

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

Facultad de Ciencias Químicas

Especialidad en Tecnología e Inocuidad de Alimentos

Investigación de cepas de *Salmonella* spp a partir de muestras de pollo crudo en la ciudad de Puebla e investigación de su resistencia a antibióticos.

TESINA

Presentada como requisito para obtener el título de:

**Especialista en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos.**

PRESENTA

**Q.F.B. Bárbara Jesús Balcázar**

**Director**

**D. en C. Fausto Tejeda Trujillo**

**Co-Director**

**D. en C. Ivonne Pérez Xochipa**

Septiembre 2020

## ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Antecedentes.....	8
3.1 <i>Salmonella</i> .....	8
3.2 Hábitat y fuentes de aislamiento.....	8
3.3 Patogenicidad.....	9
3.4 Dosis infectante.....	9
3.5 Calidad de los alimentos.....	10
3.6. Epidemiología.....	11
4. Justificación.....	13
5. Objetivos.....	14
6. Diagrama de trabajo.....	15
7. Material y métodos.....	16
8. Desarrollo experimental.....	18
9. Resultados y discusión .....	21
10. Conclusiones .....	27
11. Recomendaciones .....	28
12. Referencias bibliográficas.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>No. Tabla</b>	<b>Página</b>
<i>Tabla 1. Materiales.</i>	<b>16</b>
<i>Tabla 2 Métodos</i>	<b>17</b>
<i>Tabla 3 Resultados Pruebas Bioquímicas</i>	<b>21</b>
<i>Tabla 4 Resultados de resistencia y sensibilidad a los antibióticos de las cepas recuperadas de Salmonella de pollo crudo.</i>	<b>23</b>
<i>Tabla 5. Comportamiento de las cepas de Salmonella spp aisladas a partir de rabadilla de pollo crudo.</i>	<b>26</b>

---

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

### No. Gráfico

### Página

*Gráfica 1 Porcentaje de cepas sensibles a diferentes antibióticos*

**24**

---

*Gráfica 2 Porcentaje de cepas resistentes a diferentes antibióticos*

**25**

---

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>No. Imagen</b>	<b>Página</b>
<i>Imagen 1. Puntos muestreados.</i>	<b>18</b>
<i>Imagen 2. Propia. Colonia típica de Salmonella en medio XLD</i>	<b>21</b>
<i>Imagen 3 Propia. Pruebas bioquímicas típicas de Salmonella</i>	<b>22</b>

---

## 1. RESUMEN

Consumir carne de aves conlleva un alto riesgo sanitario, debido a la posibilidad de que este alimento sea vehículo de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes*.

Por esto, es oportuno abordar el estudio sobre la incidencia de *Salmonella* spp en pollo crudo y la resistencia de esta a los antibióticos. Además, existe la necesidad de obtener nuevos datos de referencia actualizados sobre *Salmonella* en carne de pollo.

En primer lugar se abordó el estudio microbiológico en diferentes puntos de venta de pollo crudo de la ciudad de Puebla con énfasis en la recuperación de *Salmonella*. En segundo lugar se abordó el estudio de la resistencia de las diferentes cepas de *Salmonella* a diferentes antibióticos. Dándonos como resultado que de un total de 39 muestras de rabadilla de pollo crudo de la ciudad de Puebla, se obtuvieron 15 cepas que cumplían con las características bioquímicas de *Salmonella* spp, en las que se presentó resistencia a múltiples antibióticos

## 2. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) son un problema de salud pública y, entre los alimentos más frecuentemente involucrados como vehículos de *Salmonella* destacan: todo tipo de carne y productos horto frutícolas.<sup>1</sup>

La carne de pollo se considera un alimento de riesgo elevado debido a sus características fisicoquímicas (pH cercano a la neutralidad, actividad de agua alta, y alto contenido de proteínas y grasas), lo que hace factible la reproducción de microorganismos en la superficie interna y externa, entre estos microorganismos se incluyen patógenos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, los cuales son capaces de causar enfermedades en los consumidores<sup>3</sup>. Estas bacterias contaminan la carne de pollo durante diferentes procesos, especialmente en la etapa de evisceración, en la que se liberan bacterias presentes en el sistema gastrointestinal siendo las más frecuentes *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni*; en la etapa del despique, la contaminación se da con microorganismos como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, que provienen de superficies contaminadas o de manipuladores portadores<sup>4</sup>.

La salmonelosis es una infección bacteriana que afecta el tracto intestinal y en ocasiones, el torrente sanguíneo. Es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis. La mayoría de los casos se dan durante el verano y en casos específicos, pueden presentarse brotes epidémicos.<sup>7</sup>

Las infecciones por *Salmonella* causan principalmente fiebre, diarrea y dolor abdominal. Los síntomas duran pocos días y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento, aunque puede ser necesaria la hospitalización en algunos casos. En ocasiones, los animales son reservorios de *Salmonella*, y las personas adquieren la infección mediante el consumo de alimentos contaminados y con una cocción deficiente.<sup>1</sup>

El género *Salmonella* es de los más estudiados entre los patógenos que son aislados de alimentos. Esto es por la frecuencia con la que se encuentra implicada en brotes y casos de gastroenteritis, a su singular ecología y factores que la determinan, a la diversidad de serotipos y a la necesidad de disponer de técnicas más rápidas, sensibles y específicas para su aislamiento e identificación.<sup>8</sup>

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Salmonella

Se conoce como *Salmonella* spp: al bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado, no fermentador de la lactosa. Generalmente son móviles con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus serotipos. Es una bacteria patógena para el hombre y algunos animales.<sup>2</sup>

El nombre dado a este microorganismo fue introducido por Lignieres en 1900 en honor al doctor Salmon, quien aisló *Salmonella* por primera vez. El primer brote de Salmonelosis fue descrito en 1888, en Alemania donde 50 personas consumieron carne molida cruda procedente de una vaca moribunda.<sup>8</sup>

*Salmonella* se cultiva con facilidad en el laboratorio. Su temperatura mínima de crecimiento para fines prácticos es de 6° C. La máxima de 46°C (observada en algunos tipos de carne) con tiempo de generación de 30 minutos, y eventualmente hasta 49.5° C. La temperatura óptima se sitúa entre 35 y 37° C. La tasa de desarrollo empieza a disminuir notoriamente al bajar la temperatura a menos de 20° C y se vuelve muy lenta en refrigeración hasta los 5-6° C, cuando ya se detiene.<sup>8</sup>

