Escobar–Gutierrez A. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. In street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City. *Epidemiol Infect* 2004; 132:1181–1184.
31. Estrada-Garcia T, Cerna JF, Thompson MR, Lopez- Saucedo C. Faecal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chili sauces in Mexico and its public health prevalence. *Epidemiol Infect* 2002; 129: 223–226.
32. Farooq SI, Hussain MA, Bhat SA Wani. Isolation of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett. Appl. Microbiol* 2009; 48:692 - 697.
33. Ghanbarpour R, Sami M, Salehi M, Ouromiei M. Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43:153-157.
34. Giammanco GM, Pignato S, Grimont F, Grimont PA, Caprioli A, Morabito S, Giammanco G. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and in France. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4619-4624.
35. Gill CO, Badoni M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rinsing, swabbing or excision of skin. *Food Microbiol* 2004; 22:101-107.
36. Girardeau JP, Dalmaso A, Bertin Y, Ducrot C, Bord S, Livrelli V, Vernozy-Rozand C, Martin C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43, 6098–6107.

37. González TF, Rojas RH. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* 2005; 47(5): 388-390.
38. González NER, 2011. Identificación de *Escherichia coli* diarreogénicas en muestras clínicas (heces) y de alimentos en el estado de Sinaloa (Tesis de maestría). México, Sinaloa, Escuela Superior de Medicina sección de estudios de posgrado e investigación. IPN.
39. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity Island and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:641–679.
40. Hernández CC, Aguilera MG, Castro E. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol* 2011; 31(4): 137-151.
41. Herzer PJ, Inouye SM, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 1990; 172: 6175-6181.
42. Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M, Joerger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *J MicrobiolMeth* 2007; 70: 227–235
43. Huang D, Okhuysen P, Zhi-Dong Jiang, DuPont H, Enterohaggative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Pathogen. *Am J Gastroenterol* 2004; 55(10): 1303–1311.
44. Jana A, Mondal A. Serotyping, pathogenicity and antimicrobial of *Escherichia coli* isolated from raw poultry meat in West Bengal, India. *Vet It* 2013; 49 (4): 361-365.
45. Ji Koo H, Sun Kwak H, Hyeon Yoon S, Jo Woo G. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28:1813-1816.
46. Kaper JB, Nataro JP, y Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:123-140.

47. Kobayashi HT, Pohjanvirta, and S. Pelkonen. Prevalence and characteristics of intimin and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. J Vet Med Sci 2002; 64:1071 – 1073.
48. López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez R, Torres J, Tarr P, y Estrada-García T. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*; Emerg Infect Dis 2003; 9 (1): 127-131.
49. Manoj kr, Saikia D. PCR detection of 'stx 1' and 'stx 2' toxigenic genes in multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* population and phenotypic detection of ESBL producing *Escherichia coli* isolates from local variety of poultry. Int J App Biol Phar Technol 2011; 2 (3): 593-602.
50. Mataragas M, Skandamis PN, Drosinos EH. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/ product combinations. Int J Food Microbiol 2008; 126: 1-12.
51. Mead GC, Dodd CER. Incidence, origin and significance of Staphylococci on processed poultry. J App Bacteriol Symposium 1990; 818-918.
52. Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. Pascual Anderson R, Calderón y Pascual 2° Ed. Editorial Díaz de Santos, Capítulo recuento de microorganismos aerobios mesófilos revivificables. Pags 13-20.
53. Minami A, Chaicumpa W, Chongsa-Nguan M, Samosornsuk S, Monden S, Takeshi K, Makino S, Kawamoto K. Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. Food Control 2010;21: 221–226.
54. Momtaz H, Jamshidi A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Iran: Serogroups, virulence factors, and antimicrobial resistance properties. Poult Sci 2013; 92:1305-1313.
55. Morales DA, 2009. Detección de cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* en aves de traspatio de la comunidad Agua

Escondida del municipio de Centla, Veracruz (Tesis de Maestría). México, D.F FMVZ. UNAM.

56. Moreno E, Prats G, Sabaté M, Pérez T, Johnson JR, Andreau A. Quinolone, fluoroquinolone and TMP/SXT resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 204-211.
57. Nataro JP, KaperJB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11(1):142–201
58. Navarro A, Eslava C, Hernandez U, Navarro-Henze JL, AvilesM, Garcia de la Torre G, Cravioto A. Antibody response to *Escherichia coli* O157 and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 797–801.
59. Navarro A, Eslava C, Perea M, Inzunza A, Delgado G, Morales-Espinosa R, Cheasty T, Cravioto A. New enterovirulent *Escherichia coli* serogroup 64464 showing antigenic and genotypic relationship to Shigella boydii 16. J Med Microbiol 2010; 59:453-461.
60. NOM-194-SSA1-1994 Norma oficial Mexicana, productos y servicios, especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de producto.
61. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli* In: Method of Microbiology vol.14. London: T. Bergen. Academic Press, 1984; 36 (4):43-112.
62. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals, Can J Microbiol 1992; 38(7); 699-704.
63. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing World. Semin Pediatr Infect Dis 2005;16 (2):125-36.

64. Paniagua GL, Monroy E, García-Gonzalo O, Alonso J, Negrete E, Vaca. Two or more enteropathogens are associated with diarrhea in Mexican children. *S. Ann Clin Microbiol Antimicrobials* 2007; 6:1-8.
65. Parashar U, Umesh D, Bresee JS, Joseph S, Glass RI, Roger I, The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bulletin of the World Health Organization* 2003; 81: 236.
66. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Henderson IR. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol* 2008;190:6881–6893.
67. Richardson RI, Mead GC. *Ciencia de la carne de ave*. Zaragoza, España. Acibia, 2001.
68. Rosario CC, López AC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead in shell embryos, and chickens with yolk sac infection. *Avian dis* 2004; 48: 791-802.
69. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis* 2000; 181: 1753-1754.
70. Saénz Y, Zarazaga M, Briñas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, food and humans in Spain. *Int J Antimicrobiol Agents* 2001; 18: 353-358.
71. Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, Tran N, Nguyen D, Whittam TS, Wilson RA. Occurrence of shiga-like toxin- producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(3): 1038-1040.
72. Sánchez RA, Castañeda SMP, Rosario CC. Resistencia antimicrobiana de *E. coli* en México. Convención de la Asociación mundial de veterinarios aviares WVPA, 2013.

