

## **Prevalencia de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* 0157:H7 en alimentos crudos en la Ciudad de Puebla**

A. López., A.C. Ruiz., C. Cabrera., G. León. y F. Tejeda

A. López., A.C. Ruiz., C. Cabrera., G. León. y F. Tejeda

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología. C.P. 72570.

alma.lopez@correo.buap.mx

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

## Abstract

Gastrointestinal diseases are a problem among Mexican population and worldwide, because they can be transmitted by contaminated food or mismanagement and manipulation. Ignorance of the causal agent of these diseases can result in an incorrect treatment to the patient, the emergence of resistant microorganisms or a complication of the disease that can lead to death. It is for these reasons that the present work is focused on identifying the most common causative agents of gastroenteritis, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in raw food in the city of Puebla, and thus be able to propose measures for the control of these diseases. In analyzed samples of meat of different presentations, the percentage recovery of strains of *Salmonella* spp. was 22.7 % while the recovery of *E. coli* O157:H7 was 1.66 %. In the different samples of vegetables the recovery percentage for *Salmonella* spp. And *E. coli* O157:H7 was 2.5 %. The presence of *Salmonella* spp. or *E. coli* O157:H7 wasn't demonstrated in egg samples.

## 23 Introducción

En México, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) afectan principalmente a los sectores de la población más susceptibles, estas enfermedades se asocian con el consumo de alimentos contaminados. La característica más común de las ETA's de origen microbiano es el síndrome diarreico; en otras, como la neurocisticercosis, la micotoxicosis, la brucelosis, la listeriosis y la faringitis estreptocócica, no suele presentarse (Fernández, et al. 2000).

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008), señalan que más del 70% de las gastroenteritis, se atribuyen al consumo de alimentos contaminados. De acuerdo a la Dirección General de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en nuestro país anualmente se presentan 5, 507 518 casos de gastroenteritis (OMS, 2010). Esta cifra, según expertos de la OMS, representa sólo entre el 1 y 3% de los casos reales. Con frecuencia entre los sitios mayormente involucrados con brotes de ETA's destacan: restaurantes, escuelas, hospitales e incluso el propio hogar, debido principalmente a la deficiente manipulación y aplicación de malas prácticas higiénicas al momento de su obtención, transporte, almacenamiento, preparación y servicio de alimentos, convirtiéndose así en vehículos de agentes patógenos, principalmente de origen microbiano (Castro, et al. 2012; Muller, 1981 y Rosas, et al. 2001).

Tradicionalmente, los alimentos implicados en brotes de ETA's son carnes, aves pescados y mariscos deficientemente cocinados o leche no pasteurizada. De manera particular, los productos cárnicos, que son procesados manualmente, constituyen un excelente medio de cultivo, ya que presentan un elevado porcentaje de humedad, pH próximo a la neutralidad, composición rica en nutrientes que favorecen el establecimiento, supervivencia e incluso la multiplicación de un gran número de microorganismos capaces de provocar ETA's en humanos. Según datos obtenidos por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades, señalan a los productos de origen animal, como los principales vehículos de patógenos bacterianos como *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Yersinia* (CDC, 2011).

Por ejemplo las condiciones sanitarias deficientes durante la matanza de los animales, un almacenamiento inadecuado y una higiene precaria durante la preparación de los productos cárnicos, son factores que favorecen la contaminación de los alimentos y, por lo tanto, un incremento de riesgo a la salud del consumidor. En este sentido la carne molida de res, de amplia aceptación en nuestro país, constituye un medio ideal para el desarrollo de microorganismos (López, et al. 2009).

A pesar de que los huevos frescos con el cascarón intacto se consideran estériles, hoy en día se sabe que éstos pueden contener a *Salmonella* spp. por lo que se consideran "alimentos potencialmente peligrosos" (Pesaresi, 2003).

Tal es el caso del huevo cocido utilizado en la elaboración de ensaladas, que se han visto involucrados en brotes de ETA's asociados a *Salmonella enteritidis*, *Cyclospora* y *Escherichia coli* O157:H7 (Buzby, 2001). Existen reportes que demuestran que el número de huevos contaminados es alrededor de 2.7 millones anualmente en USA.

La población está interesada en consumir alimentos libres de patógenos. Y la inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que, junto con las nutricionales, las organolépticas y las comerciales, componen la calidad total de los alimentos. En Estados Unidos se ha reportado que la salmonelosis es la segunda causa de ETA's de origen bacteriano y la gran mayoría de estas enfermedades está asociada con el consumo de productos como carne, aves de corral, huevos, leche, mariscos, frutas y verduras contaminados con *Salmonella* (Foley, et al. 2008).

