



BUAP



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

**“RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS
EN CEPAS DE *Salmonella* spp. AISLADAS
A PARTIR DE CARNE DE CERDO Y
RES”**

TESIS PROFESIONAL

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

Presenta:

pQFB: Bethel Ariadna Anzaldo Hernández

Asesor

D. en C. Fausto Tejeda Trujillo

Puebla, Pue. Diciembre 2020

“La cuenta en placa tiene un impacto emocional que va más allá de la información que en realidad encierra, porque sugiere a la mente humana la fuerza del enemigo el grado con el cual se le debe temer”

Fernández Escartín, F. (1930-2019)

A mi familia

DEDICATORIA

Con amor y cariño:

A mis padres, que han estado conmigo en cada momento, en especial a mi madre por ser el pilar más importante el cual me permito haber llegado hasta este momento de mi formación académica.

A mi hermana Maday y mi cuñado Ramiro por su apoyo incondicional durante mi estancia en la universidad.

A mi director de tesis el Dr. Fausto Tejeda Trujillo principalmente por su cariño y sobretodo su confianza en mí para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

José Luis Borges decía: "soy la suma de lo que eh leído" y me atrevo a agregarle "y de lo que las personas a mi alrededor me han enseñado". Por esto agradezco con todo mi corazón a todas las personas que han formado parte de mi vida, cuyas enseñanzas se reflejan en esta tesis

En primer lugar, me gustaría agradecer sinceramente a mi director de Tesis, Dr. Fausto Tejeda Trujillo, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su paciencia, su motivación, por inculcarme un sentido de seriedad y responsabilidad dejando huella en mi formación profesional. Ganándose mi lealtad, cariño y admiración.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento a la Química Martha León Flores del Laboratorio Estatal de Salud Pública, por facilitarnos el acceso a equipos de alta sensibilidad y especificidad, así como a la Dra. Fabiola Avelino del Instituto de ciencias (ICUAP) por su colaboración en el proceso y análisis de muestras mediante PCR, pero sobre todo gracias a ambas por su tiempo, amabilidad y aportación para la realización de esta tesis

Asimismo, agradezco a D.E.D. Ana Bertha Escobedo López, M.S.P. María de la Cruz Meneses, M.C. Patricia Guadalupe Suarez Albores, del Departamento de Microbiología, los consejos recibidos y por la revisión cuidadosa que han realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda. De igual manera agradecer a profesores de otros departamentos de la BUAP por su trato humano y su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudaron a formarme como profesionista.

Este trabajo es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital de personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales.

Mama gracias por enseñarme a no desfallecer, ni rendirme ante nada, por demostrarme tu amor corrigiendo mis faltas y celebrando cada triunfo. Papa gracias por tu fortaleza y valentía siendo un apoyo en mi carrera, pero sobre todo por permanecer en mi vida. Gracias a los dos, por creer en mí, apoyarme y brindarme todo su amor.

Gracias hermanos, Jaime y Maday por acompañarme en este camino compartiendo conmigo alegrías, fracasos y consejos para afrontar los retos presentados.

Eli y Liz, gracias por orientarme, por sus consejos, ustedes formaron parte importante de mi adaptación al laboratorio.

Para ellos,

Muchas gracias por todo

ÍNDICE

1. Resumen	13
2. Introducción	14
3. Marco teórico	15
3.1. Generalidades	
3.2. Género salmonella	
3.3. Habitad y fuentes de aislamiento	
3.3. Identificación bioquímica	
3.4. Clasificación	
3.5. Patogenicidad	
3.6. Dosis infectante	
3.7. Manifestaciones clínicas	
3.5. Epidemiología	
3.6. Resistencia microbiana	
4. Marco de referencia	25
5. Planteamiento del problema	27
6. Justificación	28
7. Objetivos	29
7.1. Objetivo general	
7.2. Objetivo específico	
8. Hipótesis	29
8.1. Hipótesis alterna	
8.2. Hipótesis nula	
9. Diseño de la investigación	30
10. Material	31
11. Metodología	32
12. Resultados	39
13. Conclusiones	49
14. Bibliografía	50

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Página
Tabla 1: Características que diferencian a <i>Salmonella</i> spp. de las enterobacterias, fuente: (Bergey & Holt, 2000).	17
Tabla 2: Clasificación de Edwards y Ewing, fuente: (Granados y Villaverde, 1997).	18
Tabla 3: Clasificación de <i>Salmonella</i> spp epidemiológicamente, fuente: (Bergey & Holt, 2000).	19
Tabla 4: Método Kauffman-White, fuente: (Romero, 2007).	20
Tabla 5: Antibióticos valorados y aprobados para su uso en antibiograma, fuente: (Sherris et al., 2007).	37
Tabla 6: Muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. identificadas en el laboratorio	42
Tabla 7: Muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. identificadas en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla	43
Tabla 8: Antibiograma realizado en el laboratorio de inocuidad de los alimentos e ICUAP.	45
Tabla 9: Antibiograma realizado en el Laboratorio de Salud Pública del estado de Puebla	46
Tabla 10: Relación de número de muestra, serotipo y antibióticos resistentes a las cepas	47

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

No. Diagrama	Página
Diagrama 1: Proceso general de muestras	33
Diagrama 2: Desarrollo experimental	33
Diagrama 3: Determinación del patrón de resistencia o sensibilidad a los antibióticos	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

No. Gráficos	Página
Gráfica 1: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, refiriéndonos a limpieza del local y vestimenta del carnicero.	40
Gráfica 2: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, condiciones en las que se encuentra y maneja el producto	40
Gráfica 3: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, tipo de envase del producto	40
Gráfica 4: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, refiriéndonos a limpieza del local y vestimenta del carnicero.	41
Gráfica 5: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, condiciones en las que se encuentra y maneja el producto	41
Gráfica 6: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, tipo de envase del producto	42

ÍNDICE DE IMÁGENES

No. Imagen	Página
Imagen 1: Propia. Colonia típica de Salmonella en medio XLD	39
Imagen 2: Propia. Colonia típica de Salmonella en medio Verde Brillante	39
Imagen 3: Propia. Gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el gen	44

1. RESUMEN

El género *Salmonella* es considerado una de las zoonosis con mayor prevalencia causante de enfermedades gastrointestinales, considerada así una ETA. Estudios han demostrado que *Salmonella* spp. presenta un aumento de resistencia a los antibióticos, cepas presentes en animales han causado enfermedades en humanos debido al uso de antibióticos como promotores de crecimiento, agentes terapéuticos y profilácticos en criaderos de animales destinados para el consumo humano

Se asume que los cerdos y bovinos son los reservorios más frecuentes de *Salmonella* spp., así, la ingestión de alimentos cárnicos contaminados por dicho microorganismo es la causa más común de las infecciones en los humanos. Este trabajo es parte del proyecto “Investigación de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a los antibióticos a partir de alimentos y aguas residuales”. llevada a cabo por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Donde se planteó el aislamiento de cepas de *Salmonella* spp., a partir de carne de cerdo y res. Se analizaron un total de 70 muestras de carnes crudas (47 de cerdo y 23 de res), recolectadas en diferentes establecimientos de la ciudad de Puebla, para determinar la presencia de *Salmonella* spp., utilizando el método estándar de la NOM-114-SSA1-1994. Un total de 7 muestras se encontraron contaminadas con este patógeno, 6 de carne de cerdo y 1 de carne de res, lo cual representa un 10% de positividad.

De acuerdo con la metodología una vez aisladas las cepas se les realizó la prueba de resistencia a antibióticos, para determinar si las cepas presentaban multiresistencia a estos. El porcentaje de resistencia a antibióticos fue el siguiente: ampicilina (100%), ampicilina (14.28%), carbenicilina, cefalotina, cefotaxima (14.28), ciprofloxacino (57.14), cloranfenicol (57.14), gentamicina (100%), netilmicina (14.28%), nitrofurantoína (14.28%), norfloxacino (28.57%) sulfametoxazol/trimetoprim (14.28%).

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación de alimentos por microorganismos es un problema de salud pública con el que se ha tenido que luchar en todos los tiempos. La obtención, elaboración, almacenamiento, manipulación y servicio de los alimentos pueden representar amplios riesgos para la salud del consumidor. Dichos riesgos están estrechamente relacionados con su contenido de nutrientes. La carne por naturaleza es rica en proteínas y lípidos y baja en carbohidratos, lo que la hace un excelente medio de cultivo.

Datos epidemiológicos muestran que los productos cárnicos son un vehículo importante para la aparición de enfermedades infecciosas. Tales alimentos son seguros cuando son manejados higiénicamente y se tiene una adecuada cocción.

Las enfermedades transmisibles por alimentos (ETA's) y los daños provocados por los alimentos son, en el mejor de los casos, desagradables, y en el peor pueden ser fatales. Los hábitos de consumo de alimentos también han sufrido cambios importantes. En muchos países durante los últimos años, se han perfeccionado nuevas técnicas de producción, preparación y distribución de alimentos.

Salmonella spp. es una bacteria, móvil, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* que origina dos enfermedades en el ser humano: salmonelosis y tifoidea, asociadas al consumo de alimentos contaminados, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que cada año en los Estados Unidos se originan 1 millón de casos causados por el consumo de alimentos.

Desde 1990, se han identificado nuevas cepas de *Salmonella* spp. resistentes que han originado enfermedades zoonóticas. La salmonelosis es considerada la enfermedad más difundida a nivel mundial, la amplia distribución en la naturaleza produce una rápida propagación de sus más de 2750 serotipos. Sin embargo, la gran preocupación por la enfermedad con este enteropatógeno se debe a los cada vez más elevados fracasos en los tratamientos antimicrobianos convencionales, ocasionados por la alta resistencia bacteriana a estos fármacos.

En el presente estudio se analizaron muestras de carne cruda de diferentes especies animales: porcina y bovina, destinada al consumo humano. Es importante recuperar cepas de *Salmonella* spp. que representan un riesgo para la salud pública y determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana, ya que estudios recientes han determinado que existe un elevado nivel de resistencia.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES

Los alimentos pueden estar contaminados con microorganismos patógenos como, por ejemplo: *Campylobacter*, *Salmonella* y la cepa O157:H7 de *Escherichia coli*, entre otros. Los microorganismos más comunes producen las ETA's afectando al consumidor, lo cual lleva a un problema de salud pública. La población vulnerable y la disminución a la sensibilidad de antibióticos ha ocasionado la realización de un estudio más enfocado a la inocuidad del alimento, desde el inicio de la obtención del alimento, hasta que llega a manos del consumidor pues algunas bacterias patógenas forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Flores y Herrera, 2005).