73. Schroeder MC, White GD, Ge B, Zhang Y, MaDermott FP, Ayers S, Zhao S, Meng J. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *Int J Food Microbiol* 2003; 85: 197-202.
74. Unión Nacional de Avicultores. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2014. Ed. Dirección de Estudios Económicos. México (D.F)
75. Vidal J, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F, Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena, *Salud Pública Mex* 2007; 49(5): 376-386
76. Vigil K, Jiang Z, Chen J, Palumbo K, Galbadage T, Brown E, Yiang J, Koo H, DuPont M, Ericsson C, Adachi J, y DuPont H. Short Report: Coliform and *Escherichia coli* Contamination of Desserts Served in Public Restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Am J Trop MedHyg* 2009; 80(4): 606–608.
77. Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties,. *Rev Latinoam de Microbiol* 2005; 47(3-4): 140-159.
78. Walk TS, Alm WE, Calhoun ML, Mladonicky MJ, Whittam ST. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol* 2007; 9:2274-2288.
79. Yun Lee GY, Jang HI, Hwang IG, Suk M; Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *Int J Food Microbiol* 2009; 134: 196–200.
80. Zhao C, Ge B, Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White DG, Wagner D, Meng J. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(12): 5431-5436.
81. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli TG. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (5): 508-513.

82. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional Enteropathogenic *E. Coli* O Serogroups- a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(6): 545-552.

13. ANEXOS CUADROS

Cuadro 1. Secuencia utilizadas para la amplificación de diferentes genes de virulencia asociados a los grupos diarregénicos de *E. coli*.

GPO	GEN	NÚMERO DE BASES	AMPLICÓN (pb)	SECUENCIA	REFERENCIA
ETEC	<i>lt</i>	20	450	F.5' ggc gac aaa tta tac cgt gc 3'	López-Saucedo (2003)
		20		R.5' cgg tct cta tat tcc ctg tt 3'	
	<i>st</i>	21	190	F.5' att ttt ctt tct gta ttg tct t3'	López-Saucedo (2003)
		20		R.5' cac ccg gta caa gca gga tt3'	
EPEC	<i>bfpA</i>	21	324	F.5' aat ggt gct tgc gct tgc tgc3'	López-Saucedo (2003)
		21		R.5' gcc gct tta tcc aac ctg gta3'	
	<i>eaeA</i>	20	384	F.5' gac ccg gca caa gca taa gc3'	López-Saucedo (2003)
		20		R.5' cca cct gca gca aca aga gg3'	
EHEC	<i>stx1</i>	22	150	F.5' ctg gat tta atg tgc cat agt g3'd	López-Saucedo (2003)
		21		R.5' aga acg ccc act gag atc atc3'	
	<i>stx2</i>	21	255	F.5' ggc act gtc tga aac tgc tcc3'	López-Saucedo (2003)
		21		R.5' tgc cca gtt atc tga cat tct g3'	
EIEC	<i>IpaH</i>	24	446	F.5' tct cgg cac gtt tta ata gtc tgg 3'	Navarro (2010)
23	R.5' taa atc tgc ggg ccg tgg tag tc3'				
EAEC	<i>aggR</i>	20	308	F. 5' cta att gta caa tgc atg ta 3'	Huang (2007)
		18		R. 5' atg aag taa ttc ttg aat 3'	
	<i>Aap</i>	20	232	F.5' tat tat att gtc aca agc tc 3'	Huang (2007)
		19		R.5' ctt ttc tgg cat ctt ggg t3'	

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la amplificación de genes de virulencia.

	EAEC		EPEC		ETEC		EIEC		STEC	
	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>bfp</i>	<i>eaeA</i>	<i>ltA</i>	<i>st</i>	<i>ipaH</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	
Agua ultrapura	11.3µl	11.3 µl	17.35µl	17.2µl	12.7µl	17.2µl	12.7µl	18.2µl	17.2µl	
Buffer 10 x	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	
MgCl ₂ (50mM)	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	0.75 µl	1.5 µl	
dNTPs (100mM)	2.5 µl	2.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	5 µl	0.5 µl	5 µl	0.25 µl	0.5 µl	
Iniciador(F)	2.5 µl	2.5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	
Iniciador(R)	2.5 µl	2.5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	
Taq (5U/µl)	0.2 µl	0.2 µl	0.15 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	
ADN	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	
Vol total	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	

Cuadro 3. Condiciones del termociclador para cada PCR en la búsqueda de genes de virulencia y grupos filogenéticos.

Etapa	Genes a determinar									
	EAEC	EPEC		ETEC		EIEC	STEC		Filogenia	
	<i>aggR</i>	<i>aap</i>	<i>bfpA</i>	<i>eaeA</i>	<i>ltA</i>	<i>St</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , TspE4
Desnaturalización inicial	94°C 5min	94°C 5min	95°C 5min	95°C 1 min	94°C 2min	95°C 5 min	94°C 5 min	95°C 5 min	94°C 1 min	94°C 4 min
Ciclos	30	30	30	30	35	40	30	30	25	30
Desnaturalización	94°C 1min	94°C 1min	72°C 2min	95°C 1 min	95°C 1min	95°C 45s	94°C 2min	94°C 50s	94°C 1min	94°C 30s
Alineación	42°C 1min	52°C 1min	94°C 30seg	55°C 1 min	53°C 1min	50°C 45s	58.6°C 1min	56°C 40s	55°C 1min	59°C 30s
Extensión	72°C 1min	72°C 1min	56°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 45s	72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 30s
Última extensión	72°C 7min	72°C 7min	72°C 8 min	72°C 7 min	72°C 7min	72°C 10min	72°C 7min	72°C 5min	72°C 5min	72°C 5 min

*Los controles positivos utilizados para los genes *eaeA*, *bfpA*: IB00410, *lt*, *st*: H10407, *stx1*, *stx2*: E32511, *ipaH*: *boydii* 16, *aggR*, *aap*: EAEC O42.