Actualmente, en nuestro país la incidencia real de las ETA's es desconocida, debido a que no se denuncian ante las autoridades sanitarias, aquellos casos de enfermedades originadas por el consumo de alimentos contaminados.

Aunado a esto, el frecuente aislamiento de cepas de *Salmonella* spp. que presentan resistencia a uno o varios antimicrobianos a partir de fuentes humanas, es considerado como alarmante y se ha constituido como un importante problema de salud pública. Se han presentado brotes de salmonelosis humana causados por cepas resistentes en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Canadá, Gran Bretaña, África, India y Brasil. En muchos de estos acontecimientos, el origen de las cepas estuvo asociado con animales, y en algunos casos, a alimentos consumidos por estos últimos (López, et al. 2009).

Diversos reportes han mostrado un incremento en la emergencia de *Salmonella* y *E. coli* con niveles significativos de resistencia a los antimicrobianos (Duffy, et al. 2005 y Musgrove, et al. 2006). En adición a la automedicación terapéutica, en veterinaria y en agricultura se aplican antimicrobianos de manera indiscriminada (Miko, et al. 2005 y Puig, et al, 2011).

Aunque existe controversia respecto a si es el ambiente animal o en el humano donde se generan primordialmente las cepas resistentes, se reconoce que en ambos se dan condiciones para su surgimiento y persistencia. Se considera, por otra parte, que el empleo de dosis subterapéuticas de antimicrobianos en la dieta animal con fines profilácticos o para promover su desarrollo, es una práctica que fomenta la aparición y diseminación de cepas resistentes en el medio ambiente y en la cadena alimentaria.

*E. coli* es la especie predominante entre las diversas bacterias anaerobias facultativas que constituyen parte de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente.

El significado de su presencia en los alimentos debe ser evaluado sobre dos vertientes: como indicador de una contaminación de origen fecal, y otra como indicativo de la posible presencia de agentes enteropatógenos para humanos y animales (Kasnowski, et al. 2008 y McCollum, et al. 2012).

Por ello, los esfuerzos para el control de las infecciones por los diferentes patotipos de *E. coli* y *Salmonella* spp deberían enfocarse en detectar a las bacterias en alimentos y en capacitar a las personas involucradas en la preparación de alimentos y en el correcto manejo de los mismos.

La prevención efectiva de las ETA's, se sustenta primariamente en el conocimiento de la ecología de los microorganismos implicados y de la epidemiología del padecimiento que provocan.

Aunque algunas acciones de carácter general tienen valor práctico, es esencial considerar las características que le son propias a cada agente patógeno para diseñar acciones específicas que conduzcan a su control efectivo. La información requerida se refiere en general a las fuentes y mecanismos de contaminación y de los factores ecológicos que determinan su comportamiento en los alimentos y en el medio ambiente. Adicionalmente el conocer la multirresistencia que han desarrollado algunos agentes patógenos bacterianos, facilitará y promoverá la ejecución de trabajos que generen una mayor información en nuestro Estado y en nuestro País.

El objetivo del trabajo fue investigar la presencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos crudos: carne molida de res, huevos, frutas y verduras, adquiridos en diferentes mercados y supermercados de la ciudad de Puebla, Pue., Méx., aplicando los procedimientos descritos en las Normas Oficiales Mexicanas, por organismos internacionales (FAO, USDA, FDA) y el uso de técnicas de biología molecular (PCR) para la identificación de las bacterias aisladas, así como determinar la resistencia a antibióticos y el efecto de los factores físicos.

### 23.1 Materiales y métodos

Se recolectó un total de 360 muestras distribuidas de la siguiente manera: 180 muestras de carne (75 muestras de carne molida de res, 35 muestras de carne cruda de cerdo, 35 de res y 35 de pollo) adquiridas en mercados públicos y carnicerías establecidas de la ciudad de Puebla y Atlixco; 100 muestras de huevo, (50 muestras adquiridas en mercados populares y 50 en granjas); 80 muestras de verduras (20 de lechuga de supermercado, 20 de lechuga y 20 de pepinos de mercados populares y 20 muestras de cilantro, obtenidas en taquerías ambulantes, ubicadas en la zona sur de la Ciudad de Puebla).

Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración, en un lapso no mayor de 3 a 4 horas, para investigar la presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.

Para la investigación de *Salmonella* spp., los análisis microbiológicos se realizaron mediante los métodos oficiales descritos en las NOM (Secretaría de Salud, 1994<sup>a</sup> y Test *Salmonella*, Merck), y la FDA (Food & Drug Administration, 2001).

Se pesaron asepticamente 25 g de cada muestra y se procedió a la homogenización en 225 mL de caldo lactosado (Bioxon), se incubó durante  $24 \pm 2$  h a 35°C.