En los últimos años se han vuelto común las ETAS's, las cuales son conocidas desde tiempo atrás, pero se les había dado poca importancia, actualmente han provocado un resurgimiento, en la Unión europea *Salmonella* spp. se consideraba *S. enteritidis* el microorganismo más aislado en alimentos (Gil, 2010).

En el siglo XIX patólogos clínicos en Francia asociaron una ulceración con un bacilo tifoideo, pasado el tiempo se le nombro fiebre tifoidea. Salmón y Smith aislaron *Bacillus cholerae-suis*, ahora *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (Doyle & Beuchat, 2013). En el siglo XX hubo progresos importantes como la detección de antígenos somáticos y flagelares de *Salmonella*, termino puesto por Lignieres, White propuso un esquema para la clasificación de *Salmonella*, donde admitió más de 2300 serovariedades (Doyle et al., 2001).

La propagación de las ETA's se manifiesta mediante diversos factores, como la manipulación, tiempo de multiplicación de los microorganismos y las características del alimento para contener nutrientes necesarios y desarrollarse. El aumento en el consumo de alimentos derivados del animal ha ocasionado brotes de salmonelosis en muchos países (Montes et al., 2009).

De las enterobacterias de interés clínico destaca *Salmonella* spp. entre otras, por su acción patógena que depende de sus antígenos, endotoxinas y enterotoxinas (Granados y Villaverde, 1997) *Salmonella* spp. es un bacilo Gramnegativo, mostrando una composición antigénica para identificar serovares, a los cuales los definen los antígenos somáticos "O" (naturaleza lipopolisacarida) y "H" (proteínas) (Fernández, 2008). el cual proporciona resistencia a antibióticos e incrementa su capacidad de adherencia a la célula (Granados y

Villaverde, 1997). En un mismo serovar se reconocen diferentes biotipos (con un comportamiento diferente a las reacciones bioquímicas) como las llamadas “cepas irregulares”, un ejemplo es el fagotipo 4 que afecta a las gallinas, de ahí la contaminación del huevo (**Fernández, 2008**).

3.2 GENERO *Salmonella*

Se conoce como *Salmonella* spp: al bacilo gramnegativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (**Granados y Villaverde, 1997**); anaerobios facultativos miden 0.7-1.5 por 2.0-5.0 μm , su temperatura optima es de 37°C generalmente son móviles por flagelos peritricos (**Bergey & Holt, 2000**) con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus serotipos (excepto *S. Gallinarum* *S. Pollorum*) son aeróbicos facultativos, no esporulados (**Doyle et al. 2001**).

Salmonella spp., es un patógeno animal (**Adams & Moss, 2008**) distribuido en la naturaleza afectando también a humanos (**Jay & Golden, 2005**), aislada de alimentos, siendo el protagonista en brotes de gastroenteritis (**Fernández, 2008**) son móviles y descarboxilan lisina y la ornitina, producen ácido sulfhídrico y no producen ureasas. Se desarrollan bien en los medios de cultivo habituales para enterobacterias y actualmente pueden dividirse en más de 2,750 serovariedades (**Jurado et al. 2010**).

3.3 HÁBITAT Y FUENTES DE AISLAMIENTO

El hábitat natural de *Salmonella* spp. es el intestino en animales de sangre fría y caliente, se libera al medio ambiente cuando se le expulsa por las heces. Tiene cierta capacidad de supervivencia y multiplicación con reservorios extraintestinales es decir con todo aquello que entra en contacto el microorganismo.

El problema son las malas prácticas higiénicas en sitios en los que se manejan alimentos, como fábricas, cocinas industriales etc. La contaminación fecal no siempre es el único antecedente directo de la presencia de *Salmonella* spp. también podría deberse a huevos de aves de consumo humano incluso en condiciones sanitarias (**Fernández, 2008**).

3.4 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

En general para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* es necesario realizar pruebas directas, aislamientos en medios específicos y pruebas bioquímicas (**Granados y Villaverde, 1997**). Las características que diferencian a *Salmonella* spp de las demás enterobacterias se especifican en la tabla numero 1 (**Bergey & Holt, 2000**).

Tabla 1: Características que diferencian a *Salmonella* spp. de las enterobacterias, fuente: (**Bergey & Holt, 2000**).

Características de *Salmonella* spp.

Producción de indol	-
Citrato, Simmons	+
Producción de H ₂ S	+
Urea hidrolisis	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+
Producción de ácido D-adonitol	-
Producción de ácido L-arabinose	+
Producción de ácido L-rhamnose	+
Producción de ácido D-sorbitol	+
Producción de ácido D-xylose	+

Cuando un alimento está contaminado por *Salmonella* spp. se realizan técnicas para su aislamiento, recuento e identificación como se muestra a continuación.

Pre-enriquecimiento. - Mediante caldo lactosado o agua peptonada se desestresa *Salmonella* spp.

Enriquecimiento. - Se transfiere 1mL de volumen del medio de pre-enriquecimiento en medios selectivos como caldo Tetracionato o Rappaport-Vassiliadis incubados a 35°C.

Aislamiento. - A partir del enriquecimiento selectivo, se llevan a medios sólidos que contienen agentes selectivos como agar verde brillante, agar XLD, Mac Conkey, pero también puede utilizarse el agar SS, y el agar sulfito de bismuto.

Identificación bioquímica. - Las colonias características se recogen del agar y se procede al estudio de las características bioquímicas principalmente LIA, MIO y TSI. Es indispensable, antes de recurrir al estudio antigénico, asegurarse de que la cepa pertenece al género de *Salmonella* (**Bourgeois et al., 1994**).

Para una identificación de género se recomienda estudios serológicos como aglutinación con antisueros contra los antígenos somáticos y flagelares. Las técnicas para vigilancia y estudio epidemiológico de *Salmonella* spp. son de gran importancia para rastrear fuentes y mecanismos de contaminación (**Fernández, 2008**).

En Europa existen laboratorios del proyecto denominado Food-PCR, para validar y estandarizar metodologías mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detección de microorganismos patógenos, entre ellos *Salmonella* spp. en alimentos para la identificación del microorganismo. El análisis de las muestras se toma del supuesto alimento contaminado, dependiendo del aislamiento se determina el resultado, negativo tarda de 3 a 4 días, pero si es positivo tardara más de 7 días en entregarse (**Flores y Herrera, 2005**).

3.5 CLASIFICACIÓN

CLASIFICACIÓN POR SUS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

De acuerdo con sus propiedades bioquímicas, el Manual de Bergey's, divide al género *Salmonella* en la clasificación Kauffman con 5 subgéneros y en la clasificación de Edwards y Ewing con 3 especies (*S. typhi*, *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis*) (**Ver tabla 2**) (**Granados y Villaverde, 1997**).

Tabla 2: Clasificación de Edwards y Ewing, fuente: (**Granados y Villaverde, 1997**).

Clasificación de *Salmonella* spp. según su serotipo

ESPECIES	NUMERO DE SEROTIPOS
<i>S. typhi</i>	1 <i>S. typhi</i>
<i>S. cholerae-suis</i>	2 <i>S. cholerae suis</i>
<i>S. enteritidis</i>	2500 (incluyendo <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Heidelberg</i> , <i>S. Newport</i> , etc.)

CLASIFICACIÓN PARA FINES EPIDEMIOLÓGICOS

Se clasifican en tres grupos (**Ver tabla 3**), los que solo infectan los humanos, los serovares adaptados al huésped y los serovares no adaptados al huésped (**Bergey & Holt, 2000**).

Tabla 3: Clasificación de *Salmonella* spp. epidemiológicamente, fuente: (**Bergey & Holt, 2000**).

Clasificación de *Salmonella* spp. epidemiológicamente

Serovares que infectan solo a humanos	<i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> A y <i>S. paratyphi</i> C
Serovares adaptados al huésped	<i>S. gallinarum</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. abortus-equi</i> , <i>S. abortus-ovis</i> y <i>S. choleraesuis</i>
Serovares no adaptados (sin preferencia del huésped)	Incluye los serovares transmitidos por alimentos

CLASIFICACIÓN POR SU SEROTIPO

S. typhi y *S. cholerae-suis* tiene un serotipo; sin embargo *S. enteritidis* tiene más de 2500 serotipos diferentes y la identificación se lleva a cabo con antisuero “O” y “H”

El esquema de Kauffmann-White clasifica 11 serogrupos. (**Ver tabla 4**) basados en un antígeno mayor y en uno o más antígenos somáticos menores (**Romero, 2002**). De acuerdo con el esquema, *Salmonella* spp. se ha clasificado por los antígenos somáticos “O” (nombrados con números), flagelares “H” (denominados con letras minúsculas en fase uno, se designa número cuando están en fase 2) y capsulares “K”. Con todo este complejo se han formado varios grupos que se identifican con letras mayúsculas: A, B, C1, C2, C3, D, E1, E2, E3, F, G, G2, H, K, L y N (**Romero, 2007**).

Tabla 4: Método Kauffman-White, fuente: (Romero, 2007).

Método de Kauffmann-White

<u>SEROGRUPOS</u>	<u>EJEMPLOS DE SEROTIPOS</u>
A	<i>S. Paratyphi A</i>
B	<i>S. Paratyphi B</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Heidelberg</i>
C1	<i>S. choleraesuis</i> <i>S. Paratyphi C</i> <i>S. Oranienburg</i>
C2	<i>S. Newport</i> <i>S. Muechen</i>
C3	<i>S. Kentucky</i>
D1	<i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i>
D2	<i>S. Maarseen</i>
E1	<i>S. Anatum</i>
E2	<i>S. Newington</i>
E3	<i>S. Illinois</i>
E4	<i>S. Senftenberg</i>

3.6 PATOGENICIDAD

Durante el proceso infeccioso se presenta interacción entre hospedero- microorganismo, dentro de esta podemos mencionar adhesión, invasión, replicación, resistencia al mecanismo de defensa del hospedero, comportándose como patógeno intracelular facultativo (Fernández, 2008).

Salmonella spp. supera las defensas primarias del tubo digestivo, alcanzando la mucosa intestinal, para iniciar el proceso de colonización del íleon distal y así competir con la flora del intestino. Sobresale por su capacidad para evadir los mecanismos de defensa, se le conocen varios genes que codifican una capacidad adherente e invasiva, es decir ya que la bacteria está fijada a la membrana puede penetrarla incrementando la concentración intracelular de calcio, que daña los lípidos de la membrana. En esta se forman unas

rugosidades (**Fernández, 2008**), disparo (trigger) es llamado el mecanismo por el cual *Salmonella* spp. invade las células del hospedero, enviando señales epiteliales para que induzcan a arreglos del citoesqueleto para formar un ondulamiento (ruffling) permitiendo que la bacteria penetre la célula (**Ochoa y Rodríguez 2005**), (dando lugar a una “macropinocitosis”) y se multiplica en el interior de una vacuola (**Fernández, 2008**).