Cuadro 4. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 para grupos filogenéticos.

	PCR múltiple Filogenia
Agua ultrapura	13.2µl
Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (50nM)	0.75 µl
dNTPs (100mM)	2.5 µl
ChuA 1	0.8 µl
ChuA 2	0.8 µl
Yja.1	0.8 µl
Yja.2	0.8 µl
TspE.1	0.8 µl
TspE.2	0.8 µl
Taq	0.3 µl
ADN	1 µl
Vol total	25 µl

Cuadro 5. Secuencia de iniciadores para la identificación de los grupos filogenéticos

Gen o fragmento de ADN	Función	Nombre	Secuencia de iniciadores 5'-3'	Amplicón (pb)
chuA	Gen necesario para el transporte del grupo hemo en O157: H7de <i>E. coli</i> EHEC.	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
		ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
yjaA	Gen identificado en el genoma de <i>E. coli</i> K-12, (no se conoce su función).	YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
		YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TSPE4.C2.	Asociado a cepas que causan meningitis neonatal. Fragmento de 14.9kb.	TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA'	152
		TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Clermont *et al.*, (2000)

Cuadro 6. Serogrupos de *E. coli* obtenidos de canales muestreadas en rastro y puntos de venta.

SEROGRUPOS	Rastro	Supermercado	Mercado público	TOTAL
O8	9		2	11
O7	1	7	1	9
O48	2	5	2	9
O7	2	5	2	9
O103	4	4		8
O11	7		1	8
O15	3	1	4	8
O6		6	1	7
O53	2	4		6
O36	3	1	2	6
O5			5	5
O66		3		3
O40	2	1		3
O23		3		3
O129		2	1	3
O172			3	3
O9			3	3
O20			3	3
O166	3			3
O84	3			3
O3		1	2	3
O118		2		2
O140	1		1	2
O138			2	2
O184			2	2
O78	2			2
O150	1		1	2
O153	2			2
O88, O165, O99, O26, O71		5*		5
O85, O45, O128ab, O73, O154, O157, OR, O102, O65, O111ab, O35, O127			12*	12
O119, O4, O167	3*			3
TOTAL	50	50	50	150

*un aislamiento por cada serogrupo

Cuadro 7. Porcentaje total de serogrupos de *E. coli* obtenidos en el estudio sin considerar los puntos de muestreo.

AISLAMIENTO		
SEROGUPOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
O8	11	7.33
O7	9	6.00
O48	9	6.00
O?	9	6.00
O103	8	5.33
O11	8	5.33
O15	8	5.33
O6	7	4.67
O53	6	4.00
O36	6	4.00
O5	5	3.33
O66, O40, O23, O129, O172, O9, O20, O166, O84, O3	3*	2.00 *
O118, O140, O138, O184, O78, O150, O153	2*	1.33*
O88, O165, O85., O45, O128ab, O73, O154, O157, OR, O119, O4, O167, O99, O102, O65, O111ab, O35, O127, O26, O71	1*	0.67*
TOTAL	150	100

*Para cada serogrupo

Cuadro 8. Total de serotipos de *E. coli* aislados y su ocurrencia en canales de pollos.

SEROTIPOS	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)	No. Aves
O103:H21	8	5.33	5
O11:H6	8	5.33	5
O7:H4	7	4.67	4
O8:H9	5	3.33	3
O48:H51	4	2.67	4
O53:H19	4	2.67	1
O6:H16	4	2.67	2
O84:H20	3	2.00	2
O15:H16	3	2.00	2
O15:H49	3	2.00	2
O166:H16	3	2.00	3
O172:H20	3	2.00	2
O36:NM	3	2.00	1
O5:H10	3	2.00	3
O8:H53b	3	2.00	1
O9:H21	3	2.00	1
O66:H51	3	2.00	1
O20:H4	3	2.00	1
O129:NM, O?:H?, O?:H10, O?:H21, O153:H34, O3:H16, O40:H34, O53:H49, O78:H21, O6:H49	2	1.33*	2*
O138:NM, O118:H29, O23:H10, O36:H34, O48:H1, O5:H42, O48:H28	2	1.33*	1*
O48:H20, O99:H48, OR:NM, O8:19, O8:H21, O8:H51, O85:H51, O88:H8, O71:H?, O73:H34, O7:H17, O7:H18, O6:NM, O65:H10, O45:H10, O4:H21, O40:H?, O36:H4, O32:H10, O35:NM, O26:H25, O3:H?, O184:H7, O184:NM, O15:H6, O150:H?, O150:H20, O140:NM, O15:H19, O154:H25, O165:NM, O167:H21, O119:H27, O127:H21, O128ab:H26, O129:H30, O?:H51, O?:H9, O?:NM, O102:H6, O111ab:H?, O157:NM	1	0.67*	1*
Total	150	100	

*Para cada serotipo

Cuadro 9. Serogrupos encontrados por lugar de muestreo asociados a patotipos diarreogénicos de *E. coli*.

Lugar de muestreo	ETEC	STEC	EPEC	EAEC	EIEC
RASTRO	O8, O78, O153, O166,	O11, O103, O84, O36, O53, O48, O140, O4	O15, O119, O7	O7, O15	O167
MERCADOS PÚBLICOS	O9, O8, O6, O20,	O5, O172, O138, O36, O48, O6, O73, O157, O128ab	O15, O20, O7, O111ab, O127,	O15, O3, O7	
SUPERMERCADOS	O6, O23, O88, O99	O6, O48, O103, O53, O118, O165, O26, O36,	O7, O26	O7, O3, O15	

Cuadro 10. Resultados globales del análisis sobre el origen de las cepas de *E. coli*, grupos filogenéticos, serotipo y genes de virulencia.