Luego se transfirió una alícuota de 1 mL del crecimiento en caldo lactosado a tubos conteniendo 10 mL de caldo selenito de sodio (Bioxon), caldo tetracionato sin verde brillante (Bioxon) adicionado de una solución yodo-yoduro y Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Difco™). Se incubaron  $42 \pm 2$  h a 35°C, para favorecer el crecimiento de *Salmonella* e inhibir a otras bacterias presentes en las muestras. Se realizó la inoculación en placas de agar *Salmonella* y *Shigella* (Bioxon), agar verde brillante (Bioxon), agar XLD (Bioxon) y agar sulfito de bismuto (Bioxon).

Se incubaron  $24 \pm 2$  h a 35°C, posteriormente se examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* sp. colonias lactosa negativa y productoras de H<sub>2</sub>S; para la identificación bioquímica se utilizaron los ensayos primarios catalasa, oxidasa (BBL) y las pruebas complementarias como: agar de hierro y triple azúcar TSI (Bioxon), agar de hierro y lisina LIA (Bioxon), medio MIO (Bioxon) agar citrato de Simmons (Bioxon) y agar urea (Bioxon) y confirmación serológica utilizando sueros polivalentes fabricados por el InDRE-SSA. Para la interpretación de los resultados se informó: presencia o ausencia de *Salmonella* sp.

La detección de *E. coli* O157:H7, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por la FDA, Rivas y col., 2008 (Food & Drug Administration, 2001, Rivas, et al. 2008 y Test Merck). Se pesaron asepticamente 65 g de cada muestra y se realizó un enriquecimiento, con 585 mL de caldo lauril sulfato (Bioxon), se incubó  $42 \pm 2$  h a  $35^{\circ}\text{C}$ , para promover el desarrollo de bacterias “patógenas que se encuentren en bajo número a partir de muestras de alimentos donde exista una elevada concentración de microorganismos comensales” (Marzocca et al, 2006). Para la inoculación en medios selectivos y diferenciales, se usaron placas de agar Mac Conkey (Bioxon), agar Mac Conkey sorbitol (Difco) suplementado con telurito de cefixima; posteriormente, se implementó el uso de CHROMagar™ para la identificación presuntiva de *E. coli* O157:H7 incubando  $24 \pm 2$  h a  $35^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la identificación visual de las colonias de *E. coli*, siendo lactosa positiva en agar Mac Conkey, no fermentadoras de sorbitol en placas de agar Mac Conkey sorbitol y por el color malva en CHROMagar™. Las cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 fueron confirmadas por pruebas primarias como catalasa y oxidasa (BBL) y pruebas secundarias como: agar de hierro y triple azúcar (TSI) (Bioxon), agar de hierro y lisina (LIA) (Bioxon), medio MIO (Bioxon), agar citrato de Simmons (Bioxon) y agar urea y confirmación serológica utilizando sueros polivalentes fabricados por el InDRE-SSA.

Para la interpretación de los resultados se informó: presencia o ausencia de *E. coli* O157:H7.

Únicamente para las muestras de cilantro se ocuparon los Test para la detección de *Salmonella* sp y *E. coli* O157 (Test Merck).

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el método de difusión en placa (método Kirby-Bauer) siguiendo las instrucciones descritas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Los antibióticos y sus concentraciones utilizadas fueron: amikacina (30  $\mu\text{g}$ ), ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ), bacitracina (10  $\mu\text{g}$ ), ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacino (5  $\mu\text{g}$ ), cloranfenicol (30  $\mu\text{g}$ ), doxiciclina (30  $\mu\text{g}$ ), gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ), levofloxacino (5  $\mu\text{g}$ ) y nitrofurantoina (300  $\mu\text{g}$ ). Los perfiles de sensibilidad se ratificaron con galerías ATB GN (Biomereux).