Dependiendo de la virulencia del microorganismo y del huésped, incluyendo la fagocitosis, la acción de anticuerpos y la virulencia del microorganismo, las bacterias generadas pasan a la lámina de la mucosa intestinal donde inicia un proceso inflamatorio o el ingreso a circulación sanguínea (**Fernández, 2008**). También puede invadir varias líneas celulares, estimulando más de un camino de traducción para promover su entrada (**Ochoa y Rodríguez 2005**).

3.7 DOSIS INFECTANTE

La dosis infectante es el número mínimo de microorganismos necesarios para causar enfermedades. Pero debemos considerar que esto puede no aplicar de igual manera en niños, ancianos y personas inmunodeficientes, ya que pueden enfermar exponiéndose a un número menor al de la dosis infectante para causar la enfermedad (**OMS, 2019**).

Existen múltiples factores que determinan la supervivencia, proliferación o incluso la muerte de bacterias en los alimentos como pH, actividad del agua, potencial redox (potencial de óxido reducción), composición química del alimento y temperatura, humedad relativa y presencia de gases en el ambiente, además de la presencia de flora competitiva. La dosis infectante de *Salmonella* spp. va de 10⁴ – 10⁹ células viables por gramo (**OMS, 2019**).

La resistencia de *Salmonella* spp. ha sido atribuida al uso extenso de antibióticos (**Junod et al., 2013**), tanto en la terapéutica humana como animal. En la industria, los antibióticos no solo son utilizados más allá de fines terapéuticos, también son utilizados como promotores de crecimiento en dosis subterapéuticas durante largos periodos (**Rivera et al., 2012**)

3.8 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las enfermedades intestinales, son llamadas enteritis cuando su síntoma principal es la diarrea, causando deshidratación principalmente en niños y ancianos (**Prats, 2005**).

Las especies de *Salmonella* spp. provocan enfermedades tipo gastroenteritis incluso fiebre tifoidea o paratifoidea (**Granados y Villaverde, 1997**), es un proceso infeccioso donde la infección puede ser asintomática o típicamente inicia de manera abrupta con dolor en la parte alta del abdomen, náusea y diarrea, con sensación de malestar intenso y cefalea acompañada de fiebre de 38 a 39°C o mayor. La sintomatología varía según el serovar de *Salmonella* spp implicado. El periodo de incubación oscila entre 3 y 72 h, raramente hasta 120 h. Los niños, ancianos o personas inmunodeprimidas sufren la enfermedad con mayor rigor (**Fernández, 2008**).

3.9 EPIDEMIOLOGÍA

En países industrializados se han establecido procesos que les permite conocer la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto medico de cada una (**Jong, B. & K. Ekdahl, 2006**).

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. El médico hace un diagnóstico basándose en los síntomas que expone el paciente, pero sin mandarlo a laboratorio a realizarse estudios clínicos o microbiológicos que le proporcionen más información. La falta de comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y sin dejar de mencionar al sector veterinario, impide que países como México pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en alimentos, aun sabiendo que representa un importante porcentaje de enfermedades para los seres humanos (**Loretz et al., 2010**).

En Europa occidental las enteritis son causadas por virus seguidos por bacterias invasoras ya antes mencionadas, pero su etiología varía según su área geográfica. *Salmonella* spp. y *Campylobacter* causan un 90% de enteritis bacterianas en países desarrollados, por eso es importante incluirlo en el protocolo de diagnóstico (**Prats, 2005**).

El tracto intestinal de animales es el hábitat primario de *Salmonella* spp., pero puede encontrarse en otras partes del cuerpo, también se puede encontrar en agua contaminada y alimentos contaminados por distintos medios como la materia fecal, todo esto forma parte de un ciclo el cual es gran parte responsable de la distribución mundial de salmonelosis (**Jay & Golden, 2005**).

La carne es considerada como un alimento de gran importancia en la alimentación del ser humano, la sociedad clasifica con un nivel económico alto a quien la consume. En el siglo

XX se registró un elevado consumo del producto, lo cual represento riesgos en la calidad sanitaria debido a una sobreexplotación de ganado (**Blandino, 2005**).

El consumo de carne al año en EE. UU. habla del mayor consumo de carne de res, seguido por la de puerco, siendo este último más rico en tiamina, a nivel mundial una cuarta parte de aporte de proteína proviene de la carne, alimentando el ganado con proteína vegetal.

Mediante censos el servicio de Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas reporta que solo en la ciudad de Puebla existen 1066 carnicerías registradas (#461121-comercio al por menor de carnes rojas), mientras que en el estado 4164 carnicerías censadas (**INEGI 2019**).

Las proteínas de la carne son de alta calidad, su contenido graso es de un 5-40% dependiendo del animal, el tipo de corte, raza, edad etc. Su contenido de agua es del 75%. Un corte magro de la carne contiene proteína y agua, escaso tejido graso y hueso, esta consiste en músculos formados por bandas de fibras. La mioglobina forma parte del pigmento total de la carne roja, lo demás es la hemoglobina en sangre, pero también depende de que parte del animal se está hablando, la carne de res es considerada como la que más cambia de color aun siendo fresca (**Charley, 2006**).

Kampelmacher realizó un estudio con cerdos de matadero, donde encontró presencia de *Salmonella* spp. en prácticamente todo el canal, pero con mayor frecuencia en ganglios linfáticos y heces, sin haber mostrado signos o síntomas de la enfermedad (**Jay & Golden, 2005**).

La industria alimentaria juega un papel importante al detectar a tiempo que los alimentos no estén contaminados y así certificar su calidad. Pero las técnicas son lentas, lo contrario del diagnóstico clínico el cual es de mayor interés social (**Prats, 2005**).

El animal debe ser inspeccionado desde su sacrificio hasta cuando se vende en comercio (**Charley, 2006**), puede contaminarse con agentes patógenos, muchos de ellos proceden desde su crianza (**Blandino, 2005**), dentro del rastro es probable que una enfermedad se haga evidente. Los pollos aparte del ganado son animales productores de alimento, pueden también ser portadores de *Salmonella* spp. y pasar a alimentos derivados de ellos, como productos que contienen huevo sin cocinar (**Madigan et al., 2004**).

El producto inspeccionado por sanidad se sella de acuerdo con la calidad (**Charley, 2006**). y mediante un mal procesamiento se convierte en una fuente de bacterias patógenas

causantes de enfermedades alimentarias, por ejemplo; *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157H/H7, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* (**Blandino, 2005**).

3.10 RESISTENCIA MICROBIANA

Un antibiótico se define como una sustancia orgánica capaz de actuar sobre un microorganismo destruyendo o inhibiendo su crecimiento el cual debe tener condiciones como; ser específico, sobre el grupo de microorganismos que actúa, esto dependiendo de qué parte de la bacteria inhibe, un elevado potencial biológico, el cual se describe como la concentración mínima inhibitoria (CMI) evitando el crecimiento del microorganismo y la toxicidad selectiva, teniendo la capacidad de destruir bacterias patógenas, pero el daño a células debe ser mínimo (**Granados y Villaverde, 1997**).

Salmonella spp. es uno de los principales microorganismos entre los que ha aparecido algunos serotipos resistentes a antimicrobianos que afectan la cadena alimentaria (**Fabrega A, et al., 2015**), es endémica de muchos animales de sangre caliente y fría, (**INFOSAN 2005**), puede sobrevivir varias semanas en ambiente seco y meses en agua (**Fabrega A, et al., 2015**), por esto el riesgo de contraer salmonelosis está siempre presente en cualquier país sobre todo en la manipulación de alimentos, en países donde las fluoroquinolonas se autorizaron para animales destinados al consumo humano aumento rápidamente su resistencia (**INFOSAN 2005**).

La resistencia a los antibióticos es natural o adquirida, se determina natural cuando se necesitan antibióticos de alto espectro, ya que los más utilizados ya no inhiben al microorganismo (**Granados y Villaverde, 1997**). y la resistencia adquirida puede ser mediante: 1) la captación de un nuevo material genético y 2) multiplicaciones en el cromosoma bacteriano (**INFOSAN 2005**).

4. MARCO DE REFERENCIA

La revista de *Emerging Infectious Diseases* reportó un estudio mediante el CDC sobre un nuevo clon de *Salmonella* entérica serovar Anatum que surgió entre el 2016 - 2017 en Taiwán. Lo preocupante frente a este nuevo clon es que fuera resistente a múltiples fármacos (MDR), las cepas MDR contienen un plásmido que lleva 11 genes de resistencia y un blaDHA-1 que codifica la β -lactamasa AmpC y otorga resistencia a medicamentos β -lactámicos. El resultado de la investigación arrojó que este nuevo serovar no era una cepa MDR (Chiou *et al.* 2019).

El Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Universidad Autónoma del Estado de México, realizó un estudio en cepas de *Salmonella* spp., aisladas de carne de cerdo en rastros del Estado de México en el 2010. De las 87 cepas analizadas, 22 mostraron resistencia al cloranfenicol, 15 a la ampicilina y 54 al sulfametoxazol (Talavera *et al.*, 2011).

La revista de salud animal de la Habana, Cuba menciona que la carne de ave importada genera un importante riesgo ya que en ella provienen cepas resistentes a antibióticos, dicho estudio se realizó con las normas cubanas. Se observaron algunas cepas resistentes a ceftriaxona y ceftazidima, pero la mayoría fue resistente a tetraciclina, lo que reveló el estudio es la gran importancia a la introducción de nuevas cepas resistentes, ocasionando un problema de salud pública (Rivera *et al.* 2012)

Entre enero del 2008 y diciembre del 2009 se describieron serotipos de 178 cepas de *Salmonella* entérica aisladas de alimentos cárnicos de diferentes regiones de Cuba, identificaron 20 serovariedades de las cuales predominaron *S. Enteritidis*, *S. Agona* y *S. London*. Un 75% de las cepas fueron resistentes a antibióticos probados, en el siguiente orden: tetraciclina (70.7%); ampicilina (22.7%) y ácido nalidíxico (14.7%). Solo *S. Infantis*, *S. Derby* y *S. enteritidis* fueron multirresistentes (Puig *et al.*, 2011).