ORIGEN	GEN DE VIRULENCIA	GRUPO FILOGENÉTICO	SEROTIPO	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA
RASTRO	<i>eae</i> (+)	B1	O150:H7	NA, L, TLS, ENR, DXP, NOR, OXD.
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	D	O26:H25	CXM, L, FO, AMP, CTX, TLS, ENR, DXP, NOR, OXD, NA y CRO
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	A	O?:NM	L, FO, AMP, CTX, TLS, N, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA y CRO
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	B1	O71:H7	NA, OXD, DXP, TLS, ENR, NOR
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	D	O40:H7	NA, OXD, DXP, TLS, ENR, NOR
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	A	O6:H16	CXM, L, AMP, CTX, TLS, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA, CRO
SUPERMERCADO	<i>stx2</i> (+)	D	O36:H4	CXM, L, FO, AMP, CTX, TLS, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA, CRO
MERCADO PÚBLICO	<i>eae</i> (+)	D	O111ab:H7	TLS, DXP, CRO, OXD, L, CTX, AMP, CXM
MERCADO PÚBLICO	<i>eae</i> (+)	B1	O7:H17	L, FO, AMP, TLS, N, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA
MERCADO PÚBLICO	<i>eae</i> (+)	D	O15:H6	TLS, DXP, OXD, L, S, NA, ENR, NOR, FO
MERCADO PÚBLICO	<i>stx2</i> (+)	D	O138:NM	L, FO, AMP, CTX, TLS, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA y CRO
MERCADO PÚBLICO	<i>stx2</i> (+)	D	O138:NM	L, FO, AMP, CTX, TLS, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA y CRO
MERCADO PÚBLICO	<i>eae</i> (+)	D	O102:H6	NA, DXP, TLS, ENR, NOR, L, OXD, FO
MERCADO PÚBLICO	<i>eae</i> (+)	B1	O184:H7	NA, DXP, TLS, L, OXD, NOR

Cuadro 11. Grupos filogenéticos de cepas de *E. coli* aisladas de canales de pollo de rastro, mercados públicos y supermercados.

GRUPO FILOGENÉTICO	Rastro	Mercados públicos	Supermercados	TOTAL	PORCENTAJE (%)
A	11	20	17	48	32
B1	22	17	22	61	40.67
B2		4	1	5	3.33
D	17	9	10	36	24
TOTAL	50	50	50	150	100

Cuadro 12. Perfiles de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de canales de pollo de rastro, mercados públicos y supermercados.

Antibiótico	Num de cepas
CXM, L, FO, AMP, CTX, TLS, N, S, ENR, DXP, NOR, OXD, NA, CRO	7
ENR, TLS, CRO, L, FO, S, CTX, AMP, NA, CXM	2
ENR, TLS, CRO, OXD, L, AMP, NA	1
ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, AMP, NA, N	1
ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA, CXM, N	1
ENR, TLS, DXP, L, FO, NA	1
ENR, TLS, DXP, OXD	1
ENR, TLS, DXP, OXD, FO, NA	2
ENR, TLS, DXP, OXD, FO, NA, N	1
ENR, TLS, DXP, OXD, NA	1
ENR, TLS, DXP, OXD, S, AMP, NA, N	1
NOR, ENR, TLS, CRO, L, CTX, AMP, NA	1
NOR, ENR, TLS, CRO, L, CTX, AMP, NA	1
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, CTX, AMP, NA, CXM,	5
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, CTX, AMP, NA, CXM, N	1
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, CTX, AMP, NA, CXM,	5
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, CTX, AMP, NA, CXM, N	5
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, AMP, NA	1
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA,	4
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA, CXM,	9
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA, N	1
NOR, ENR, TLS, DXP, CRO, OXD, L, S, CTX, AMP, NA, CXM,	3
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, FO, AMP, NA	1
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, FO, NA,	1
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, AMP, NA	10
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, AMP, NA, N	1
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, NA,	6
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, S, NA,	1
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, S, AMP, NA,	4
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, S, AMP, NA, N	6
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA,	1
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, FO, S, CTX, AMP, NA, CXM,	2
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, L, NA	6
NOR, ENR, TLS, DXP, OXD, NA,	2
NOR, ENR, TLS, L, FO, AMP, NA	1
NOR, ENR, TLS, OXD, L, NA,	2
NOR, TLS, DXP, OXD, L, FO, NA, CXM	1
TLS, DXP, CRO, OXD, L, CTX, AMP, CXM	1
TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, CTX, AMP, NA, CXM,	1
TLS, DXP, CRO, OXD, L, FO, CTX, AMP, NA, CXM, N	3
TLS, DXP, OXD, L, FO, AMP	3
TLS, DXP, OXD, L, FO, NA	2
TLS, DXP, OXD, L, FO, NA, N	1
TLS, DXP, OXD, L, FO, S, AMP	3
TLS, OXD, L, FO, S, AMP,	2

FIGURAS

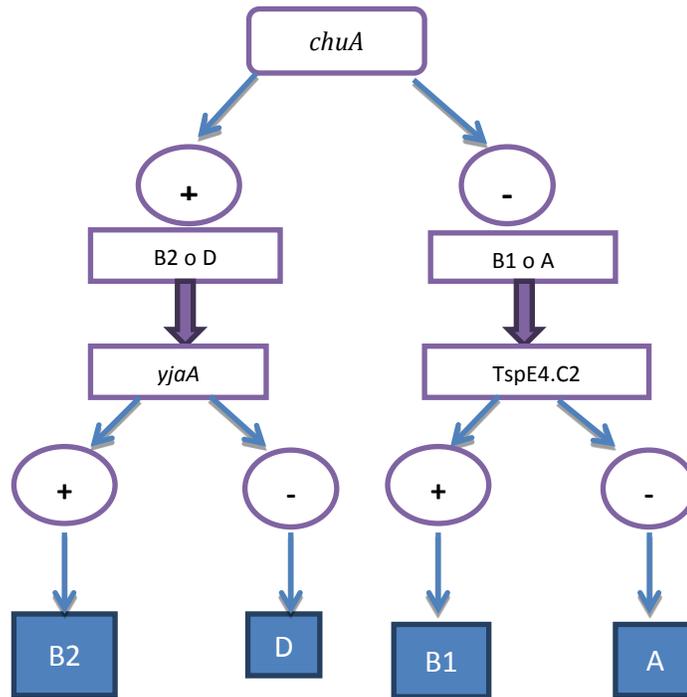


Figura1. Determinación de grupos filogenéticos en aislamientos de *E. coli* con la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN TSPE4.C2. (Clermont *et al.*, 2000).