#### 3.2 Hábitat y fuentes de aislamiento

*Salmonella* es una bacteria parásita intestinal de los animales, incluido el hombre. Es su hábitat natural. Se libera al medio ambiente cuando se expulsa por las heces. Muestra cierta capacidad de supervivencia en los materiales que contacta, y bajo condiciones favorables también se puede multiplicar en ellos; los alimentos no son la excepción. Así, una diversidad de localidades se convierte en reservorio extraintestinal del microorganismo, y por tanto en una fuente de contaminación a los alimentos. El problema se extiende en la medida en que el saneamiento general es atendido pobremente. Es decir, que el control de la fuente primaria de contaminación (materia fecal) no se ejerce correctamente. Aun fábricas, cocinas y otros sitios en los que se manejan alimentos pueden ser colonizados por *Salmonella*. La contaminación fecal no es el único precedente en casos o brotes de salmonelosis humana. Los huevos de aves puestos en condiciones sanitarias adecuadas no excluyen la presencia de materia fecal, ya que pueden ser portadores del patógeno.<sup>8</sup>

Las aves conforman un gran reservorio de *Salmonella*. El sitio de colonización de *Salmonella* en las aves es el ciego. La salmonelosis de las aves afecta principalmente a los animales jóvenes, presentando letalidades variables (0-80%).<sup>8</sup>



### 3.3 Patogenicidad

Después de atravesar las primeras defensas del tubo digestivo superior, al ser ingerida *Salmonella* alcanza la mucosa intestinal, y se inicia un proceso de colonización del íleon distal. Toma ventaja de cierto potencial para competir con la biota propia del intestino. Mediante acción de fimbrias, apéndices proteínicos y hemaglutininas no fimbriadas con glicoproteínas presentes en los enterocitos la bacteria se adhiere.<sup>8</sup> Quizá es un factor común entre las bacterias enteropatógenas, pero *Salmonella* es sobresaliente por su capacidad de evadir los mecanismos de defensa que ponen en operación los animales susceptibles. Se conocen varios genes que codifican una capacidad adherente e invasiva.<sup>8</sup>

Una vez fijada la bacteria a la membrana penetra por pinocitosis siguiendo un mecanismo que se regula por el incremento en la concentración de calcio intracelular, que daña los lípidos de la membrana. Donde se forman unas rugosidades a través de las cuales la bacteria penetra.<sup>8</sup> Una sola rugosidad, creada por el patógeno se convierte en vía de acceso para muchas células bacterianas adheridas y adyacentes, dando lugar a la macropinocitosis. Ya dentro de la célula intestinal la bacteria se multiplica dentro de la vacuola; las bacterias generadas pasan a la lámina propia de la mucosa intestinal, en este momento se inicia un proceso inflamatorio o el ingreso a la circulación sanguínea que permite la entrada a otros tejidos y mayor multiplicación, todo esto depende de la virulencia del microorganismo y la capacidad que tenga para enfrentar los mecanismos de defensa del huésped, incluyendo la fagocitosis y la acción de anticuerpos. La falta de los mecanismos de adhesión en una cepa suprime la fijación a la mucosa intestinal. Como en otros procesos diarreicos infecciosos, se activa la adenil ciclasa de los enterocitos que da lugar a una elevación en la concentración de AMP cíclico. La consecuencia es la salida de líquido al lumen intestinal, secreción de cloruros en las criptas y disminución de la absorción de sodio en las vellosidades.<sup>8</sup>

### 3.4 Dosis Infectante

La dosis infectante es el número mínimo de microorganismos necesarios para causar enfermedades. En la mayoría de los casos, el tema de la dosis infectante mínima no puede responderse fácil. Hay algunas cuestiones a considerar; primero que existen grupos de riesgo entre los consumidores (niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeficientes) que pueden enfermar cuando se exponen a un número mínimo de patógenos. Segundo, hay factores fisiológicos que intervienen en la dosis infectante mínima, como son el grado de acidez gástrica, el contenido gástrico, la biota intestinal y el estado inmunológico de la persona. Esto se ve afectado por la inmunidad adquirida a través de recientes infecciones, el estado nutricional y el nivel de estrés del individuo.<sup>9</sup>

De igual manera, se debe tener en cuenta que la cantidad de microorganismos en un alimento cambia constantemente, cosa que no ocurre en la contaminación por sustancias químicas.<sup>9</sup>

La cinética de muerte, la fase estacionaria y multiplicación de las bacterias en los alimentos se determina por diversos factores, entre estos se encuentran: los intrínsecos, extrínsecos y factores del proceso. Incluyen el pH, Aw, potencial de óxido reducción (redox), composición química del alimento, temperatura, humedad relativa, y la presencia de la biota competitiva. Por esto, los riesgos relacionados con las bacterias, varían y esto va a depender de la constitución del alimento, el proceso de producción o preparación y de las condiciones de embalaje y almacenamiento.<sup>9</sup>

La dosis infectante, en el caso de *Salmonella* va de  $10^4 - 10^9$  células viables por gramo, dato que debe ser considerado con mucho cuidado.<sup>9</sup>

El estimado anual de infecciones por *Salmonella* spp en los humanos supera los 93,800,000, con 155,000 muertes a nivel mundial.<sup>11</sup>

En América Latina, Asia y África, la incidencia registrada al año de salmonelosis es de 200 a 500 casos por cada 100 000 habitantes.<sup>12</sup>

El contagio de *Salmonella* spp de persona a persona no es frecuente, por lo que los alimentos representan la fuente principal de exposición humana.<sup>13</sup>

El 95% de las infecciones por *Salmonella* están relacionadas con alimentos de origen animal.<sup>14</sup> En los últimos años, algunos estudios reportan un aumento en la resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos.<sup>15</sup>

El aumento de la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp se atribuye al uso descontrolado de antibióticos, tanto en el ámbito clínico como en el veterinario.<sup>16</sup> En la industria ganadera en particular, los antibióticos no se utilizados solamente con fines terapéuticos, sino que, además, se utilizan como promotores de crecimiento en dosis subterapéuticas durante periodos largos de tiempo.<sup>17</sup>