Estudio realizado por el laboratorio de inocuidad microbiana de los alimentos en la BUAP hace referencia que la resistencia a antibióticos en carne cruda (ovina, porcina y aviar) proveniente solo de la ciudad de Puebla muestra que aquellos antibióticos en los que se presentó mayor resistencia fueron: bacitracina, gentamicina, amikacina, doxiciclina, cloranfenicol, ampicilina, ciprofloxacino. En los que se mostró menor resistencia fueron: levofloxacino, nitrofurantoína y ceftriaxona (Díaz y Espinal, 2013).

El CDC mediante la revista de enfermedades infecciosas emergentes dio a conocer que durante el 2004 al 2009 en Oregón de 2,153 casos, 2,127 (99%) se obtuvieron aislamientos de *Salmonella* no perteneciente a *Salmonella typhi* los cuales fueron utilizados para medir la resistencia al fármaco, 347 (16%) aislamientos tuvieron resistencia clínica importante (CIR). Las probabilidades por CIR aumentaron significativamente cada año. Este estudio demuestra que la resistencia a los medicamentos antimicrobianos está aumentando y tiene implicaciones clínicas y de salud pública. Al considerar la terapia con medicamentos antimicrobianos, los proveedores deben evaluar el historial de viajes de los pacientes y el serotipo de *Salmonella* spp. (**Barlow et al. 2014**).

Salud pública de México, realizó un estudio en la ciudad que revela que la susceptibilidad a antibióticos por *Salmonella* spp., presenta una elevada tasa de resistencia a β -lactámicos, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, además se observó resistencia a medicamentos empleados en el humano, como el cloranfenicol, estadística que coincide con otro estudio realizado en 2009 en el estado de Hidalgo. Lo cual nos lleva a evaluar antibióticos empleados en la medicina humana y veterinaria. En caso del sulfa-trimetoprim, empleado para los humanos y animales, más del 50% presento resistencia, estadística tres veces superior a lo reportado seis años atrás del estudio (**Nayarit et al. 2016**).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La salmonelosis es una zoonosis con una distribución mundial de gran impacto en la salud humana y animal y de gran importancia en el ámbito de la salud pública internacional. La enfermedad en humanos se ha asociado al consumo de alimentos de origen animal, frutas y verduras. Cepas de *Salmonella* spp. pueden infectar animales y se les ha asociado con brotes en humanos.

Desde la crianza de los animales pueden presentar enfermedades causadas por cepas de *Salmonella* spp. es aquí donde se cree comienza un uso indiscriminado de antibióticos por preinscripción veterinaria, pero el riesgo más grande es el uso de estos como promotor de crecimiento y también en personas por prescripción médica. Se cree que pueden contribuir a la resistencia mediante la captación de nuevo material genético, mutaciones etc. Lo cual lleva a un mayor riesgo de fracaso terapéutico.

Actualmente se exige una garantía en la inocuidad de los alimentos de origen animal, desde que el animal comienza su crianza y cada etapa hasta que llega al consumidor, ya que existen datos e investigaciones en el país donde cada día es más frecuente la recuperación de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. a partir de humanos y alimentos, en el estado de Puebla no se cuenta con un estudio que caracterice la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de la carne cruda, estableciendo patrones de multirresistencia.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta ¿Las cepas aisladas de *Salmonella* spp. a partir de carne cruda de res y cerdo son multirresistentes a los antibióticos de uso frecuente?

El presente trabajo dará a conocer un patrón de resistencia a antibióticos en cepas aisladas de carne cruda en la Ciudad de Puebla, los resultados darán un panorama importante para la prevención y conservación de los alimentos, pero, lo más importante determinar un correcto tratamiento y la disminución de enfermedades transmisibles causados por esta bacteria.

6. JUSTIFICACIÓN

Salmonella spp. se considera un agente infeccioso común con una amplia distribución dentro de las ETA`s. La carne es un importante vínculo para la transmisión de *Salmonella* spp., además de que algunas cepas han presentado en la actualidad resistencia a antibióticos, por lo que es considerado un problema de salud pública.

El conocimiento a la resistencia a antibióticos de diferentes cepas de *Salmonella* spp. provenientes de carne cruda en la ciudad de Puebla es importante debido a que en México es limitado el conocimiento en dicha área. Se pretende que los resultados contribuyan a optimizar los tratamientos de pacientes con salmonelosis, por ser considerada una ETA muy frecuente, sin discriminar a países desarrollados o no desarrollados, causando enfermedades diarreicas.

La exposición del consumidor a cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes constituye un riesgo latente, tomando en cuenta que el tratamiento de las enfermedades causadas por cepas con estas características puede ser con el paso del tiempo más difícil.

Por lo tanto, se pretende aislar la mayor cantidad de cepas posibles, determinar su comportamiento a la sensibilidad a antibióticos y valorar las cepas para ver si existe un mismo patrón de resistencia y así contribuir a un monitoreo de fármaco-resistencias.

7. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Determinar la resistencia a diferentes antibióticos a partir de cepas de *Salmonella* spp. recuperadas de diferentes tipos de carne cruda en la ciudad de Puebla.

b. Objetivos específicos

Investigar la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de carne cruda provenientes de algunas carnicerías de la ciudad de Puebla, mediante la técnica oficial establecida por la NOM-210.SSA1-2014.

Determinar la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos, empleando la técnica de Kirby-Bauer

8. HIPÓTESIS

a. Hipótesis nula:

Las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de carne no presentan resistencia a los antibióticos.

b. Hipótesis alterna:

Las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de carne son multirresistentes a los antibióticos

9. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo es parte del proyecto “Investigación de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a los antibióticos a partir de alimentos y aguas residuales”.

- **Tipo de estudio:** transversal y prospectivo
- **Universo del estudio:** cepas aisladas a partir de carne cruda molida de cerdo y res; adquirida en la ciudad de Puebla. (70 establecimientos correspondientes a un 4.69% ya que el INEGI reporta 1066 establecimientos de carnes rojas)
- **Tamaño de muestra:** 70 muestras,
- **Sede y lugar del estudio:** laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos ubicado en el edificio FCQ1 de la Facultad de Ciencias Químicas, perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- **Criterios de selección:**
 - Criterio de inclusión:** solo se analizarán muestras provenientes de carnicerías de la Ciudad de Puebla.
 - Criterio de exclusión:** carne que provenga de establecimientos no pertenecientes a la ciudad.
- **Recursos humanos:**
 - Director: Dr. Fausto Tejeda Trujillo
 - Tesista: pasante de QFB, Bethel A. Anzaldo Hernández
- **Recursos financieros:** propios del laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos
- **Diseño estadístico:** pruebas de tendencia central.

10. MATERIAL

Material de vidrio, plástico y reactivos propios de laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos.

a. Material biológico

Carne cruda porcina y bovina

b. Equipos

- ❖ Asa de platino 10µl
- ❖ Báscula
- ❖ Bolsas estériles
- ❖ Cajas petri grandes
- ❖ Estufa de cultivo
- ❖ Hisopos estériles
- ❖ Incubadora calibrada a 35° C
- ❖ Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades
- ❖ Mecheros
- ❖ Multidiscos impregnados con antibióticos
- ❖ Pinzas estériles
- ❖ Pipeta semi automatizada
- ❖ Puntas estériles
- ❖ Solución salina
- ❖ Stomacher SEWARD® LabSystem
- ❖ Termómetros calibrados
- ❖ Tubos de ensaye estériles
- ❖ Vernier, compás de calibración para medir halos de inhibición.
- ❖ Vortex-Genie2

c. Medios de cultivo

- ❖ Agar Mueller-Hinton
- ❖ Agar sulfito de bismuto
- ❖ Agar verde brillante
- ❖ Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)
- ❖ Agua peptonada
- ❖ Caldo tetracionato

d. Pruebas bioquímicas

- ❖ Agar hierro triple azúcar (TSI)
- ❖ Lisina hierro agar (LIA)
- ❖ Movilidad, indol y ornitina (MIO)

11. METODOLOGÍA

El aislamiento de *Salmonella* spp., está basado en la NOM-114-SSA1-1994, actualmente NOM-210-SSA1-2014.

Las muestras de carne molida fueron obtenidas por los estudiantes de la licenciatura de QFB de la Facultad de Cs. Químicas BUAP

Se les hizo la petición de que fuera específicamente carne molida de res o cerdo y se les entregó una encuesta para que la llenaran en el momento de comprar.

Se recibieron 70 muestras en el laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Cs. Químicas BUAP

El diagrama general (**Diagrama 1**) muestra los procedimientos a los que fueron sometidas las muestras, desde la trazabilidad de la muestra, el aislamiento del género de *Salmonella* spp., su identificación bioquímica y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

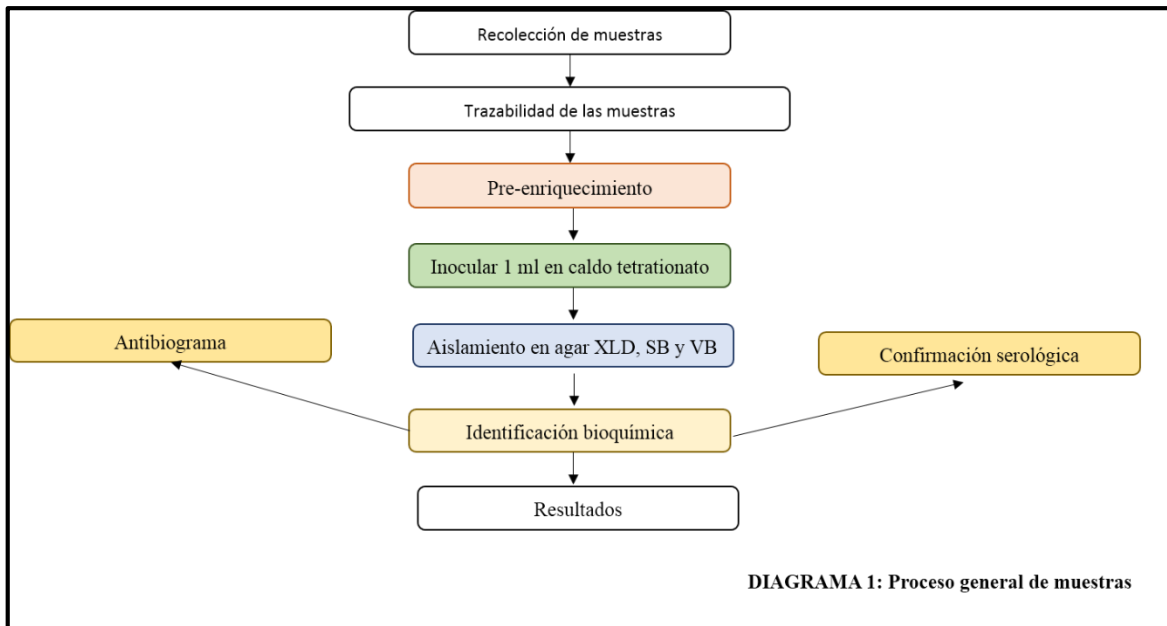
La técnica para el aislamiento de *Salmonella* spp. consistió en los siguientes 4 pasos:

Pre-enriquecimiento. Este paso se utiliza para el desestrés del microorganismo en un medio nutritivo no selectivo que permite que la célula de *Salmonella* regrese a una condición fisiológica estable.