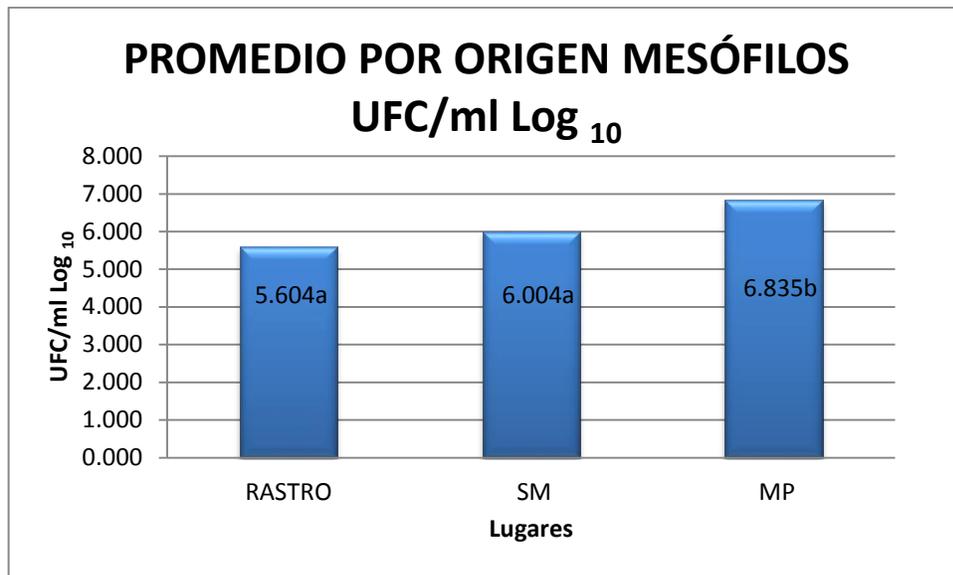


Figura 2. Promedio de mesófilos aerobios en canales de pollo de rastro y puntos de venta. *Literales iguales nos indica que no existe diferencia estadística significativa ($P>0.05$)

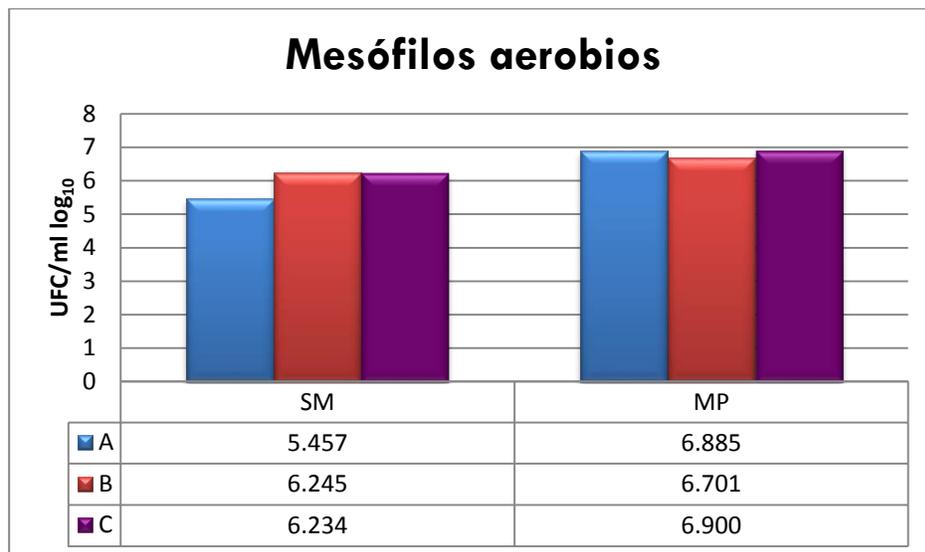


Figura 3. Promedio de mesófilos aerobios en canales de pollo en puntos de venta.

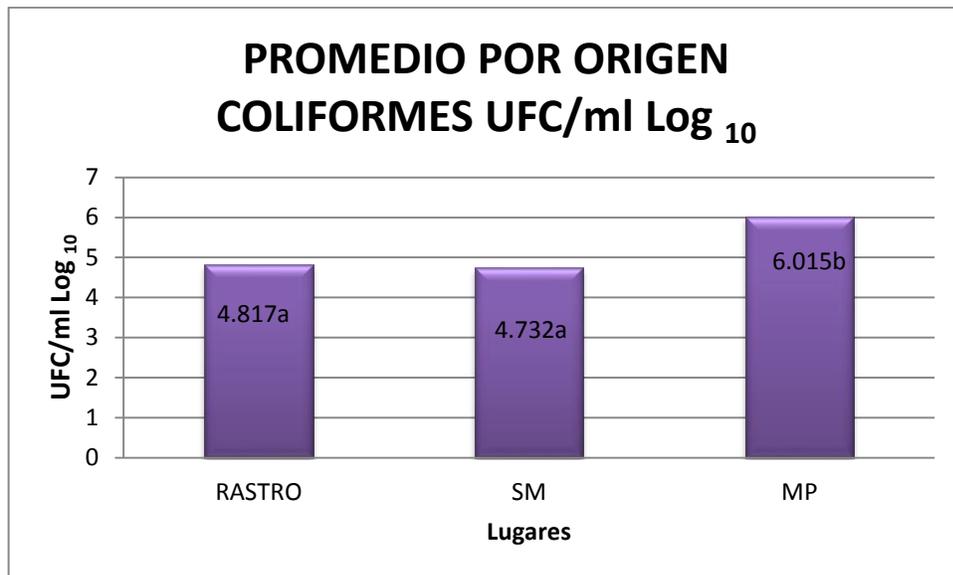


Figura 4. Promedio de coliformes totales en canales de pollo de rastro y puntos de venta.
**Literales iguales nos indica que no existe diferencia estadística significativa ($P > 0.05$)*