### **3.5 Calidad de los alimentos**

La calidad de los alimentos está influenciada por los cambios químicos y físicos asociados, con sus propiedades intrínsecas o variables ambientales. La pérdida de calidad también puede ocurrir debido a cambios enzimáticos producidos por las enzimas intrínsecas o agentes microbianos.<sup>26</sup>

Los alimentos de origen animal se contaminan fácilmente con microorganismos, esto en carne y productos avícolas puede tener consecuencias importantes en el deterioro y la calidad de estos.<sup>26</sup>

La contaminación en carne de pollo es indeseable pero inevitable, y depende de la calidad microbiológica de las canales utilizadas como materia prima. Las prácticas

de higiene durante la manipulación, el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan de forma simultánea en la reproducción de microorganismos.<sup>26</sup>

En la carne de ave se pueden encontrar cientos de especies de microorganismos. Estos pueden dividirse en dos grupos, por una parte, los que pueden producir enfermedades en humanos, denominados patógenos, y por otra, los que causan alteración de la carne conocidos como microorganismos deterioradores.<sup>26</sup>

### 3.6 Epidemiología

La salmonelosis es una preocupación en el ámbito de salud pública en todo el mundo. *Salmonella* entérica ocasiona infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede causar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunodeficientes.<sup>18</sup> En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que permiten tener una aproximación más certera respecto a la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el efecto que tienen en la mortalidad y morbilidad de la población.<sup>19</sup>

En Estados Unidos de América y Reino Unido, se calcula que al año ocurren 1,412,498 infecciones por *Salmonella Typhi* y 73,193 infecciones por *Salmonella* no Typhi<sup>20</sup>, se cree que este patógeno es el causante del 30% de las muertes relacionadas a ETA's. Los investigadores y las autoridades sanitarias declaran que, en general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios más frecuentes de *Salmonella*; la ingestión de alimentos contaminados es la causa más común de las infecciones en el humano; y que todas las serovariedades tienen el mismo grado de patogenicidad.<sup>21</sup>

Hasta la fecha hay pocos estudios sobre la transmisión de *Salmonella* que abarquen la cadena alimenticia completa y las condiciones que necesita para ocasionar salmonelosis en los humanos. Por esto, la inocuidad alimentaria recomienda medidas de control y límites permisibles basándose en información epidemiológica que se obtiene de estudios transversales realizados en los países industrializados.<sup>9</sup>

México no tiene las estadísticas de infecciones por *Salmonella*.

Con frecuencia, los médicos diagnostican con base en el cuadro clínico del paciente, sin contar con los estudios microbiológicos adecuados para establecer un diagnóstico correcto.<sup>25</sup>

La falta de un buen sistema epidemiológico con comunicación entre, hospitales, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura adecuada, hace difícil la tarea de que países como México puedan identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en diferentes alimentos, así como el riesgo que cada una de estas

representa para la salud de los seres humanos. Estos datos son esenciales para instaurar medidas necesarias para disminuir la mortalidad y morbilidad por infecciones ocasionadas por *Salmonella*.<sup>25</sup>

En reacción a la necesidad de obtener más información sobre la transmisión de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimenticia en México, la Dra. Mussaret y cols. establecieron un sistema de vigilancia activo, que incluyó a los Estados de Yucatán, San Luis Potosí, Michoacán y Sonora. El sistema incluyó muestras de humanos, carnes crudas, e intestinos de animales sacrificados en rastros.<sup>22</sup>

La peculiar forma de infección por *Salmonella* en el humano es la fiebre tifoidea, que se debe a la ingestión e invasión intestinal por un serotipo específico de *Salmonella*, el serovar Typhi (*S. typhi*), que ocasiona infección sistémica. De hecho, las salmonelosis originadas por otros serotipos comúnmente causan gastroenteritis, aunque, pueden presentar cuadros invasivos.<sup>23</sup>

Actualmente hay disponibles tres tipos de vacunas contra la fiebre tifoidea:

- a) La vacuna parenteral K (muerta por acetona) y vacuna parenteral L (muerta por calor-fenol). Estas otorgan de 79-88% y de 51-77% respectivamente de protección, además de presentar efectos secundarios fuerte lo cual las hace poco viables.
- b) La vacuna oral Ty21a, fabricada a partir de *S. Typhi* atenuada por mutagénesis química. Ha demostrado inducir del 67% al 96% de protección, pero requiere de 3-4 dosis para la generación de Ac y de refuerzo cada 5 años, lo que la hace una vacuna cara y no práctica para zonas endémicas.
- c) La vacuna parenteral a base del Ag capsular Vi, que es un polisacárido que recubre a la bacteria. En estudios de campo, se demostró que la vacuna induce elevados títulos de Ac y confiere una protección del 64% - 72%. Debido a su naturaleza química, el polisacárido Vi no induce memoria inmunológica por esto se necesitan refuerzos cada 3 años y es poco inmunogénico en niños menores de 2 años y en adultos mayores.

Hay que remarcar, que no existe hasta la fecha una vacuna contra las otras serovariedades de *Salmonella* capaces de producir infecciones sistémicas.<sup>9</sup>

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En México, los habitantes tiene una demanda cada vez más grande por los productos cárnicos provenientes de aves, que constituye actualmente la fuente de proteína principal (27.6 kg por habitante al año), esto se refleja en el crecimiento que ha tenido en los últimos años la producción avícola. Aunque, hay que destacar que solo el 25% de la producción avícola se beneficia en lugares autorizados, ya que la mayoría vende sus productos en establecimientos no autorizados con deficientes condiciones sanitarias. Las deficiencias más frecuentes son la ausencia de agua, uso de agua contaminada, mal control de temperatura (falta de refrigeración), y proceso de eviscerado deficiente, entre otras, esto puede ocasionar la contaminación de la canal con *Salmonella* spp. El mejorar las prácticas de higiene en estos establecimientos pueden reducir significativamente el riesgo de contaminación por *Salmonella*.<sup>7</sup>

*Salmonella* spp es capaz de infectar a personas de cualquier edad, la información epidemiológica arroja que la susceptibilidad es mayor en niños, ancianos y personas inmunodeficientes. En 2016, la OPS determinó que el 16% de aislamientos en casos de ETA durante el periodo 2010-2016 en 10 países de Sudamérica, incluido México, detecto *Salmonella* spp, de los cuales el 20% se presentó en carne de ave.<sup>9</sup>