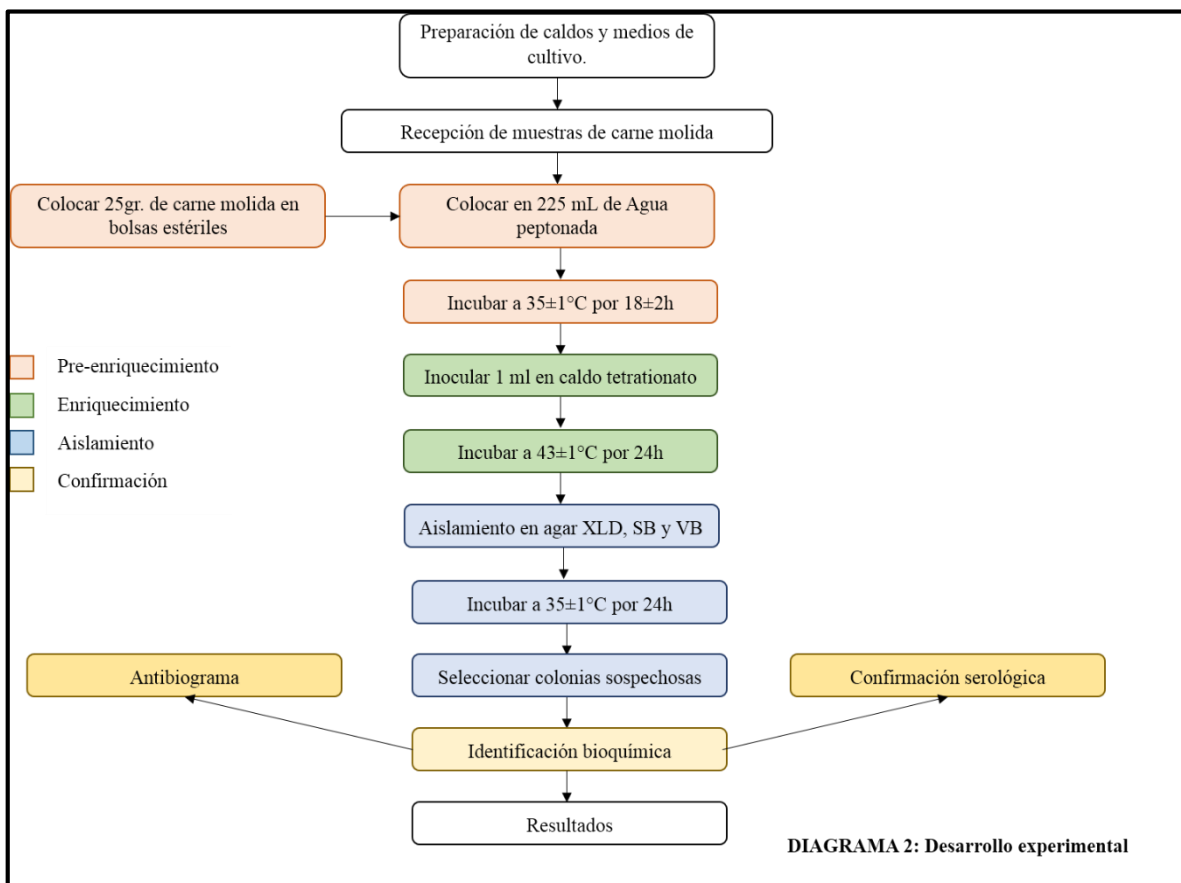
Enriquecimiento. El propósito de este paso es incrementar *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

Aislamiento en medios sólidos. Aquí se utilizan medios selectivos y diferenciales que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

Identificación bioquímica. Confirmación de *Salmonella* spp. y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.



DESARROLLO EXPERIMENTAL



Preparación de la muestra.

Se realizó el registro de muestra por muestra para su identificación junto con la encuesta proporcionada.

Pre-enriquecimiento

Se introdujo en condiciones de esterilidad 25gr de la muestra en una bolsa estéril para colocarla en el homogeneizador (Stomacher). Adicionar 225 mL del medio de pre-enriquecimiento estéril (agua peptonada) se homogenizó e incubó por 24h. a 35°C.

Enriquecimiento.

De las bolsas con los cultivos de pre-enriquecimiento se tomó 1 mL de la mezcla a un tubo con 10 ml. de caldo tetrionato adicionado de 0.2 mL de yodo considerado como la mejor ruta para la recuperación de *Salmonella* spp. (Hernández, 2015), incubando 24h a 43°C

1. Aislamiento de *Salmonella*.

Se mezclaron los tubos de caldo tetrionato y estriaron las placas de agar verde brillante, agar sulfito de bismuto y agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), incubar de 24-48h a 35°C

Al término de la incubación se examinaron las placas para observar la presencia de colonias típicas *Salmonella* spp. de acuerdo con las siguientes características:

Agar verde brillante: en este medio la presencia de *Salmonella* spp. se distinguen por colonias rojas o rosas, transparentes rodeadas de un halo rojo.

Agar sulfito de bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* spp. son negras con o sin brillo metálico, presentan un halo color café tornándose negro.

Agar xilosa, lisina, desoxicolato (XLD): las colonias se presentan de color rojo con centros negros y un halo rojizo.

1. Identificación bioquímica.

Una vez identificadas las colonias características de *Salmonella* spp. se inocularon tubos con: TSI y LIA (por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo), y medio MIO (por punción). Incubar por a 35°C/24 h. al terminar el tiempo se observará y considerará presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

Agar TSI: K/A, H₂S (+), Gas (±)

Se observa vire del indicador en el fondo del tubo debido a la fermentación de la glucosa y un color rojo intenso que el medio original en la superficie debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. Se observa un color negro a lo largo de la picadura debido a la producción de ácido sulfhídrico.

Agar LIA: K/K

La descarboxilación de la lisina provoca que el color púrpura se intensifica en el fondo del tubo. La mayoría de las cepas de *Salmonella* producen H₂S en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

Agar MIO: M (+), I (-), O (+)

Movilidad positiva, ornitina positiva se observa un color gris-púrpura debido a la descarboxilación de la ornitina, indol positivo, la aparición de un anillo rojo después de agregar unas gotas de reactivo de Kovacs.

CONFIRMACIÓN DE *Salmonella* spp.

Las muestras previamente positivas a *Salmonella* spp. se trasladaron al Laboratorio de Salud Pública del estado de Puebla, donde para la confirmación del microorganismo, se utilizó un equipo llamado MALDI-TOF, denominado MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight, BECKTON DIKINSON, es un espectrómetro de masas dedicado para la identificación microbiana por su huella molecular, las proteínas características de los microorganismos son comparadas con patrones específicos en una base de datos para determinar la identidad del mismo hasta el nivel de especie mediante una puntuación de probabilidad con más de 10 000 especies registradas y actualización constante de la base de datos

IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp. POR PCR

Técnica realizada en Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad de Puebla (ICUAP) mediante un procedimiento estandarizado “Cell suspensions and proteinase K digests simples” para la extracción del ADN, posteriormente se lleva a electroforesis donde en uno de los pozos de el gel de agarosa se colocó un marcador de peso molecular, en el siguiente pozo, se le agrego el gen *invA* que codifica a *Salmonella* spp. y en los demás pozos el ADN de las muestras a identificar más un colorante, por último, el gel se teñirá con bromuro de etidio y se leerá en lámpara luz UV

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Una vez identificadas las cepas, y siguiendo las instrucciones descritas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) se realizó la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión en placa (Método Kirby-Bauer)

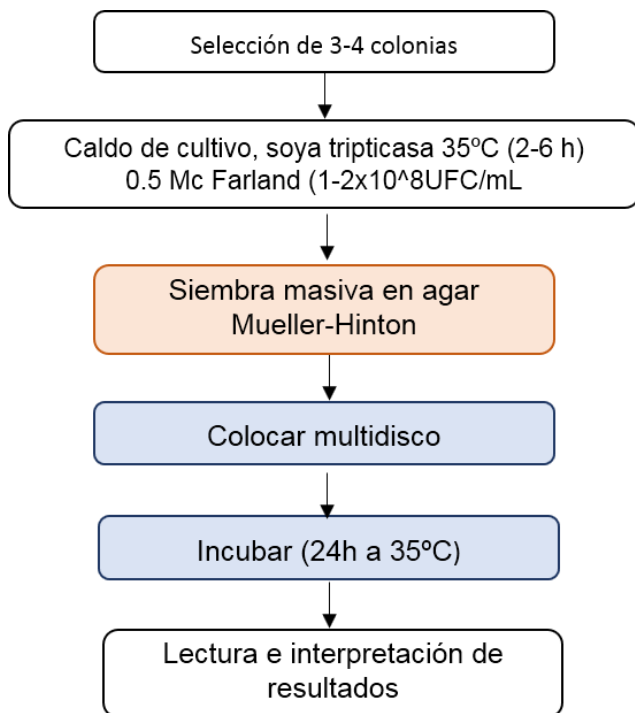


DIAGRAMA 3: Determinación del patrón de resistencia o sensibilidad a antibióticos

Para la ejecución de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se utiliza el CLSI Documet M11-A6 Vol. 24, No. 2 January 2015. Métodos para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de bacterias anaerobias.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El fundamento de la prueba menciona que, un medio sólido se inocula de manera masiva, con un cultivo puro previamente estandarizado, se coloca un disco de papel filtro impregnado con el antibiótico, de una concentración especificada, el cual se pretende inhiba el crecimiento de la bacteria. Cuando entra en contacto el disco con antibiótico y el medio, dicho antibiótico se difundirá hacia el interior del medio. Según el inserto de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), hay una concentración específica para cada antibiótico (**Ver tabla 5**). Una vez incubadas las placas se miden los halos de cada disco y

así determinar que antibiótico es sensible o resistente a *Salmonella* spp. (Sherris *et al.*, 2007).

Tabla 5: Antibióticos valorados y aprobados para su uso en antibiograma, fuente: (Sherris *et al.*, 2007).