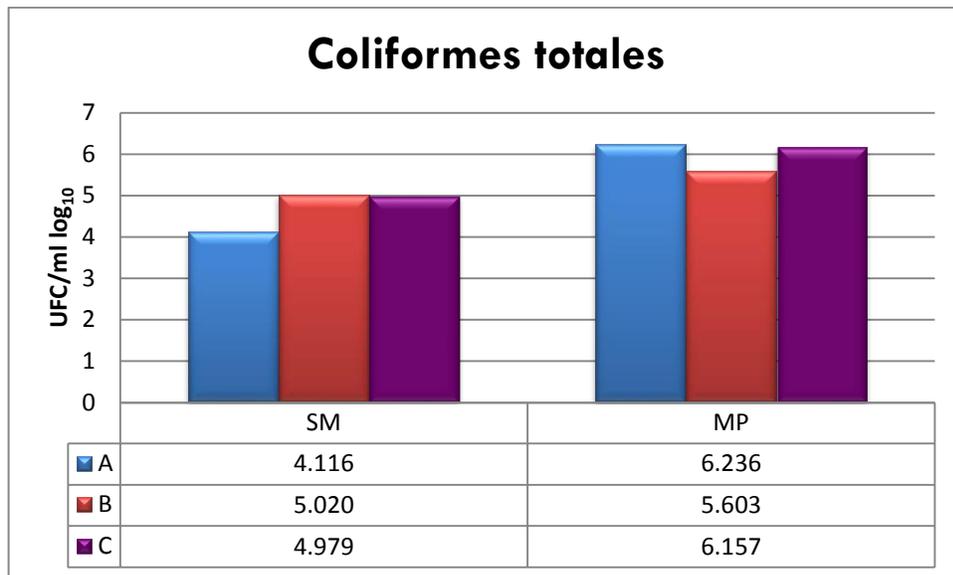


Figura 5. Promedio de coliformes totales en canales de pollo en puntos de venta.

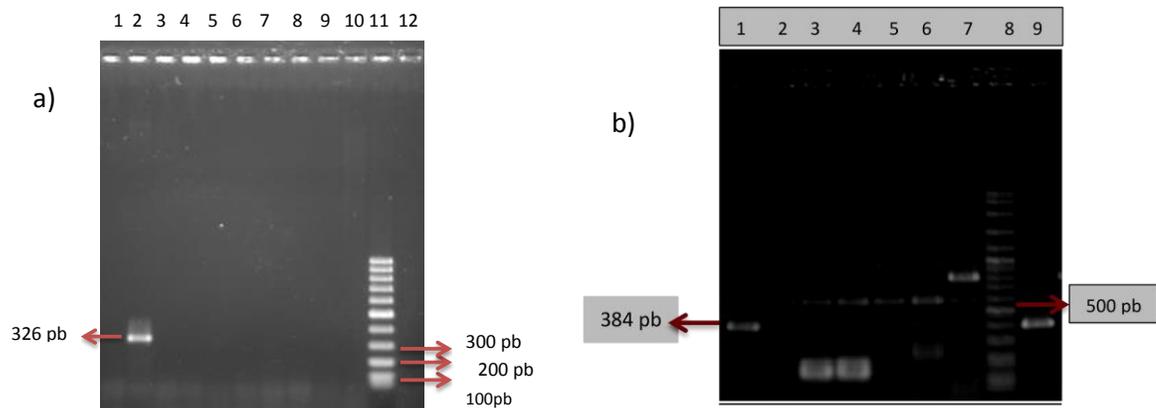


Figura 6. a) Amplificación del gen *bfpA*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 2 control positivo gen *bfp*: EPEC; carril 3-10 aislamientos negativos; Carril 11 marcador de peso molecular 100pb; carril 10 control negativo. b) Amplificación del gen *eaeA*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 1 control positivo gen *eaeA*: EPEC; carril 2-7 aislamientos negativos; Carril 8 marcador de peso molecular 100pb; carril 9 aislamiento positivo.

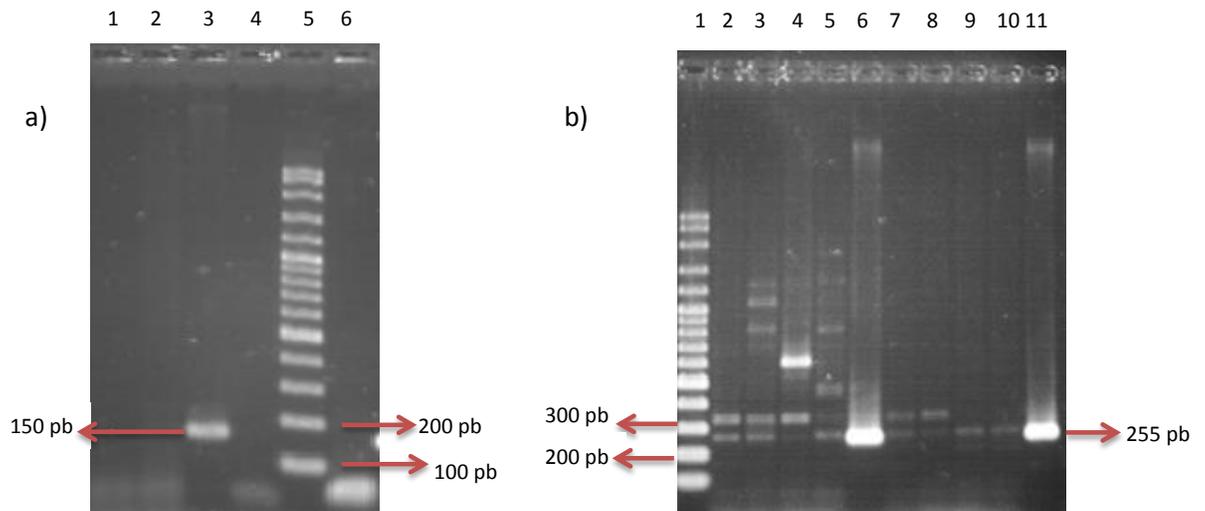


Figura 7. a) Amplificación del gen *stx1*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 3 control positivo gen *stx1*: STEC; carril 1, 2, 4 aislamientos negativos; Carril 5 marcador de peso molecular 100pb; carril 6 control negativo. b) Amplificación del gen *stx2*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 6, 11 control positivo gen *stx2*: STEC; carril 2, 3, 5 aislamientos positivos; Carril 1 marcador de peso molecular 100pb.