Asimismo, en 2017 se encontró que los casos de salmonelosis aumentaron, siendo los niños el grupo más vulnerable, de los que la mayoría tenían como fuente de proteína a los productos cárnicos avícolas por lo que es esencial evaluar la presencia de patógenos en pollo y a su vez evaluar la resistencia antibióticos.<sup>9</sup>

## 5. OBJETIVOS

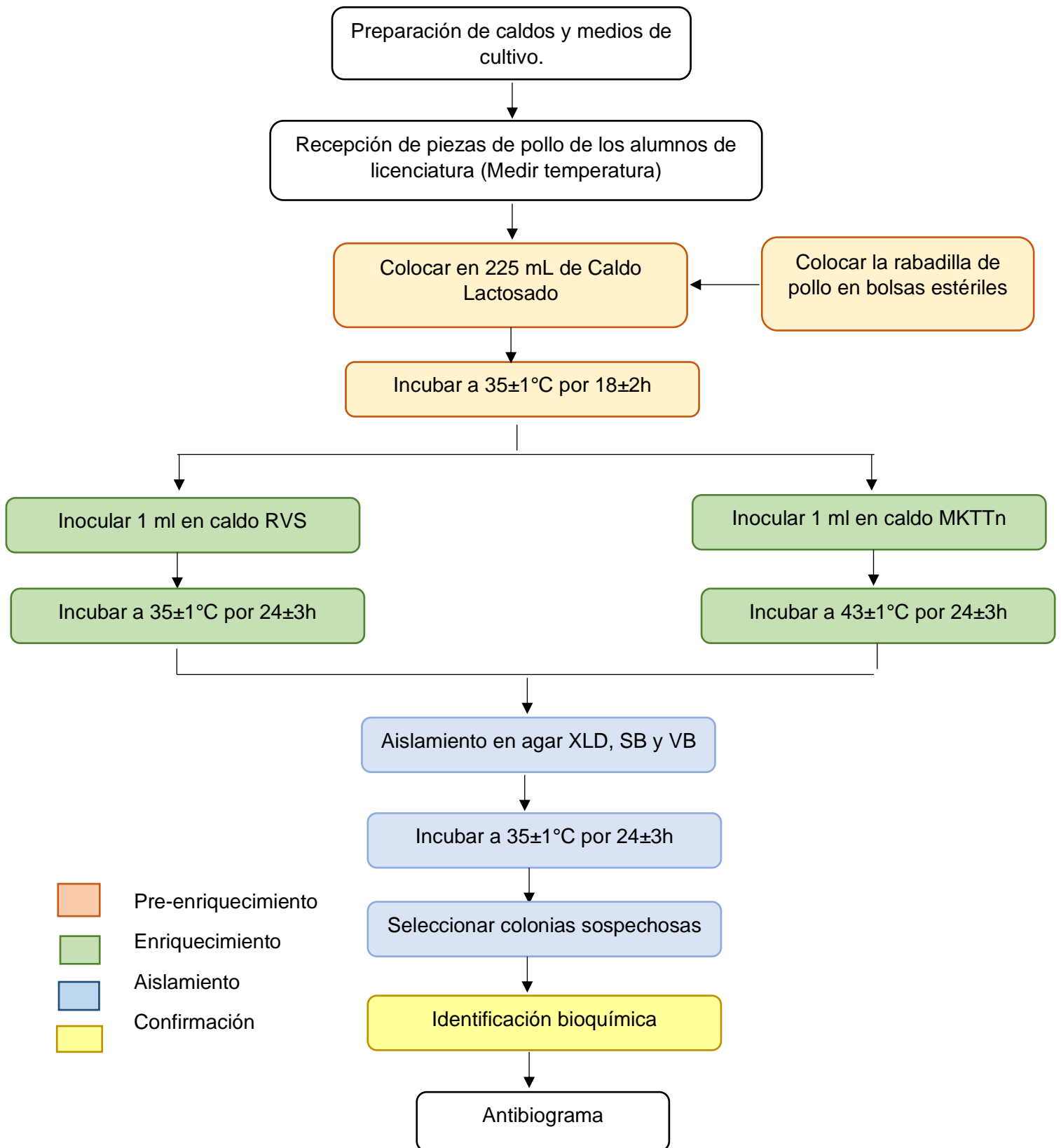
### OBJETIVO GENERAL

- Investigación de cepas de *Salmonella* spp a partir de muestras de pollo crudo que se vende en la ciudad de Puebla.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la búsqueda y aislamiento de *Salmonella* spp en muestras de pollo crudo que se expende en la ciudad de Puebla.
- Investigar la resistencia a antibióticos de las cepas recuperadas del pollo crudo analizado.

## 6. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

EQUIPO Y MATERIAL	CLASIFICACIÓN	CALIBRACIÓN	REGISTRO INTERNO LERIM
<b>Pipeta semi automatizada calibrada de diferentes volúmenes</b>	Instrumento de medición	Vigente	Pipeta-01 Pipeta-02 Pipeta-03 Pipeta-04
<b>Puntas estériles</b>	Equipo auxiliar	NA	Sin clave
<b>Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades</b>	Equipo auxiliar	NA	
<b>Stomacher</b>	Equipo auxiliar	NA	Stomacher-01
<b>Incubadora calibrada a 35° C</b>	Equipo	Vigente	Incubadora-01
<b>Termómetros calibrados</b>	Instrumento de medición	Vigente	Termómetro-01 Termómetro-02
<b>Cajas Petri grandes</b>	Material	NA	Sin clave
<b>Caldo lactosado</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Caldo tetrionato</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Caldo Rappaport-Vassiliadis</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Agar sulfito de bismuto</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Agar XLD</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Agar Verde Brillante</b>	Medio de cultivo	NA	
<b>Tubos de ensaye</b>	Equipo auxiliar	NA	Sin clave
<b>Vortex</b>	Equipo auxiliar	NA	Vórtex-01
<b>Mecheros</b>	Equipo auxiliar	NA	Mechero-01 Mechero-02
<b>Asa de platino 10µl</b>	Equipo auxiliar	NA	
<b>Bolsas estériles</b>	Equipo auxiliar	NA	Sin clave
<b>Autoclave calibrada</b>	Equipo	Vigente	Autoclave-01
<b>Báscula calibrada</b>	Equipo	Vigente	Báscula-01
<b>Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)</b>	Prueba Bioquímica	NA	
<b>Agar Lisina Hierro (LIA)</b>	Prueba Bioquímica	NA	
<b>Medio Movilidad Indol Ornitina (MIO)</b>	Prueba Bioquímica	NA	
<b>Solución salina</b>	Reactivo	NA	
<b>Reactivo de Kovacs</b>	Reactivo	NA	
<b>Antisuero somático (O) polivalente de <i>Salmonella</i> spp</b>	Reactivo	NA	

Tabla 1. Materiales.