Concentración de antibióticos

Antibiótico	Abreviatura	Dosis
Amikacina	AN 30	30 µg
Ampicilina	AM10	10 µg
Bacitracina	B 10	10 µg
Ceftriaxona	CRO 30	30 µg
Ciprofloxacino	CIP 5	5 µg
Cloranfenicol	C 30	30 µg
Doxiciclina	D 30	30 µg
Gentamicina	GM 10	10 µg
Levofloxacino	LVX 5	5 µg
Nitrofurantoína	F/M 300	300 µg

En la selección de antimicrobianos se incluirán solo aquellos antibióticos que han sido valorados y aprobados para uso terapéutico, pueden ser adicionados o suprimidos de las tablas básicas que propone el CLSI.

TÉCNICA DE LA PRUEBA MANUAL

En la prueba de difusión con disco se utilizó agar Mueller–Hinton el cual proporcione crecimiento satisfactorio y una buena reproducibilidad de muchos patógenos no fastidiosos. Los reactivos para la prueba de difusión con disco estuvieron empacados en condiciones anhidras y refrigerados de 2-8 °C o congelados a temperaturas de -20°C o menores si es necesario.

Se buscaron de 3–4 colonias perfectamente aisladas, del mismo aspecto morfológico. La colonia se tomó con un asa y se transfirió a un tubo que contenía 4-5 ml de un caldo de cultivo conveniente como caldo soya tripticasa o caldo Mueller–Hinton, el cual se incubara a 35°C hasta que iguale la turbidez del Standard 0.5 de McFarland (usualmente 2 – 6 horas). Esta

suspensión contiene aproximadamente $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL. (100 – 200 millones de UFC/ml. La turbidez se ajustó con solución salina estéril o con caldo soya tripticasa, hasta que se obtuvo una turbidez óptima.

Se introdujo un hisopo dentro de la suspensión, el cual se roto varias veces presionando firmemente en las paredes de tubo para eliminar el exceso de inóculo. El agar Mueller-Hinton se inóculo en siembra masiva, procedimiento que se repitió 2 veces más, rotando las placas 60° en cada proceso de siembra masiva, para la distribución homogénea del inóculo. La tapa de la placa se dejó entreabierta de 3– 5 min, para permitir que el exceso de humedad pueda ser absorbida antes de aplicar los discos impregnados con los antibióticos. Cada disco se presionó para un contacto completo con la superficie del agar, se colocaron a una distancia no menor de 30mm de centro a centro del disco y no se utilizaron más de 12 sensidiscos para placas de 150mm y más de 5 discos para placas de 100mm de diámetro.

TÉCNICA DE LA PRUEBA CON BD Phoenix™ AP

Este equipo proporciona una estandarización automatizada estandarizando el inóculo al McFarland requerido, el ID Broth se utiliza para la preparación del inóculo para los paneles Phoenix gram negativos, gram positivos, paneles de *Streptococcus* y de levaduras. Se utiliza para estandarizar el inóculo de 0.25 McFarland o el inóculo de 0.5 McFarland para la prueba de identificación y para inocular el caldo AST para la prueba de susceptibilidad. Almacena, controla y analiza toda la información desde la preparación del inóculo hasta el uso de los tubos ID-AST.

Debido a esto los errores de manejo y transcripción se reducen al mínimo además de que se adapta y facilita el trabajo de laboratorio mediante el control automático de las gradillas de inoculación, debido al uso de etiquetas de código de barras y la tecnología RFID de transmisión de datos.

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 70 muestras de carne cruda molida de res y puerco de la ciudad de Puebla, se



Imagen 1: Propia. Colonia típica de *Salmonella* spp. en medio XLD

obtuvieron 7 cepas que cumplían con las características bioquímicas de *Salmonella* spp.

Diversos estudios han demostrado la prevalencia de *Salmonella* spp. en rastros y principalmente en carne de cerdo, así como los factores de riesgo asociados a la presencia de la bacteria.

Este estudio se basó principalmente en pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo y al momento de elegir la metodología, se evaluó una serie de aspectos para saber que vía de aislamiento era la más efectiva. Por lo que en el enriquecimiento se utilizó el caldo tetracionato siendo que en una tesis anterior fue el mejor (Hernandez, 2015), y el medio de cultivo verde brillante fue el mejor para el aislamiento

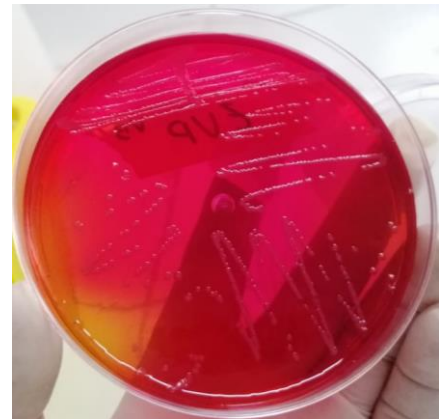
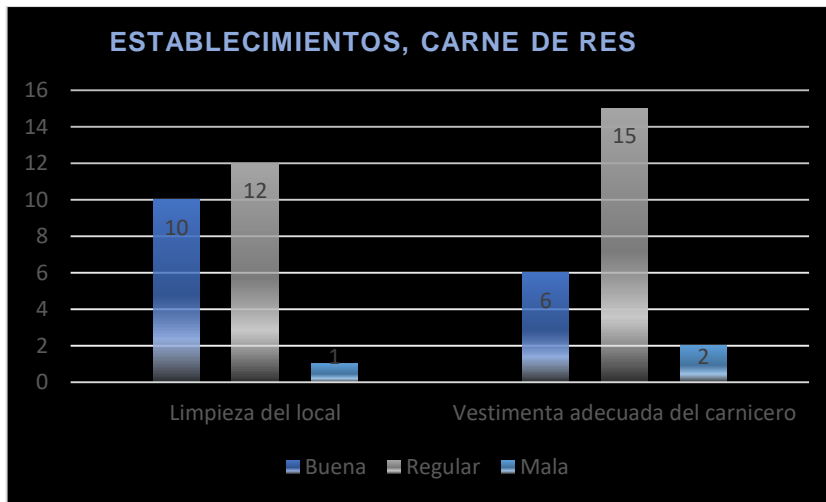


Imagen 2: Propia. Colonia típica de *Salmonella* spp. en medio Verde Brillante

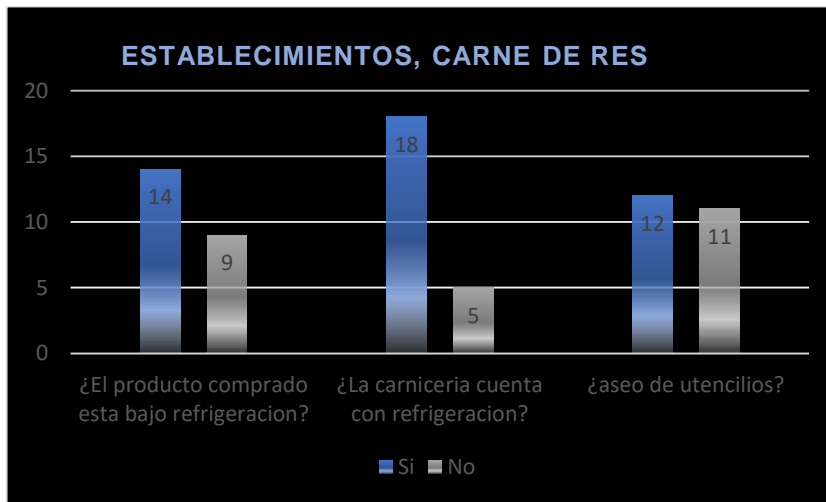
Para la confirmación de *Salmonella* spp. se refirieron las muestras a ICUAP y para la confirmación y especie de *Salmonella* spp se refirieron las muestras al Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla.

Todas las muestras provienen de diferentes establecimientos dentro de la ciudad de Puebla, dentro de este estudio valoramos por medio de una breve encuesta los distintos establecimientos de dónde provenía la carne.

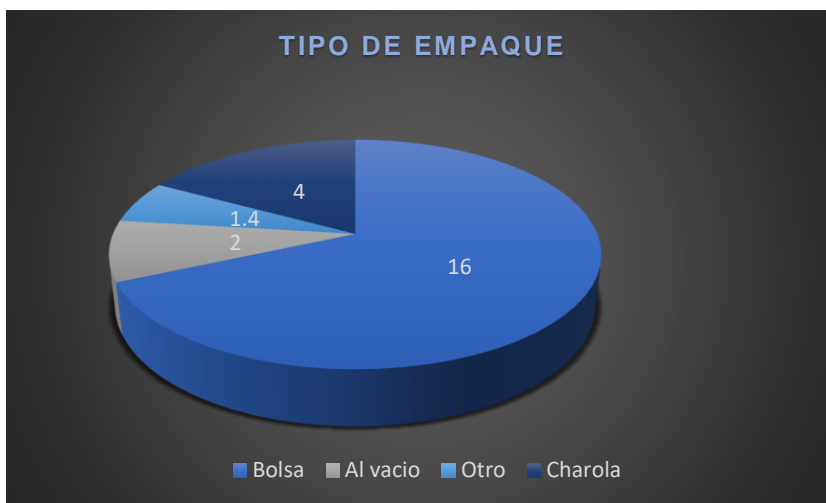
Las siguientes tres gráficas muestran los establecimientos donde se obtuvo la carne de res de la cual una muestra salió positiva a *Salmonella* spp. la cual su encuesta indica una buena limpieza del local (ver gráfica 1), el producto se encontraba en refrigeración (ver grafica 2), el empaque fue en bolsa (ver gráfica 3) como la mayoría de las demás muestras, pero igual indica que no hubo aseo de utensilios antes de despachar la carne para lo cual podríamos hablar de una contaminación cruzada.



Gráfica 1: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, refiriéndonos a limpieza del local e higiene del carnicero.