Para la evaluación de los efectos del pH inicial y concentración de NaCl en el desarrollo de cepas *Salmonella* multirresistentes (*Salmonella* MR), se seleccionaron cepas resistentes a más de 4 antibióticos (1 a 4 y 5, 3 a 6, 3 a 7 y 1 a 8). El estudio se llevó a cabo en el Equipo Computarizado Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia), el cual permite determinar el comportamiento de las cepas mediante la medición de la turbiedad generada en los caldos de cultivo, utilizando el filtro WB (Wide Band 420 - 580 nm). Para evaluar el efecto del pH inicial, se prepararon cultivos frescos independientes de 10 cepas de *Salmonella* MR, nueve aisladas a partir de carne cruda y una cepa control (*Salmonella* Paratyphi resistente a 7 de los 10 antibióticos evaluados), mediante tres transferencias sucesivas en caldo lactosado (CL) incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Las células fueron lavadas 3 veces con diluyente de peptona al 1% (DP) mediante centrifugación; y los paquetes celulares se resuspendieron en DP. Se prepararon series de tubos con 10 mL de CL estéril ajustado con ácido o álcali mediante un potenciómetro, previo a su esterilización (Mod. 450 Corning) a pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. Se colocaron individualmente 330  $\mu\text{L}$  de cada caldo con el pH ajustado, en cada fosa de las placas de plástico estéril del equipo Bioscreen. Las fosas se inocularon individualmente con aproximadamente 3.5 log UFC de *Salmonella* MR, contenidas en 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión. El recuento del inóculo se realizó mediante la técnica de vaciado en placa con agar soya tripticasa, incubando a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El comportamiento de las cepas se estudió a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 18 h en el equipo, realizando registros de densidad óptica (DO) cada 15 min con agitación previa por 5 seg. Para evaluar el efecto de la concentración de NaCl, se obtuvieron suspensiones de las cepas de *Salmonella* MR como se describió anteriormente.

Se prepararon series de tubos con 10 mL de CL estéril a pH 7.0 ajustado a concentraciones finales de NaCl de 0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0%. Se continuó con la metodología anteriormente descrita. El efecto del pH inicial y concentración de NaCl se determinó mediante el cálculo de los tiempos de detección de desarrollo de las cepas de Salmonella MR. Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de Salmonella MR, se obtuvieron los cultivos de las 10 cepas como se describió anteriormente. Se prepararon series de tubos con 4 mL de CL pH 7.0. Los tubos fueron inoculados individualmente con una suspensión de aproximadamente 1.2 y 3.5 log ufc/mL de Salmonella MR contenidos en 100 µL. El efecto de la temperatura se estudió a 25, 30, 35, 44, y 46°C en baño maría por un periodo de 96 h, realizando registro de presencia/ausencia de crecimiento.

El análisis molecular de las cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp, obtenidas de las muestras de carne y vegetales, se realizó por amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó una cepa *E. coli* O157:H7 de referencia productora de toxina shiga like (stx). Las similitudes morfológicas entre la cepa de referencia y las cepas aisladas se determinaron por su crecimiento en agar cromogénico de *E. coli* O157:H7 suplementado con cefixime-telurito.

La extracción de DNA se realizó con el kit Wizard Genomics (Promega), se amplificaron los genes *fimA* e *invA* para la identificación de *Salmonella* y los genes *eae*, *stx1* y *stx2* para la identificación de *E. coli*.

Las secuencias de oligonucleotidos (primers) utilizados para la amplificación se diseñaron y posteriormente se solicitó su síntesis en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler gradient de punto final (Eppendorf), los productos de amplificación se sometieron a electroforesis (Electroforetic gel system, Bio-Rad) en geles de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad).

## 23.2 Resultados y discusión

La calidad de los alimentos está sustentada por tres áreas de estudio: microbiológica, fisicoquímica y sensorial.

De las cuales la que reviste mayor importancia es la calidad microbiológica, ya que a través de ella se puede determinar la inocuidad de los alimentos; es decir, que no produzcan enfermedades a las personas que los consumen. Se ha reconocido que la presencia de bacterias patógenas en alimentos de origen animal y vegetal constituyen un riesgo para la salud de las personas, debido a que estos microorganismos son capaces de generar problemas gastrointestinales y son estas patologías una de las primeras causas de consulta médica y de muerte en México y en todo el mundo.

Del número total de muestras de carne analizadas en las diferentes presentaciones (n=180), el porcentaje de recuperación de las cepas de *Salmonella* spp fue de 22.7% (41/180). En el 2011, Torres, en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, reportó para chorizo y longaniza, 36 y 24% de muestras positivas a *Salmonella* spp, respectivamente. Bello y cols.1, realizaron un estudio en el Estado de Guerrero, detectando *Salmonella* spp en el 32.4% de muestras de carne que incluían res, cerdo, pollo, pescado entero, chorizo y longaniza.

En general, los porcentajes de positividad pueden variar debido a la combinación de diferentes factores como; la zona geográfica y, por lo tanto las condiciones climáticas, el origen y la cantidad de muestras analizadas, los medios utilizados en la metodología, etc.1, 38 Mientras que la recuperación de *E. coli* O157:H7 fue del 1.6% (3/180). Los reportes existentes en relación al tema indican un bajo porcentaje de recuperación de estas bacterias, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. (Franco, et al. 2011, kasnoski, et al. 2008; Kiermeier, et al. 2011; Marzocca, et al. 2006; Narváez, et al. 2005; Phillips, et al. 2012; Treviño, et al. 2009; Vally, et al 2012 y Varela, et al. 2008).