Técnica	Referencia
<b>Método de referencia para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.</b>	NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
<b>Determinación de <i>Salmonella</i> spp</b>	NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos.

Tabla 2. Métodos.

## 8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El procedimiento para la recolección de las muestras de pollo, fue el siguiente:

1. Las piezas de pollo fueron obtenidas por los estudiantes de la licenciatura de QFB de la Facultad de Cs. Químicas BUAP de acuerdo a los puntos de muestreo que se presentan en la Imagen 1.
2. Se les hizo la petición de que fuera específicamente la rabadilla del pollo y se les dió un cuestionario para que lo llenaran en el momento de comprar.
3. Se transportaron 39 rabadillas de pollo al laboratorio para iniciar su procesamiento, cuidando la cadena de frío.
4. Se procedió a manipular cada pieza de pollo para iniciar con el paso de pre-enriquecimiento.

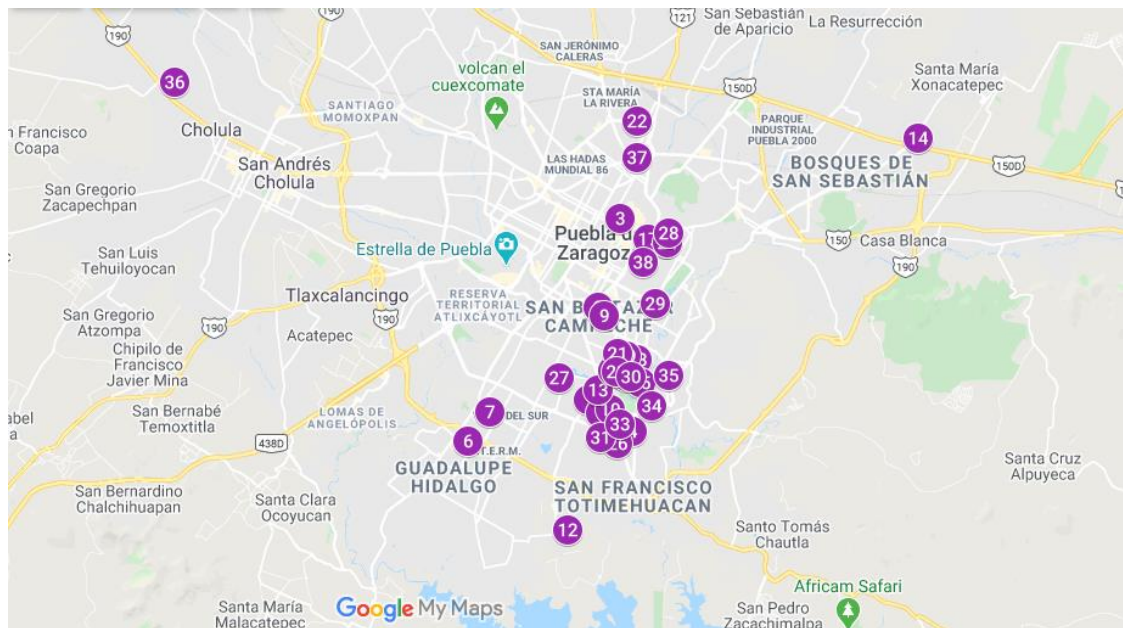


Imagen 1. Puntos muestreados.

La técnica para la determinación de *Salmonella* en alimentos, consistió de los siguientes 4 pasos<sup>2</sup>:

1. **Pre-enriquecimiento.** Es el paso donde la muestra es pre-enriquecida en un medio nutritivo no selectivo que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.
2. **Enriquecimiento.** Empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.
3. **Aislamiento en medios sólidos.** En este paso se utilizan medios selectivos y diferenciales que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

4. **Identificación bioquímica.** Este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos

1. **Preparación de la muestra.**

Se realizó el análisis de la rabadilla completa en una proporción muestra/caldo. Esta cantidad puede variar siempre que se mantenga esta proporción. En este caso, se colocó en condiciones de esterilidad la rabadilla entera en 225 mL de caldo lactosado.

2. **Pre enriquecimiento**

Se introdujo asépticamente la muestra completa en una bolsa estéril para colocarla en el homogeneizador (Stomacher). Adicionar 225 mL del medio de pre enriquecimiento estéril (caldo lactosado) se homogenizó e incubó por 24+2 h. a 35°C.

3. **Enriquecimiento.**

Se agitó suavemente las bolsas con los cultivos de pre enriquecimiento, se transfirieron 1 mL de la mezcla a un tubo con 10 mL de caldo tetrionato adicionado de 0.2 mL de yodo y a otro con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis. Se incubaron entre 18-24 h. a 43 y 35°C respectivamente.

4. **Aislamiento de *Salmonella*.**

Al término de la incubación, se mezclaron los tubos de enriquecimiento, se estiraron en agar verde brillante, agar sulfito de bismuto y agar XLD. Las placas se incubaron por 24-48 h a 35°C, respectivamente.

Finalmente, se examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella* de acuerdo con las siguientes características:

a) Agar verde brillante: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por un halo rojo, las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias verdes o verde-amarillas.

b) Agar sulfito de bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser cafés, grises o negras: con o sin brillo metálico. Generalmente presentan un halo café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro.

c) Agar XLD: Colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

## **5. Identificación bioquímica.**

Se seleccionaron las colonias típicas de cada medio selectivo que se encuentren bien aisladas. Se tocaron levemente el centro de cada colonia e inocularon tubos con: agar triple azúcar hierro (TSI) y agar hierro lisina (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.

Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

a) Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

b) Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* producen H<sub>2</sub>S en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

c) Medio MIO: Se observa un color gris-púrpura debido a la descarboxilación de la ornitina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del medio.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 39 muestras de rabadilla de pollo crudo de la ciudad de Puebla, se obtuvieron 15 cepas que cumplían con las características bioquímicas de *Salmonella* spp.

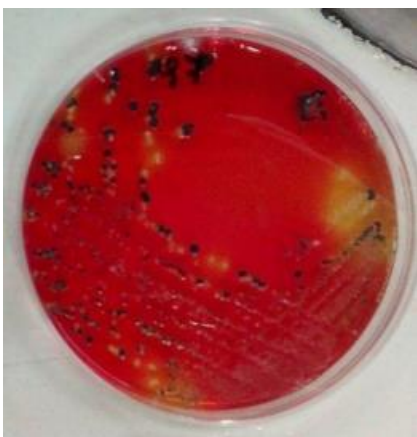


Imagen 2.. Propia. Colonia típica de *Salmonella* en medio XLD

Diversos estudios han demostrado la prevalencia de *Salmonella* spp. en granjas aviares, así como los factores de riesgo asociados a la presencia de la bacteria y la prevalencia en canales en las plantas de sacrificio y en expendios de pollo crudo.<sup>7</sup>

Este estudio se centró en la utilización de pruebas bioquímicas para la identificación. Al momento de elegir la metodología, se evaluó una serie de aspectos para saber que vía de aislamiento era la más efectiva.

Se obtuvo como resultado que el caldo tetracionato fue el mejor para enriquecimiento y el medio de cultivo verde brillante fue el mejor para aislamiento.

En la tabla 3 se muestra el resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas sospechosas de *Salmonella* spp.

Cepa	TSI	LIA	Descarboxilación	Desaminación	MIO
1	A/A	K/K	+	-	+ - +
2	K/A	K/K	+	-	+ - +
3	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
4	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
5	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
6	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
7	A/A	K/K	+	-	+ - +
8	K/A	K/K	+	-	+ - +
9	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
10	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
11	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
12	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
13	A/A	K/K	+	-	+ - +
14	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +
15	K/A <sup>+</sup>	K/K <sup>+</sup>	+	-	+ - +

Tabla 3. Resultado de las pruebas bioquímicas de *Salmonella* aislada de pollos.



Imagen 3. Propia. Pruebas bioquímicas típicas de *Salmonella*

Del 100 % de las muestras procesadas, en el 38.4% se aisló *Salmonella* spp.

Es importante mencionar que, aunque solo en 15 muestras se identificó *Salmonella* spp, se observó que las muestras restantes presentaron abundante crecimiento de bacterias Gram negativas, lo que nos indica la alta concentración microbiana que existe en productos como el pollo crudo.

En la mayoría de los casos *Salmonella* spp fue resistente a más de un antibiótico, incluyendo sulfametoxazol/trimetoprim, nitrofurantoina, ampicilina, carbenicilina, ciprofloxacino, cloranfenicol.

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10	Cepa 11	Cepa 12	Cepa 13	Cepa 14	Cepa 15
AM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
AK	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
CB	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GE	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S
CF	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S
CFX	S	S	R	R	S	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S
NET	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S
CPF	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I
NOF	I	S	R	I	I	I	I	I	R	R	I	S	I	S	S
CL	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
STX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

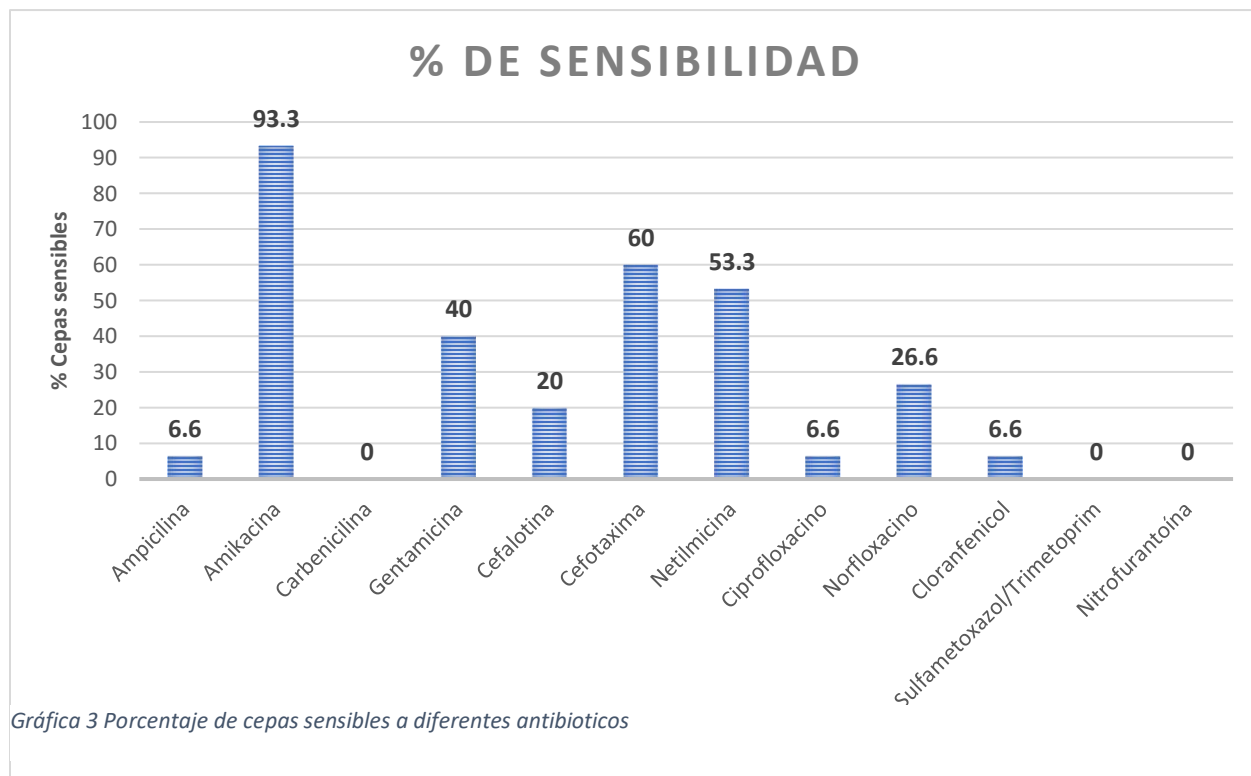
Tabla 4. Resultados de resistencia y sensibilidad a los antibióticos de las cepas recuperadas de *Salmonella* de pollo crudo. R= Resistente, I= Intermedio, S= Sensible.