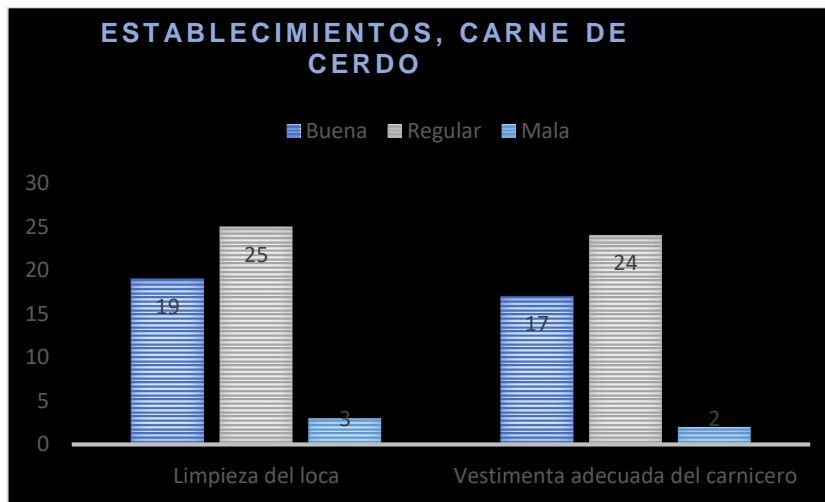


Gráfica 2: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, condiciones en las que se encuentra y maneja el producto

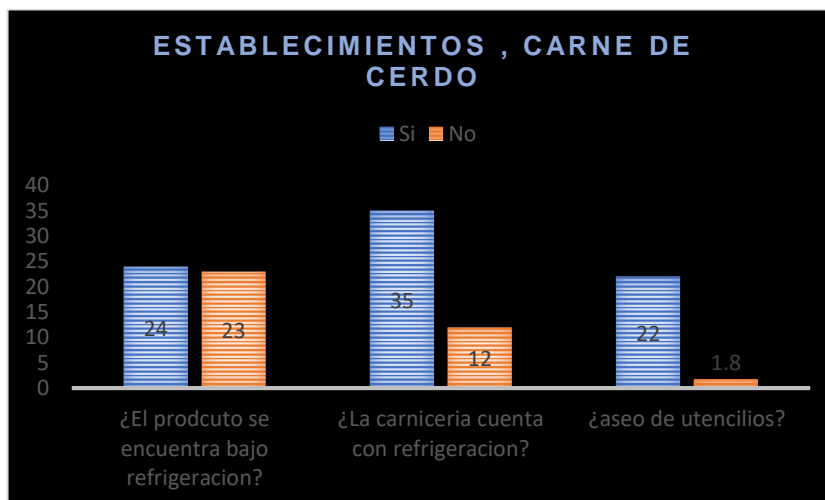


Gráfica 3: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de res, tipo de envase del producto

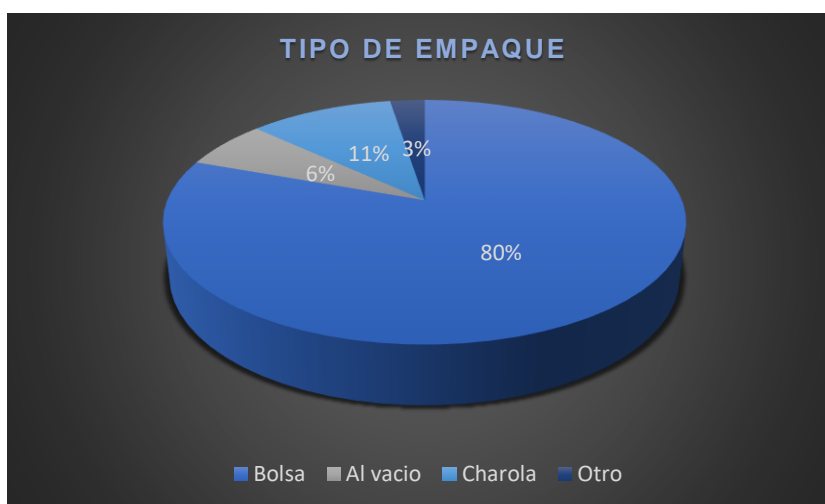
La carne de cerdo fue obtenida de 47 establecimientos diferentes y se encontraron 6 muestras positivas a *Salmonella* spp. la cual su encuesta indica una limpieza regular del local (ver gráfica 4), 4 muestras no se encontraban en refrigeración cuando se compró la carne (ver grafica 5), las 6 muestras fueron empaquetadas mediante una bolsa (ver gráfica 6) como la mayoría de las demás muestras y aunque en 4 muestras se realizó aseo de utensilios antes de despachar este fue mediante un trapo para lo cual también podríamos hablar de una contaminación cruzada.



Gráfica 4: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, refiriéndonos a limpieza del local e higiene del carnicero.



Gráfica 5: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, condiciones en las que se encuentra y maneja el producto



Gráfica 6: Encuesta, establecimientos donde se obtuvo la carne de cerdo, tipo de envase del producto

La carne puede venir desde el rastro ya contaminada pero también podría ser por una contaminación cruzada dentro de los establecimientos, por malas prácticas higiénicas.

Obtuvimos solo 7 muestras positivas a *Salmonella* spp. (ver tabla número 6). 1 muestra de carne bovina y 6 muestras de carne porcina, al contrario de Talavera *et al.*, 2011 menciona que en el 2010 la UNAM realizó un estudio donde aisló 87 cepas de un rastro en el estado de México

Tabla 6: Muestras positivas a *Salmonella* spp. identificadas en el laboratorio

Muestras positivas a *Salmonella* spp.

NO. de muestra	Procedencia	<i>Salmonella</i> spp
CR4	Carne molida de res	+
CP11	Carne molida de puerco	+
CP37	Carne molida de puerco	+
CP43	Carne molida de puerco	+
CP45	Carne molida de puerco	+
CP46	Carne molida de puerco	+
CP47	Carne molida de puerco	+

Las muestras que fueron positivas para *Salmonella* spp. se llevaron al Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, con uno de los mejores equipos en el área de microbiología, llamado espectrometría de masas (MALDI-TOF) el cual nos dio la confirmación de ser *Salmonella* spp. y la especie mediante puntuaciones de probabilidad, así mismo en el área de Epidemiología se le realizó la prueba de identificación de serogrupo, toda esta información se muestra en la tabla número 7.

Tabla 7: Muestras positivas a *Salmonella* spp. identificadas en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla

Muestras positivas a *Salmonella* spp.

No. de cepa	Serogrupo	Serotipo	Puntuación de probabilidad
CR4	“C”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Diarizonae)	2.32514360
CP11	“C”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Diarizonae)	2.37911310
CP37	“C”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Anatum)	2,28695210
CP43	“B”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Anatum)	1.96352010
CP45	“C”	<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis)	1.73927230
CP46	“C”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Anatum)	2.28655790
CP47	“B”	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Dublin)	1.9408875

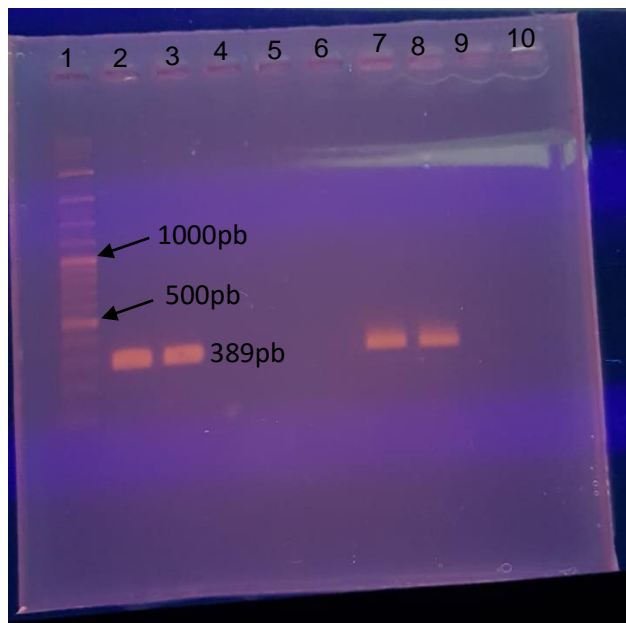


Imagen 3: Propia. Gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, donde se muestra un marcador de peso molecular 1500pb, segundo y séptimo se encuentra el gen *invA* con un tamaño de 389pb

De igual manera las 7 muestras se les realizó identificación mediante PCR en el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad de Puebla (ICUAP) donde se demostró que las muestras fueron positivas a *Salmonella* spp. (Imagen 3) en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, en el primer pozo se sitúa un marcador de peso molecular 1500pb en el segundo y séptimo se encuentra el control positivo de *Salmonella* spp., el gen *invA* con un tamaño de 389pb, por último, en el tercer y octavo pozo, la muestra, que muestra positividad a ser de mismo tamaño que el gen *invA*.

ANTIBIOGRAMA

El antibiograma realizado en el laboratorio fue con multidisco, así mismo en el laboratorio de ICUAP se realizó por el mismo método, obteniendo los mismos resultados mostrados en la siguiente tabla (ver tabla 8). El Antibiograma elaborado en el laboratorio estatal se realizó con el equipo BD PhoenixTM AP (Tabla 9) el cual estandariza el inóculo al McFarland requerido aparte de almacenar, controlar y analizar toda la información desde que estandariza el inóculo hasta el uso de tubos ID-AST. De acuerdo a los antibiogramas realizados podemos determinar que las siete cepas son mutirresistentes ya que presentan resistencia a cinco o más antibióticos de acuerdo con los antibiogramas, ver tabla 10 para tener una relación, número de muestra, serotipo, y antibióticos a los cuales fueron resistentes

En el estudio de Chiou *et al.*, 2011 reportan un nuevo serovar de *Salmonella* entérica serovar Anatum, en nuestro estudio reportamos que 3 cepas por puntuación de probabilidad indican ser *Salmonella* sp. (entérica st Anatum), siendo CP37 resistente a amikacina, cloranfenicol y gentamicina, CP43 resistente a amikacina, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoína, por último, CP46 solo indica ser resistente a amikacina y gentamicina.

Según Talavera *et al.*, 2011, Díaz y Espinal, 2013 obtuvieron cepas resistentes a cloranfenicol y nuestro estudio coincide que 4 cepas presentan tal resistencia

Por el contrario, a Talavera *et al.*, 2011 y Nayarit *et al.*, 2016 que muestran cepas resistentes a Trimetoprim-sulfametoxazol nuestro estudio reporta que solo la cepa CP11 *Salmonella* sp. (entérica st Diarizonae) es resistente a este antibiótico.