En el caso de la carne, será importante implementar estrategias de intervención enfocadas en la prevención de contaminación de estas bacterias patógenas en las opciones de desollado y evisceración durante el sacrificio, ya que durante estos procesos se produce la contaminación de la carne.

Aunque se trata de carne cruda que deberá consumirse cocida, existe la posibilidad de una contaminación cruzada del alimento preparado; también podría ocurrir, que en el cocimiento de la carne no se alcance la temperatura para destruir al patógeno (Treviño, et al. 2009).

Por otro lado, aunque en México no se cuenta con información referente al aislamiento de *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 y al ser escasos los estudios de la incidencia de estos patógenos al interior del huevo, la ausencia de estos microorganismos patógenos en el huevo de gallina, no descarta la posibilidad de que algunos factores como el tiempo, clima, manipulación del producto hayan influido condicionando su ausencia en las 100 muestras analizadas.

En las diferentes muestras de verduras (n=80) el porcentaje de recuperación de *Salmonella* spp fue 2.5% (2/80) y la de *E. coli* O157:H7 fue de 2.5% (2/80). En este sentido, se ha alertado que productos frescos como lechuga, lechuga romana, rábano, espinacas, apio, etc. Pueden estar contaminados por *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* sp. y *Listeria* sp. (Barrantes, et al. 2011; Bautista, et al. 2013; Berger, et al. 2010; Buzby, 2001; CDC, 2011; Kase, et al. 2012; Lou, et al. 2010; Slayton, et al. 2013; Torres, et al. 2013; Tzschoppe, et al. 2013 y Vandamm, et al. 2013).

Las verduras que se comercializan en las tiendas de autoservicio deben cumplir con las normas de higiene para su venta establecidas en la Normatividad Sanitaria vigente, ya que las verduras están expuestas a constantes tipos de contaminación, desde el momento de su cultivo hasta su consumo. Y la ausencia de estas bacterias en las lechugas refleja la calidad sanitaria y es sinónimo de calidad, seguridad y confianza para el consumidor.

Sin embargo, si se toma en cuenta que la venta y distribución de alimentos crudos en los mercados populares como lechugas y pepinos no son las más adecuadas y además la falta de higienización en los hogares antes de su consumo permiten que la flora microbiana en dichos alimentos pueda afectar al consumidor y, por tanto, en algunos casos ocasionar enfermedades.

La gestión de alerta sanitaria a nivel Mundial es fundamental, y es necesario establecer estrategias preventivas para evitar propagación al encontrarse en las hortalizas de consumo cotidiano que se utilizan para la preparación de variedad de productos frescos.

La aparición de resistencia a antimicrobianos es un problema para la salud pública y la sanidad animal, puesto que pone en serio peligro la eficacia del tratamiento de elección contra las infecciones bacterianas (Holmberg, 1987). En los últimos años, diferentes estudios destacan la relación existente entre el consumo de antibióticos por animales y el desarrollo de resistencias en microorganismos vinculados a infecciones en humanos.

La práctica del uso de antibióticos en animales con fines veterinarios o para incrementar el engorda, plantea la misma situación ecológica que en la práctica de la medicina humana; es decir, el uso del fármaco ejerce una presión selectiva sobre la población bacteriana por la que se seleccionan los microorganismos mejor adaptados (resistentes).

La relación entre las bacterias responsables de enfermedades de origen alimentario en humanos y la resistencia a los antimicrobianos ha sido objeto de investigación en varios estudios, particularmente en patógenos como *Salmonella* (Rodríguez, et al. 2009).

Se analizaron 42 cepas de *Salmonella* para determinar si eran multirresistentes. De estas se observó resistencia a gentamicina (100%), bacitracina (100%), amikacina (90.4%), doxiciclina (45.8%), cloranfenicol (41.0%), ampicilina (40.0%) y ciprofloxacino (25.3). Los antibióticos en los que se mostró menos resistencia fueron: ceftriaxona (1.2%), nitrofurantoína (8.4%) y levofloxacino (13.2%). Se encontró multirresistencia a por lo menos 2 antibióticos en 3.6%; 25.3% fueron resistentes a 3; 20.5% a 4; 22.9% a 5 antibióticos; el 14.5% a 6; 8.4% a 7 y finalmente 4.8% fueron resistentes a 8 antibióticos. Con respecto al efecto de pH sobre el crecimiento de cepas multirresistentes analizadas en el equipo Bioscreen, ninguna de las cepas presentó desarrollo en el rango de pH de 3.0 a 4.0. Todas las cepas desarrollaron a partir de pH 4.5, mostrando un desarrollo óptimo a pH 6.0 y hasta 8.5.