La resistencia de *Salmonella* spp y otras bacterias a los antimicrobianos constituye un motivo de preocupación en el ámbito de la salud pública a nivel mundial.

La resistencia a los antimicrobianos puede asociarse al fracaso terapéutico en humanos y alargar la estancia hospitalaria, produciendo aumento en el gasto de los sistemas de salud. Así mismo, los costos económicos, sociales y emocionales para los pacientes se ven incrementados.

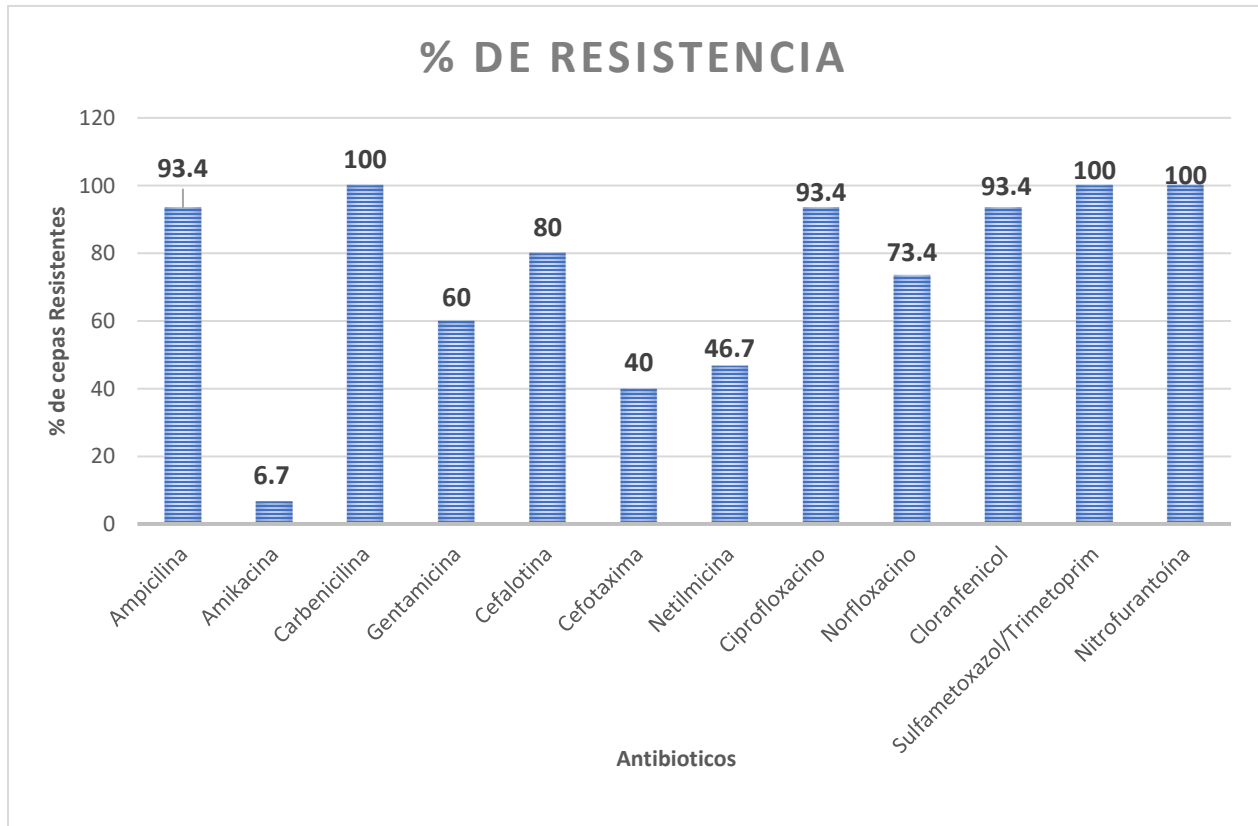
La elevada frecuencia de resistencia a antibióticos observada en la presente investigación, incluyendo aquellos de uso clínico para el tratamiento de la salmonelosis, indican la necesidad de establecer sistemas de control y vigilancia adecuados para reducir la resistencia en aislamientos de alimentos de origen animal. Se ha sugerido que el uso extenso de antibióticos en humanos, y en particular el uso prolongado de antibióticos en la producción animal, pueden contribuir a la aparición de resistencia a antibióticos.

Por ejemplo, se ha sugerido que la alta frecuencia de resistencia a quinolonas en los aislamientos de *Salmonella* spp, particularmente en aquellos de origen aviar, se debe al uso frecuente de estos con fines terapéuticos o metafilácticos



Los antibióticos a los que las cepas aisladas de *Salmonella* spp presentaron mayor sensibilidad fueron amikacina, cefotaxima y netilmicina.





Gráfica 4 Porcentaje de cepas resistentes a diferentes antibióticos.

La mayoría de las cepas de *Salmonella* spp recuperadas presentaron resistencia a múltiples antibióticos, que son usados como primera opción en el tratamiento de salmonelosis en humanos, como cloranfenicol, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol y carbenicilina. De acuerdo con los resultados, los aislamientos de *Salmonella* spp presentaron resistencia a amikacina con menor frecuencia que a otros antibióticos de uso frecuente en la salmonelosis, por lo que este antibiótico podría resultar la mejor opción terapéutica para iniciar un tratamiento empírico. De estos resultados se observa que los antibióticos a los que las cepas aisladas de *Salmonella* spp. presentaron mayor sensibilidad, además de la amikacina, fueron cefotaxima y netilmicina.