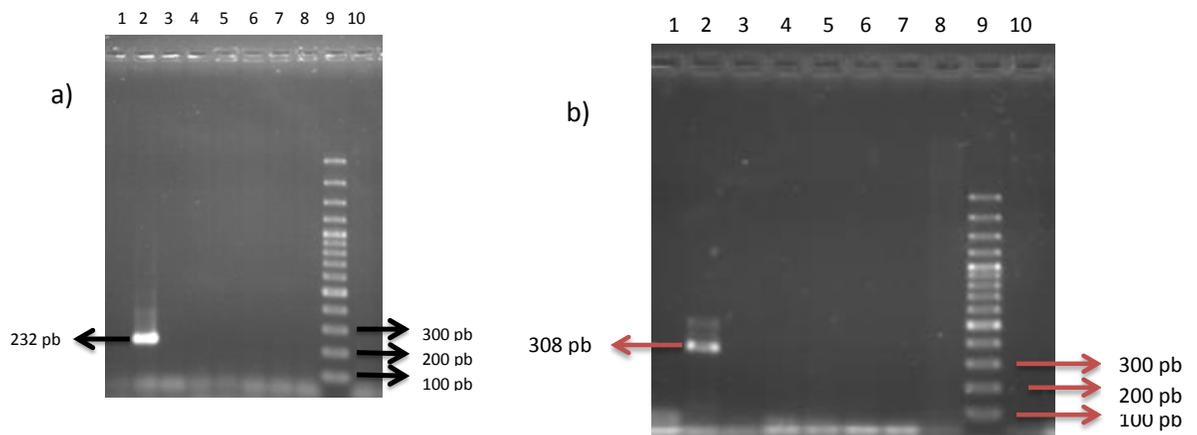


Figura 8. a) Amplificación del gen *aap*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 2 control positivo gen *aap*: EAEC; carril 3-8 aislamientos negativos; Carril 9 marcador de peso molecular 100pb; carril 10 control negativo. b) Amplificación del gen *aggR*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 2 control positivo gen *aggR*: EAEC; carril 3-7 aislamientos negativos; Carril 9 marcador de peso molecular 100pb; carril 8 control negativo.

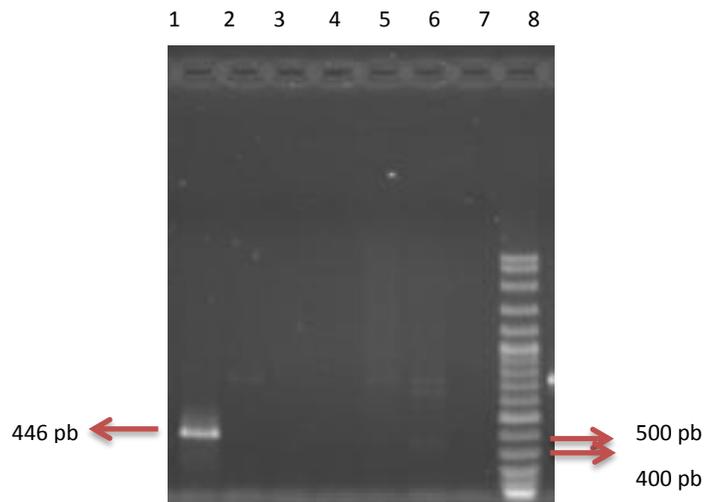


Figura 9. Amplificación del gen *ipaH*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 1 control positivo gen *ipaH*: EIEC; carril 2-6 aislamientos negativos; Carril 8 marcador de peso molecular 100pb; carril 7 control negativo.