En relación al efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella* MR en tubos con caldo lactosado a pH 7.0 y también analizadas en el equipo computarizado Bioscreen: todas las cepas presentaron desarrollo entre 0% a 2.0% de NaCl, mientras que la concentración óptima fue de 1%. El rango de temperatura óptima de las cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. Se encontró entre 25 y 35° C, a una temperatura de 44°C el crecimiento fue menor y la inhibición del crecimiento se presentó a los 46°C. Por medio de la amplificación de los genes *fimA* e *invA* se identificaron las cepas de *Salmonella*, de la misma forma, la amplificación específica de los genes *eae*, *stx1* y *stx2* permitió la identificación de *E. coli* O157:H7.

### 23.3 Conclusiones

De las 80 muestras de carne analizadas en las diferentes presentaciones, el porcentaje de recuperación de las cepas de *Salmonella* spp fue de 22.7%. Mientras que la recuperación de *E. coli* O157:H7 fue de 1.66%. No se demostró la presencia de *Salmonella* sp. ni de *E. coli* O157:H7 en las muestras de huevo analizadas. En las diferentes muestras de verduras el porcentaje de recuperación tanto de *Salmonella* spp como de *E. coli* O157:H7 fue de 2.5%. El 100% de las cepas de *Salmonella* spp mostró multirresistencia desde 2 a 8 antibióticos.

El pH óptimo de desarrollo de las cepas multirresistentes de *Salmonella* spp fue de 5.5 a 7.5. Todas las cepas presentaron desarrollo entre 0% a 2.0% de NaCl, mientras que la concentración óptima de NaCl fue de 1%. El rango de temperaturas óptimo para el desarrollo de las cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. se encontró entre 25 y 35°C.

Se ha alertado con regularidad que el consumo de carne de res y verduras se asocia con infecciones producidas por *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7, lo que se está convirtiendo en una seria amenaza para la seguridad alimentaria en diferentes países del mundo (Ramoneda, et al. 2013; Rajashekara, et al. 2000 y Vally, et al. 2012). En este sentido, el ganado bovino es considerado el reservorio primario (Pérez, 2008; Ramoneda, et al. 2013).



La transmisión de los agentes patógenos se produce a través del consumo de alimentos inadecuadamente procesados, quesos (McCollum, et al. 2012), hortalizas (Slayton, et al. 2013 y Vandamm, et al. 2013), agua contaminada y con menor frecuencia a través del contacto con el estiércol, animales o personas infectadas.

Se recomienda mejorar el manejo de los animales durante el sacrificio y las condiciones sanitarias en rastros (mataderos), ya que la contaminación de la carne en canal es el resultado directo de la transferencia de patógenos a partir de pieles de ganado bovino presentes y su posterior contaminación durante el sacrificio. En el caso del huevo el no aislamiento de estos microorganismos no lo libera de un riesgo al consumidor. Por lo que se recomienda sea consumido cocido y las verduras en general, someterlas a un proceso de desinfección antes de ser consumidas.

Finalmente, la búsqueda continua de estos microorganismos en alimentos como la carne, huevo o vegetales crudos podría proporcionar un panorama más amplio de la ausencia o presencia de éstos, y en su caso se podrán establecer lineamientos generales para evitar el desarrollo de bacterias potencialmente patógenas como lo es *Salmonella* spp. y EHEC.

Por lo tanto, antes de consumir estos alimentos es necesario que, en el caso de la carne, se someta a un proceso eficiente de cocción y la desinfección en el caso de las verduras. Por lo que recomienda adoptar, promover y difundir entre la población en general, las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aplicando las cinco claves para mejorar la inocuidad de los alimentos:

- Mantener la limpieza.
- Separar los alimentos crudos de los cocinados
- Cocinar bien todos los alimentos
- Mantener los alimentos a la temperatura adecuada
- Utilizar agua e ingredientes inocuos

Aun cuando los problemas más preocupantes relacionados con la inocuidad de los alimentos son:

- La propagación de los riesgos microbiológicos (entre ellos bacterias como *Salmonella* o *Escherichia coli*).
- Los contaminantes químicos de los alimentos.
- La evaluación de nuevas tecnologías alimentarias, como los alimentos genéticamente modificados, y
- La creación en la mayoría de los países de sistemas sólidos que velen por la inocuidad de los alimentos y garanticen la seguridad de la cadena alimentaria mundial.

#### **23.4 Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada por PROMEP y forma parte del proyecto: “Prevalencia de cepas multirresistentes de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos crudos en la ciudad de Puebla”.

#### **23.5 Referencias**

Bello, L. A. y Ortiz, D. (1990). *Salmonella* en carnes crudas: un estudio en localidades de Guerrero. *Salud Pública México*, 32(1), 74–79.

