



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADEMICA DE QUÍMICA**

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**PREVALENCIA, RELACIÓN FILOGENÉTICA Y SOBREVIVENCIA DE CEPAS
DE *SALMONELLA* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS
AMBIENTALES EN EL ESTADO DE HIDALGO.**

**TÉSIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

IBQ. EDUARDO JAHIR GUTIÉRREZ ALCÁNTARA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER CASTRO ROSAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
Dean

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Comité Revisor asignado al alumno **Ing. Eduardo Jahir Gutiérrez Alcántara**, del “Doctorado en Ciencias Ambientales”, con número de cuenta **263646**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **“Prevalencia, relación filogenética y sobrevivencia de cepas de Salmonella resistentes a antibióticos en muestras ambientales en el Estado de Hidalgo”**, después de revisar el trabajo antes referido, ha decidido autorizar la impresión del mismo hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE	Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
SECRETARIO	Dra. Alma Delia Román Gutiérrez
VOCAL	Dr. Javier Castro Rosas
SUPLENTE	Dr. Luis Guillermo González Olivares

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”
 Mineral de la Reforma, Hgo. 20 de Noviembre del 2015.




Dr. Orlando Avila Pozos
 Director del ICBI

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Dedicatoria

A Dios por todas sus bendiciones

Agradecimientos

Agradezco primeramente a ese ser que nos da todo, a ese amigo que siempre está conmigo, que me ha dado la existencia y fortaleza para salir adelante.

Gracias Dios.

A mi familia y amigos gracias por su apoyo.

A mis familiares que se me han adelantado, algún día nos volveremos a ver.

A mi director de tesis y comité tutorial gracias por saber guiarme. Bendiciones

Resumen

La presencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos es un problema importante en todo el mundo. En el estado de Hidalgo, no existen estudios disponibles sobre la presencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos en alimentos y en el medio ambiente. Se determinó la presencia de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos en 905 muestras de alimentos y materiales ambientales recolectados en la ciudad de Pachuca y en el valle del mezquital. Se emplearon procedimientos estandarizados para el muestreo, análisis e identificación de *Salmonella*, así como para la determinación del perfil de resistencia a antibióticos. Se comparó además el comportamiento de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos contra no resistentes en cilantro, zanahoria, aguas negras y suelo. Finalmente, se determinó la relación filogenética de las cepas de *Salmonella* aisladas mediante electroforesis en gel de campos pulsados. Se aislaron cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos con una frecuencia variada en todas las muestras analizadas; el mayor porcentaje de positividad se registró en la carne cruda de res y pollo. No se observó diferencia significativa entre el comportamiento de las cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos y las no resistentes en los materiales analizados. Los perfiles filogenéticos de las cepas de *Salmonella* así como de los de resistencia a antibióticos sugieren fuertemente que la fuente de contaminación con *Salmonella* resistente a antibióticos de la mayoría de las muestras analizadas (alimentos y suelo de cultivo) son las aguas negras del Valle del mezquital. Finalmente, se encontró que extractos de cálices de Jamaica ejercen un efecto antimicrobiano sobre las cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos por lo que pueden ser una alternativa para su control.

Índice de contenido

Resumen.....	4
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	10
1. Introducción	14
2. Antecedentes	17
2.1. Generalidades de <i>Salmonella</i>.....	18
2.1.1. Características ecológicas	19
2.1.2. Factores de sobrevivencia.....	20
2.2. Diseminación clonal	22
2.3. Casos de salmonelosis en México	22
2.4. Inocuidad alimentaria.....	23
2.5. Mecanismos de contaminación.....	24
2.5.1. Los manipuladores de alimentos (contaminación directa).....	25
2.5.2. Suelo y aire (contaminación directa)	25
2.5.3. El agua	26
2.5.4. Insectos, roedores y animales en general.....	26
2.5.5. Los propios alimentos (contaminación de origen)	27
2.5.6. Contaminación cruzada.....	27

2.6. Antibióticos	27
2.6.1. Clasificación	28
2.6.2. Antibióticos bactericidas y bacteriostáticos	29
2.6.3. Por su espectro y tipo de microorganismo sobre el que actúan	29
2.7. Mecanismos de acción de los antibióticos	29
2.8. Resistencia a antibióticos	30
2.8.1. Mecanismos de resistencia	31
2.8.2. Inactivación enzimática de los antibióticos	32
2.8.3. Impermeabilidad de la membrana o pared celular	32
2.8.4. Expulsión por mecanismos activos del antibiótico	33
2.8.5. Modificación del sitio blanco del antibiótico en la bacteria	33
2.9. Uso de antimicrobianos en animales de consumo	33
2.10. Bacterias resistentes a antibióticos presentes en alimentos	34
2.11. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	35
2.11.1. Método de disco difusión	35
2.12. Aplicaciones clínicas de la tipificación microbiana	36
2.12.1. Electroforesis en gel con campo pulsante	37
2.13 Aspectos generales de la flor de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>)	38
3. Objetivo general	39
3.1. Objetivos específicos	39