Tabla 8: Antibiograma realizado en el laboratorio de inocuidad de los alimentos e ICUAP

Antibiograma

Antibiótico	CR4	CP11	CP37	CP43	CP45	CP46	CP47
Amikacina	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	R	S	S	S	S	S	S
Carbenicilina	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxima	S	S	S	R	S	I	S
Ciprofloxacino	I	S	I	S	I	I	S
Cloranfenicol	R	R	R	S	R	S	S
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	R
Netilmicina	S	S	S	R	S	S	S
Nitrofurantoína	I	S	I	R	S	S	I
Norfloxacin	S	S	S	S	S	I	I
Trimetoprim-sulfametoxazol	S	R	S	S	S	S	S

Tabla 9: Antibiograma realizado en el Laboratorio de Salud Pública del estado de Puebla

Antibiograma 2

Antibiótico	CR4	CP11	CP37	CP43	CP45	CP46	CP47
Amikacina	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	R	S	S	S	S	S	S
Ampicilina-Sulbactam	R	S	S	S	S	S	S
Cefazolina	R	R	R	R	R	R	R
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S
Cefoxitina	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima	S	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	I	S	I	S	I	I	S
Ertapenem	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	R
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S
Levofloxacino	X	X	X	X	X	X	X
Meropenem	S	S	S	S	S	S	S
Piperacilina-Tzobactam	S	S	S	S	S	S	S
Tigeciclina	S	S	S	S	S	S	S
Trimetoprim-sulfametoxazol	S	R	S	S	S	S	S

Las 7 cepas aisladas en este proyecto en general fueron resistentes a antibióticos como: amikacina, carbenicilina, gentamicina, cefazolina y cefoxitina en un 100% mientras que cloranfenicol en un 57.14% y algunos otros como ampicilina, cefotaxima, netilmicina, nitrofurantoina, ampicilina-sulbactam y trimetoprim-sulfametoxazol presentaron una resistencia de 14.28%

Tabla 10: Relación de número de muestra, serotipo y antibióticos resistentes a las cepas

No. de cepa	Serotipo	Antibióticos donde se presenta resistencia
CR4	<i>Salmonella</i> sp. (entérica st Diarizonae)	Amikacina, Ampicilina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Gentamicina, Cefazolina, Cefoxitina.
CP11	<i>Salmonella</i> sp. (entérica st Diarizonae)	Amikacina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Gentamicina, Trimetoprim-sulfametoxazol, Cefazolina, Cefoxitina
CP37	<i>Salmonella</i> sp (entérica st Anatum)	Amikacina, Carbenicilina Cloranfenicol, Gentamicina, Cefazolina, Cefoxitina.
CP43	<i>Salmonella</i> sp. (entérica st Anatum)	Amikacina, Carbenicilina Cefotaxima, Gentamicina, Netilmicina, Nitrofurantoína, Cefazolina, Cefoxitina.
CP45	<i>Salmonella</i> sp. (choleraesuis)	Amikacina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Gentamicina, Cefazolina, Cefoxitina.
CP46	<i>Salmonella</i> sp. (entérica st Anatum)	Amikacina, Carbenicilina Gentamicina, Cefazolina, Cefoxitina.
CP47	<i>Salmonella</i> sp. (entérica st Dublin)	Amikacina, Carbenicilina, Gentamicina, Cefazolina, Cefoxitina

La Agencia de Alimentos y Drogas de Estados Unidos o FDA (Food and Drug Administration) impulsa distintas estrategias para reducir el uso de antibióticos en los animales de consumo, como promover la supervisión de un veterinario en el tratamiento de enfermedades en animales productores de alimento, parte de medidas sugeridas para

minimizar el problema de resistencia a los antibióticos, incluyendo promover cambios por parte de los productores **(FDA, 2019)**.

13. CONCLUSIONES

- ✚ Se recuperó un total de 7 cepas de *Salmonella* spp.
- ✚ La positividad a *Salmonella* a partir de muestras de carne cruda fue de 10.0 %.
- ✚ La recuperación de *Salmonella*, de acuerdo con el tipo de carne fue: res 1.42% y cerdo 8.57 %
- ✚ El 67.14% de las muestras resultaron positivas a *E. coli*, lo que indica una contaminación fecal.
- ✚ El 8.57% de las muestras fueron positivas a *Proteus*, lo que podría indicarnos contaminación fecal porque forma parte de la flora normal intestinal.
- ✚ El 5.71 de las muestras fueron positivas a *Campylobacter*, se identificaron con el equipo MALDI-TOF, la presencia de esta bacteria indica contaminación fecal se puede encontrar en el tracto intestinal de algunos animales entre ellos el ganado.
- ✚ La incidencia de *E. coli* (67.14%) fue mayor a la incidencia de *Salmonella* spp. (10%) en las muestras de carne cruda.
- ✚ Debido a la cantidad de cepas encontradas podría deberse a una contaminación cruzada, ya que la carne proviene de un mismo rastro.
- ✚ Se recomienda consumir este tipo de productos perfectamente bien cocinados (70°C).
- ✚ Ciprofloxacino y nitrofurantoína resultaron intermedio en 4 de 7 cepas, en un futuro se espera presente resistencia.
- ✚ Además, CR4 es resistente a ampicilinas
- ✚ CR4, CP11, CP37 y CP45 son multirresistentes a anfenicoles, aminoglucoSIDOS y cefalosporinas.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). Food microbiology. Cambridge, UK: RSC Publishing. 235-249pp.
- 2) Alos, J. I. y Rodriguez, J. B. (2010). ¿Qué antibióticos debemos informar en el antibiograma y cómo? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 Núm. 10, 737-741.
- 3) Barlow, R. S., DeBess, E. E., Winthrop, K. L., Lapidus, J. A., Vega, R., & Cieslak, P. R. (2014). Travel-associated Antimicrobial Drug-Resistant Nontyphoidal Salmonellae, 2004–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 20(4), 603-611. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/4/13-1063_article
- 4) Bergey, D. H. & Holt, J. G. (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 186-187, 241-242pp.
- 5) Blandino, H. L. J. (2005). La industria de la carne bovina en centroamerica: situación y perspectivas. Costa Rica: SIDE. 40-41 pp.
- 6) Bourgeois, C.M., Mezcle, J.F., Zucca, J. (1994). Microbiología Alimentaria: Aspectos Microbiológicos de la Seguridad y Calidad Alimentaria. Ed. Acribia
- 7) Charley, H. (2006). Tecnología de alimentos: procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. México: LIMUSA. 519-185pp.
- 8) Chiou, C., Hong, Y., Liao, Y., Wang, Y., Tu, Y., Chen, B....Chen, Y. (2019). New Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Anatum Clone, Taiwan, 2015–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25(1), 144-147. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2501.181103>.
- 9) Díaz G. S. Y. & Espinal E. G. (2013) “Efecto del pH, temperatura y concentración de cloruro de sodio sobre el comportamiento de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp (Tesis de pregrado) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Heroica Puebla de Zaragoza, México.
- 10) Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas, INEGI Junio 25, 2019 <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/denue/#>
- 11) Doyle P. M., Beuchat R. L. & Montville J. T. (2001). Food microbiology. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- 12) Doyle, M. P. & Buchanan, R. (2013). Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington, DC: American Society for Microbiology. 225-252pp.

- 13) Fabrega A, BAalleste-Delpierre C, Villa J. Diferencial impacto of ramRA mutations on both ramA transcription and decreased antimicrobial susceptibilidad in salmonella thyphimurium. J antimicrobe chemother. 2015 Dec 17.
- 14) FDA. Recalls, Market Withdrawals & Safety Alerts, 2019. Disponible en: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>
- 15) Fernández, E.E., 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. 261-305.
- 16) Flores, T. G. y Herrera, R. R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390. Recuperado en 25 de junio de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500010&lng=es&tlng=es.
- 17) Gil, A. 2010. Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la Nutrición. Tomo I. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. 660p.
- 18) Granados, P. R. y Villaverde, P. M. C. (1997). Microbiología. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas. Tomo I Madrid, España: Thomson Parainfo. 25-26, 28, 99-110pp.
- 19) INFOSAN. (2005). Resistencia antimicrobiana a *Salmonella*. 24 mayo del 2020, de Red internacional de autoridades de inocuidad de los alimentos Sitio web: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf
- 20) Jay, J. M. Loessner, M. J. & Golden,- D. A.. (2005). Modern food microbiology. New York: Springer. 619-630pp.
- 21) Jong, B. & K. Ekdahl. 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. BMC Public Health 10: 6:4.
- 22) Junod T, López-Martin J, Gädicke P. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. Rev Med Chile. 2013;141(3):298-304. doi: 10.4067/S0034-98872013000300003.
- 23) Jurado, J. R., Arenas, M. C., Doblas, D. A., Rivero, A. y Torre-Cisnerosa, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. Junio 25, 2019, de Medicine. Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea_otros_salmonellas_Medicine20100.pdf

- 24) Madigan, M.T, Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. 10ª edición, Ed. Pearson. 947-952, 738-745pp.
- 25) Montes, E., Lloret, I., López, M.A. 2009. Diseño y gestión de cocinas. Manual de higiene alimentaria aplicada al sector de la restauración. 2ª edición. Ed. Díaz Santos.41p.
- 26) Nayarit, B. N., Rubio L. M., Delgado S. E., Méndez M. D., Braña V. D., & Rodas S. O. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de Salmonella spp . aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 58(3), 371-377. <https://dx.doi.org/10.21149/spm.v58i3.7897>
- 27) Ochoa, IM y Rodríguez, AV (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp.
- 28) OMS. Organización Panamericana de la salud, 2019. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es
- 29) Prats, G. . (2005). Microbiología clínica. Buenos Aires, Argentina: Panamericana. 251-260pp.
- 30) Puig, P. Espino, H.Y., Leyva, C. M., Aportela, L.V., Machín, D.N., Soto, R.M., (2011). Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. *Rev. Panam. Salud Pública*. 30(6):561–5
- 31) Rivera C. M. S., Granda A. E., Felipe L. & Bonachea H. (2012). Resistencia antimicrobiana en cepas de Salmonella enterica subsp. enterica aisladas en carnes de aves importadas. *Revista de Salud Animal*, 34(2), 120-126. Recuperado en 24 de junio de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000200010&lng=es&tlng=es.
- 32) Rivera LG, Motta PA, Cerón MF, Chimonja FA. Resistencia de la Salmonella a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev CES Med Vet Zootec*. 2012; 7 (1):116-29.
- 33) Romero, C.R. 2007. Microbiología y Parasitología: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. Ed. Médica Panam. 795
- 34) Romero, C.R., Herrera, B.I. F. 2002. Síndrome Diarreico infeccioso. Ed. Médica Panamericana. 118-119.
- 35) Secretaria de Salud. Bienes y servicios. (1995) Método para la determinación de salmonella en alimentos. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994.

- 36) Secretaría de salud. Productos y servicios. (2015) Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014,
- 37) Sherris, J.C., Bauer, A.W. y M. Turk. BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial susceptibility Test Discs. Becton Dickinson. 2007
- 38) Talavera. R. M., Varela G., J. A., Reyes R. N. E., Lagunas B. S., Valladares C. B., Alonso F. M. U. & Velázquez O. V. (2011). Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de Salmonella spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Veterinaria México*, 42(4), 269-276. Recuperado en 20 de junio de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000400002&lng=es&tlng=es.