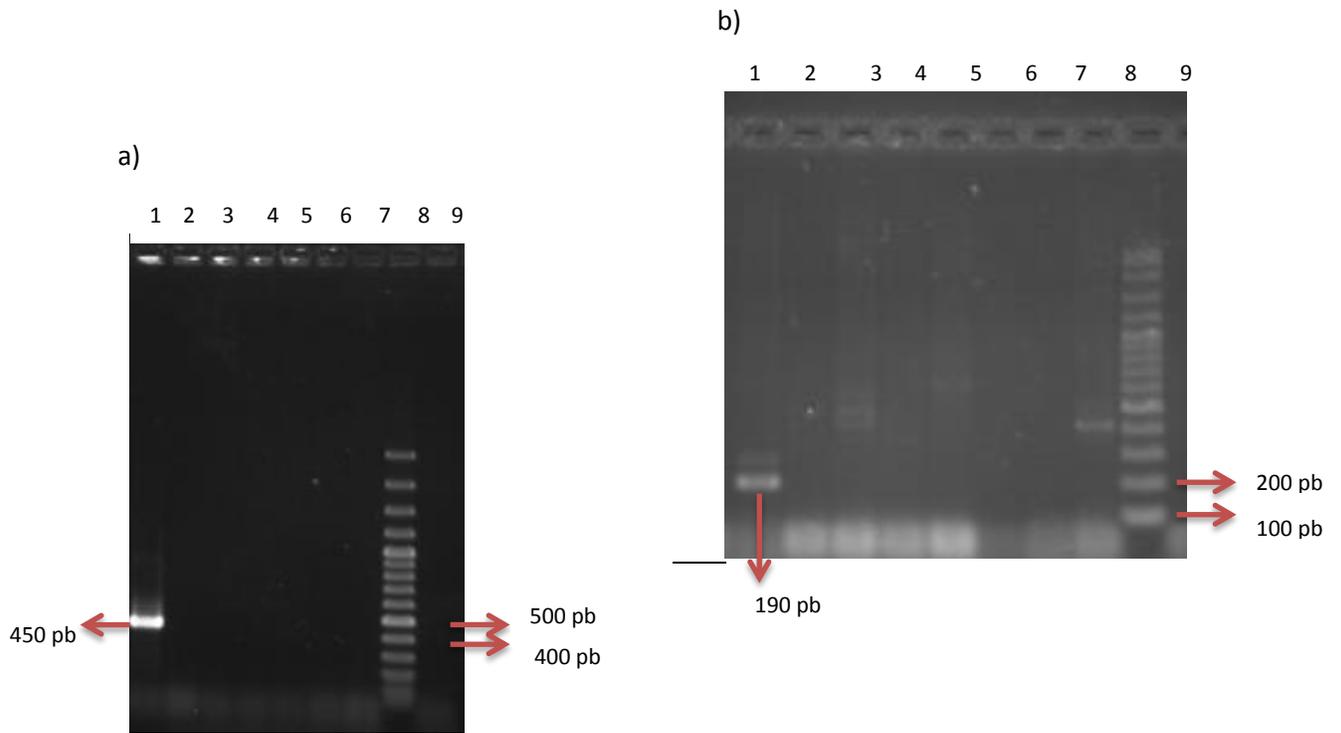


Figura 10. a) Amplificación del gen *lt*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 1 control positivo gen *lt*: ETEC; carril 2-7 aislamientos negativos; Carril 8 marcador de peso molecular 100pb; carril 9 control negativo. b) Amplificación del gen *st*. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 1 control positivo gen *st*: ETEC; carril 2, 3, 4, 5, 7, 8 aislamientos negativos; Carril 9 marcador de peso molecular 100pb; carril 6 control negativo.



Figura 11. Porcentaje de grupos filogenéticos de las cepas aisladas de canales de pollo de rastro y puntos de venta.

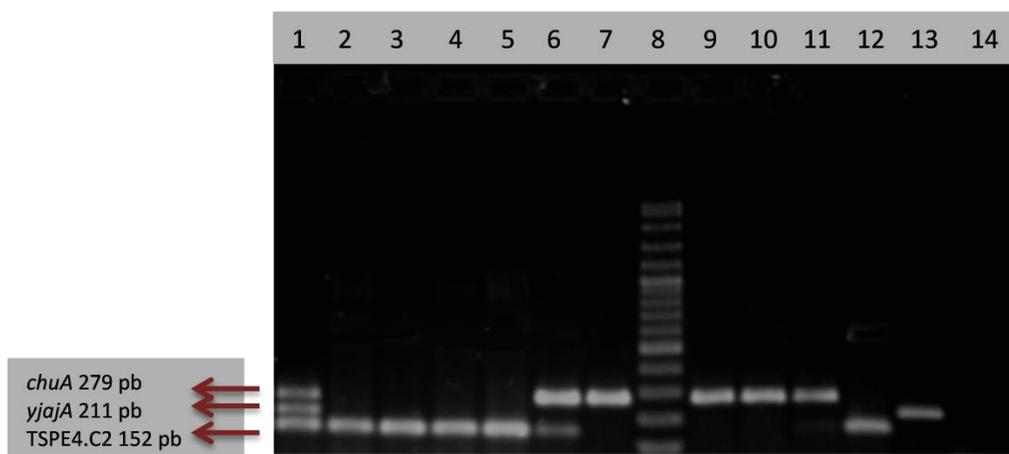


Figura 12. Amplificación de los genes *chuA*, *yjajA* y TSPE4.C2 para las secuencias de los grupos filogenéticos. Gel de agarosa al 1.2% teñido con Gelred. Carril 1 control positivo, carril 8 marcador de peso molecular 100pb, carril 2-5, 12 corresponden al grupo filogenético B1 presenta TSPE4.C2, Carril 6 grupo filogenético D presenta *chuA* y TSPE4.C2, carril 7, 9-11 grupo filogenético D presenta *chuA*, carril 13 grupo filogenético A presenta *yjajA*, carril 14 control negativo.

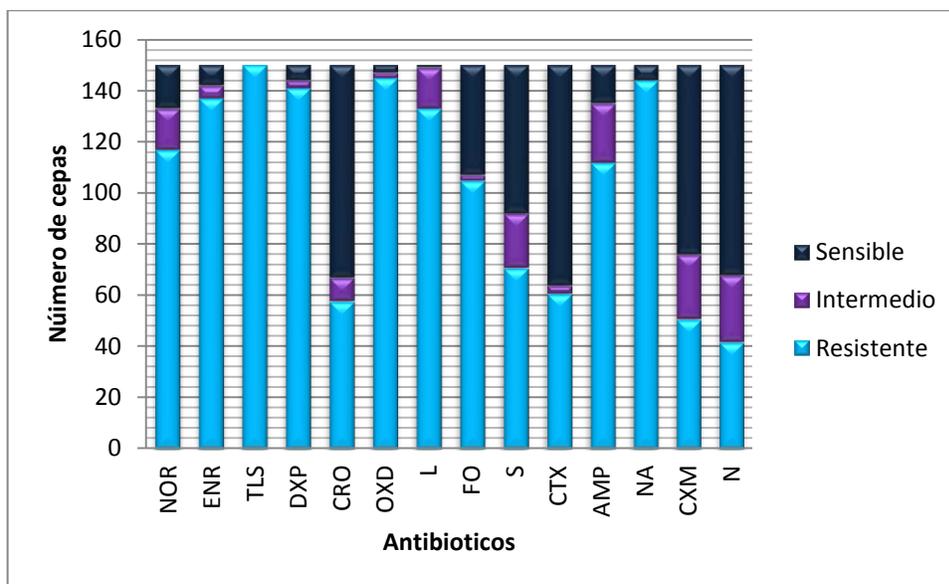


Figura 13. Resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de canales de pollo de rastro y puntos de venta.