<b>Antibiótico</b>	<b>Sensible (n)</b>	<b>Intermedio (n)</b>	<b>Resistente (n)</b>
Ampicilina	1	0	14
Amikacina	14	1	0
Carbenicilina	0	1	14
Gentamicina	8	0	7
Cefalotina	3	2	10
Cefotaxima	9	1	5
Netilmicina	8	0	7
Ciprofloxacino	1	3	11
Norfloxacino	4	8	3
Cloranfenicol	1	0	14
Sulfametoxazol/Trimetoprim	0	0	15
Nitrofurantoína	0	0	15

*Tabla 5. Comportamiento de las cepas de Salmonella spp aisladas a partir de rabadilla de pollo crudo.*

Como parte de las medidas sugeridas para minimizar el problema de resistencia a los antibióticos. 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, incluyendo promover cambios voluntarios por parte de los productores. La FDA promueve el rol del veterinario para la supervisión del tratamiento, control y prevención de enfermedades en los animales productores de alimentos, además considera que el cambio voluntario de los productores es la forma más eficaz para poner en práctica cambios duraderos orientados a proteger la salud pública y animal.<sup>7</sup>

Según la OMS, los establecimientos de venta ambulante deben de estar constituidos de tal manera que se evite la contaminación de los alimentos, la proliferación de plagas y la contaminación al momento de la manipulación del alimento; además el personal debe de ser muy cuidadoso con las buenas prácticas de higiene, lo que no ocurre en la mayoría de los establecimientos ya sean ambulantes o fijos que venden pollo crudo. En las encuestas realizadas, la mayoría de los establecimientos tenían el pollo crudo expuesto y a temperatura ambiente.<sup>9</sup>

## 10. CONCLUSIONES

- Se logró aislar e identificar mediante análisis microbiológicos la presencia de *Salmonella* spp en pollo crudo de la ciudad de Puebla, estableciendo su incidencia en un 38.4 % de los casos.
- Las cepas aisladas de *Salmonella* spp obtenidas de pollo crudo presentaron resistencia a múltiples antibióticos.
- Se encontró un alto grado de resistencia (100%) a los siguientes antibióticos: Sulfametoxazol/Trimetoprim y Nitrofurantoína
- Se encontró un alto grado de sensibilidad (93.3%) al antibiótico Amikacina.
- Las malas prácticas de higiene en los puntos de venta de pollo crudo de la ciudad de Puebla se ven reflejadas en la calidad microbiológica del producto.

## 11. RECOMENDACIONES

- Debido a la frecuencia con la que se aisló *Salmonella* spp se recomienda cocer perfectamente el pollo antes de su consumo.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la metodología recomendada para la recuperación de cepas de *Salmonella* es:  
Pre-enriquecimiento: Caldo lactosado  
Enriquecimiento: Caldo Tetrionato  
Aislamiento: Verde Brillante Agar
- Es importante que más estados de la República Mexicana realicen y publiquen estudios sobre la resistencia de *Salmonella* spp para establecer y monitorear estrategias de control adecuadas.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Salmonellosis. Stockholm: ECDC [consultado 25 Feb 2015]. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/salmonellosis/Pages/index.aspx>
2. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
3. Thorns CJ. Bacterial food-borne zoonoses. Rev Sci Tech. 2000;19:226-39.
4. Cevallos C, Hernández-Pezzi G, Torres A, Ordóñez P, Villarrubia S, María J. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España. 2003 (excluye brotes hídricos). Boletín Epidemiológico Semanal. 2005;13:25.
5. Giraudon I, Cathcart S, Blomqvist S, Littleton A, Surman-Lee S, Mifsud A, *et al.* Large outbreak of Salmonella phage type 1 infection with high infections rate and severe illness associated with fast foods premises. Public Health. 2009;123:444 <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2009.03.011>
6. Fica A, Alexandre M, Prat S, Fernández A, Fernández J, Heitman I. *Salmonella* Enteritidis, un patógeno entérico ligado a la industria de los alimentos. Bol Cient Asoc Chil Segur. 2016;2:4-10
7. FDA. Recalls, Market Withdrawals & Safety Alerts, 2019. Disponible en: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>
8. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Fernández Escartín Eduardo, UAQ 2008.
9. 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](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es)
10. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
11. Cardona-Castro NM, SánchezJiménez MM, Usuga-Silva LY, Arboleda-Naranjo M, Garzón E, Vélez A, *et al.* Caracterización de dos brotes de fiebre tifoidea en Apartadó, Antioquia. Biomedica. 2007;27(2):236-43. doi: 10.7705/biomedica.v27i2.219
12. Cardona-Castro NM, SánchezJiménez MM, Usuga-Silva LY, Arboleda-Naranjo M, Garzón E, Vélez A, *et al.* Caracterización de dos brotes de fiebre tifoidea en Apartadó, Antioquia. Biomedica. 2007;27(2):236-43. doi: 10.7705/biomedica.v27i2.219
13. Puig Y, Espino M, Leyva V, Martino T, Mendez D, Soto P, *et al.* Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico y alimentario. Rev Panam Infectol. 2007;9(3):12-6.
14. Miranda JM, Mondragón AC, Martínez B, Guarddon M, Rodríguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella from different raw foods in Mexico. J Food Prot. 2009;72(5):966-71.

15. 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.
16. 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.
17. Cota-Rubio E, Hurtado-Ayala L, Pérez-Morales E, Alcántara-Jurado L. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. RelbCi. 2014;1(1):75-85.
18. Goldberg, M.B. & R.H. Rubin. 1988. The spectrum of Salmonella infection. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2:571-598.
19. de 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.
20. Adak, GK, S.M. Meakins, H. Yip, B.A. Lopman & S.J. O'Brien 2015. Disease risks from foods, England and Wales, 1996- 2000. Emerg Infect Dis. 11:365-372
21. Sarwari, A.R., L. S. Magder, P. Levine, A.M. McNamara, S. Kowner, G.L. Armstrong, R. Etzel, J. Hollingsworth & J.G. Morris, Jr. 2001. Serotype distribution of Salmonella isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. J. Infect. Dis. 183:1295-1299
22. Magrama. Programa nacional de vigilancia y control de determinado serotipos de *Salmonella* en pollos de carne de la especie *Gallus gallus*. México. 2014.
23. Lundbeck, H., 1995 Prevention of Salmonella infections in the chicken industry (Mimeo) VI Latin American Congress of Microbiology, Caracas.
24. Magrama. 2013. Caracterización carne de ave. Madrid, España.
25. Loretz, M., Stephan, R., and Zweifel, C. (2010) Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. Food control, 21 791-804.
26. Pérez Arnedo I. Calidad y seguridad microbiológica de la carne de pollo: con especial referencia a la incidencia de Salmonella, Campylobacter y Listeria Monocytogenes en las distintas etapas de la producción y procesado. Universidad de la Rioja, España. 2015