Barrantes, K. y Achí, R. (2011). Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31, 31-36.

Bautista de León, H., Gómez, A. C.A., Rangel, V. E., Vázquez, B. E. y Castro, R. J. (2013). Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. Recuperado el 2 de abril, 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23461467>.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Hand, P. y Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology*, 12(9), 2385-2397.

Buzby, J. (2001). Economics of foodborne disease. Economic Research Service. US Department of Agriculture, Recuperado el 2 de abril, 2013, de [www.ers.usda.gov/Briefing/FoodborneDisease/foodlandpathogens/index.htm](http://www.ers.usda.gov/Briefing/FoodborneDisease/foodlandpathogens/index.htm).

Castro, R. J., Cerna, C. J. F., Méndez R. E., López, H. D., Gómez, A. C.A. y Estrada G. T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 15(2),176-80

Centers for Disease Control (CDC). 2011. Estimates of foodborne illness in the United States. US Department of Health and Human Services, Recuperado el 2 de mayo, 2013 de <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.M100-S23

Duffy, E. A., Lucia, L. M., Kells, J. M., Castillo, A., Pillai, S. D. y Acuff, G. R. (2005) Concentration of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. *Journal Food Protection*, 68, 70-79.

European Center for Disease Control. (2011). EU case definition: HUS caused by epidemic strain Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli*. Recuperado el 19 de mayo, 2012 de [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia\\_coli/epidemiological\\_data/Pages/EU\\_case\\_definition.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/epidemiological_data/Pages/EU_case_definition.aspx)

Food & Drug Administration. (2001). *Salmonella* spp. In: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. *Center for food safety & applied nutrition*. Recuperado el 15 de abril, de <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap21.html>

Food & Drug Administration. (2001). *Escherichia coli* O157:H7. In: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Center for food safety & applied nutrition, Recuperado el 4 de mayo, 2013 de <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap21.html>

Franco, U. L., Vargas, P. X., Mendoza, I. A., Bayona, R. M. y Plaza, A. (2001). Determinación de *Escherichia coli* O157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. Recuperado el 11 de julio, 2011 <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49911595004>.

Fernández, E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. México: Universidad Autónoma de Querétaro, 561–572

Foley, S.L., Lynne, A.M. y Nayak, R. (2008) *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, 86(14), 149-162.

Holmberg, S. D., Solomon S. L and Blake, P. A. (1987). Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 9(6),1065–1078.

Kase, J. A., Borenstein, S., Blodgett, R. J. y Feng, P. C. (2012b). Microbial quality of bagged baby spinach and romaine lettuce: effects of top versus bottom sampling. *Journal of Food Protection*, 75(1),132-136.

Kasnowski, C. M., Franco, R. M., Trindade, O. L. A., Valente, A.M., Carvalho, J. C. y Conte, J. A. C. (2008). Detección, caracterización serológica y antibiogramas de *Escherichia coli* aisladas de carne de ternera (babilla) entera y picada. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. [En línea]. Recuperado el 9 de mayo, 2011 de <http://www.respyn.uanl.mx/ix/3/index.html> //Fecha de consulta.

Kiermeier, A., Mellor, G., Barlow, R. y Jenson, I. (2011). Assumptions of acceptance sampling and the implications for lot contamination: *Escherichia coli* O157 in lots of Australian manufacturing beef. *Journal of Food Protection*. 74(4), 539-544.

López; C.O., León, F. J., Jiménez, E. M. y Chaidez, Q. C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2),119-126

Lou, Y., He, Q. y McEvoy, J. L. (2010). Effect of storage temperature and duration on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing romaine and iceberg lettuce. *Journal of Food Science*, 75(7), 390-397.

Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., y Álvarez E. E. (2006). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*, 38,38-40

McCollum, J. T., Williams, N. J., Beam, S. W., Cosgrove, S., Etestad, P. J., Ghosh, T. S., Kimura, A. C., Nguyen, L., Stroika, S. G., Vogt, R. L., Watkins, A. W., Weiss, J. R., Williams, I. T. y Cronquist, A. B. (2012). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with in-store sampling of an aged raw-milk Gouda cheese. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1759–1765.

Miko, A., Pries, K., Schroetes, A. y Helmuth, R. (2005). Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant ser. of *Salmonella* entérica isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56,1025-1033.

- Muller, G., 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 1, 157-163.
- Musgrove, M., Jones, D., Northcutt, J., Cox, N., Harrison, M., Ferdorka, P. y Ladely, S. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poultry Science. Association*, 85:1665-1669.
- Narváez, C. A., Parra, K. C., Huerta, L. N., Rodas, G. y Arenas, M. L. (2005). Aislamiento de *Salmonella* y *E. coli* patógenas durante el procesamiento de hamburguesas en una pequeña planta de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Zulia*, 15(6), 551–559.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). Informe sobre la salud en el mundo. La atención primaria de salud, más necesaria que nunca. 1 -116
- Pérez, Ch. M. L., Guerrero, L. I. y Ponce, A. E. (2008). Detección de microorganismos patógenos e indicadores en carne de bovino que se expende en supermercados de la ciudad de México. *Nacameh*, 2(2),188–194
- Pesaresi P. K. 2003. *Salmonella* and eggs. *Food safety, Kansas State University*. MF-2139.
- Phillips, D., Bridger, K., Jenson. I. y Summer, J., (2012). An Australian national survey of the microbiological quality of frozen boneless beef and beef primal cuts. *Journal of Food Protection*, 72(10), 862-1866
- Puig, P. Y., Espino, H. M. y Leyva C. V. (2011). Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), 30-38
- Ramonedá, M., Foncuberta, M., Simón, M., Sabaté, S., Ferrer, M.D., Herrera, S., Landa, B., Musté, N., Martí, R., Trabado, V., Carbonell, O., Vila, M., Espelt, M., Ramírez, B. y Durán, J. (2013). Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTECO157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. Recuperado el 9 de abril, 2013 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23461411>.
- Rajashekara, G., Haverly, E., Halvorson, D.A., Ferris, K.E., Lauer, D.C. y Nagaraja, K.V. (2000). Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in Poultry. *Journal of Food Protection*, 63(7),155-161.
- Rivas, M., Leotta, G. y Chinen, I. (2008). Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Recuperado el 28 de enero. 2010 de <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=IhllApW7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>.
- Rosas, G.A. y Acosta V.M.P. (2001). Manual de manejo higiénico de los alimentos. Secretaría de Salud. México D.F. 1ª ed. 9-10.
- Secretaría de Salud de México. 2010- Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica Semana 52
- Secretaría de Salud. (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. 04 de noviembre de 1994.

Secretaría de Salud. (1994b). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apéndice informativo B. De las especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 4 de octubre de 1995.

Secretaría de Salud. (1995a). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. 16 de octubre de 1995.

Secretaría de Salud. (1995b). Apéndice Normativo B. Norma Oficial Mexicana NOM-145-SSA1-1995, productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. B. De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Diario Oficial de la Federación. 3 de diciembre de 1999.

Secretaría de Salud. (1995c). Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Diario Oficial de la Federación. 22 de septiembre de 1995.

Secretaría de Salud. (1995d). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. 12 de diciembre de 1995.

Slayton, R. B., Turabelidze, G., Bennett, S. D., Schwensohn, C. A., Yaffee, A. Q., Kham, F., Butler, C., Trees, E., Ayers, T. L., Davis, M. L., Laufer, A.S., Gladbach, S., Williams, I. y Gieraltowski, L. B. (2013). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption. Recuperado el 11 de abril, 2013 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390525>.

Prevalencia de *Salmonella* y *S. aureus* en chorizo y longaniza. *Red de cómputo sobre avances en ciencia y tecnología de la carne*. Recuperado el 11 de abril, 2013 de <http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/>

Test E. coli O157 (Merck). Siglepath® E.coli O157. Rapid test for the detection of E.coli O157 in foods.

Test Salmonella (Merck).Siglepath® Salmonella. Rapid test for the detection of Salmonella in foods.

Torres V. C. A., Gómez A. J. F., Cerna C. A., Villaruel L. E., Rangel V. J. y Castro R. (2013). Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*, 56(3),180-185.

Treviño, L. R.A., Mata, T. V., Espinoza, M. A., Martínez, V. I. O., Morales, L. A., Álvarez, O. G. y Gallegos, R. M. A. (2009). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne fresca de res mediante PCR múltiple. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. Recuperado el 14 de marzo, 2012 de <http://www.medigraphic.org.mx>.

Tzschoppe, M., Martin, A. y Beutin, L. (2013). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal Food Microbiology*, 152(1),19-30.

Vally, H., Hall, G., Dyda, A. Raupach, J., Knope, K., Combs, B. y Desmarchelier, P. (2012). Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia. Recuperado el 14 de abril, 2013 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22264221>.

Vandamm, J.P., Li, D., Harris, L.J., Schaffner, D.W. y Danyluk, M.D. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. *Food of Microbiology*, 24(1),151–157.

Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M.I., González, S., González, G., Gugliada, M.J., Carbonari, C.C., Algorta, G., Bernadá, M., Sabelli, R., Pardo, L., Rivas, M. y Schelotto, F. (2008). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 93-100.