4. Metodología	41
4.1. Identificación y aislamiento de <i>Salmonella</i>	41
4.1.1. Muestreo	41
4.2. Sensibilidad antibiótica	42
4.3. Realización de Dendrogramas	43
4.4. Construcción de cepas de <i>Salmonella</i> multiresistentes a antibióticos	43
4.5 Evaluación del comportamiento en suelo, agua de irrigación y cilantro	44
4.6. Campos pulsados	45
4.6.1. Etapa 1 Crecimiento bacteriano	45
4.6.2. Etapa 2 Preparación de bloques de agarosa (plugs) a partir de cultivos en agar.	46
4.6.3. Etapa 3 Lisis celular en plugs de agarosa.....	46
4.6.4. Etapa 4 Digestión del ADN en plugs de agarosa con la enzima.....	47
4.6.5. Etapa 5 Preparación del gel de agarosa	48
4.6.6. Etapa 6 Electroforesis.....	48
4.6.7. Etapa 7 Tinción y documentación del gel.....	49
4.7 Producción del extracto de jamaica	49
4.7.1 Preparación del inóculo y perfiles de resistencia de los extractos de jamaica	50
4.8 Análisis estadístico	51
5. Resultados y discusión	52

5.1. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en las muestras de zanahorias	52
5.1.1. Sensibilidad antibiótica	53
5.1.2. Dendrogramas construido de acuerdo al perfil de resistencia	58
5.2. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en muestras de cilantro y nopales.....	60
5.2.1. Sensibilidad antibiótica	61
5.2.2. Dendrogramas construido de acuerdo al perfil de resistencia	63
5.3. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en muestras de carne molida de res y pollo	65
5.3.1. Sensibilidad antibiótica	66
5.3.2. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia.....	70
5.4. Prevalencia de <i>Salmonella</i> en muestras de suelo y aguas negras	72
5.4.1. Sensibilidad antibiótica	73
5.4.2. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia.....	75
5.5. Construcción de cepas de <i>Salmonella</i> ATCC multiresistentes a 6 y 11 antibióticos.	80
5.6. Evaluación del comportamiento de cepas de <i>Salmonella</i> en suelos con humedades de 80%, 50% y 0%, aguas de irrigación y cilantro.....	84
5.7. Relación filogenética mediante electroforesis en gel de campo pulsado.....	90
5.7.1. Estandarización	90
5.7.2. Análisis de muestras.....	91
5.8 Perfiles de resistencia de los extractos de Jamaica frente a las cepas de <i>Salmonella</i> multiresistentes aisladas de zanahorias	96

6. Conclusiones	98
7. Recomendaciones	100
8. Bibliografía	102

Índice de figuras

Figura 1. Zonas de muestreo	41
Figura 2. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia de las cepas aisladas de zanahorias provenientes de mercados de Pachuca.....	58
Figura 3. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia de las cepas aisladas de zanahorias provenientes de mercados de Tlahuelilpan.	60
Figura 4. Dendrograma construido con cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de nopales.	64
Figura 5. Dendrograma construido con cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de cilantro	64
Figura 6. Dendrograma construido con las cepas aisladas de carnes de res y pollo provenientes de mercados de Pachuca.	71
Figura 7. Dendrograma construido con cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de aguas negras.	76
Figura 8. Dendrograma construido con cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de suelos.	77
Figura 9. Dendrograma general construido con cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de todas las muestras.	78
Figura 10. Secciones más representativas del dendrograma construido	79
Figura 11. Resistencia cruzada en la mutación inducida a <i>Salmonella</i>	80
Figura 12. Mutación inducida a <i>Salmonella</i>	81
Figura 13. Mecanismo de resistencia de kanamicina.....	82
Figura 14. Pruebas bioquímicas y serología de <i>Salmonella</i>	83
Figura 15. Comportamiento en suelo con humedad de 80%.	85

Figura 16. Comportamiento en suelo con humedad de 50%.	85
Figura 17. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en agua de irrigación.....	86
Figura 18. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en cilantro.....	87
Figura 19. Comportamiento de <i>Salmonella</i> en suelo seco	88
Figura 20. Análisis de varianza	88
Figura 21. Análisis de varianza	89
Figura 22. PFGE con <i>Salmonella</i> entérica, subespecie enterica serovariedad Braenderup ATCC BAA-664.....	90
Figura 23. Dendrograma construido de acuerdo a patrones de PFGE.	91

Índice de tablas

Tabla 1. Supervivencia de <i>Salmonella</i> en diferentes materiales	21
Tabla 2. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas en mercados de Pachuca y Tlahuelipan frente a 16 antibióticos empleados.	53
Tabla 3. Número de cepas resistentes, sensibilidad intermedia y sensibles.	54
Tabla 4. Tipificación y combinación de los antibióticos empleados en las cepas aisladas provenientes de mercados de Pachuca.	57
Tabla 5. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de cilantros y nopales frente a los 16 antibióticos empleados.....	62
Tabla 6. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de carne de res y pollo a los 16 antibióticos empleados.	66
Tabla 7. Combinación de los antibióticos empleados en las cepas aisladas de carnes.	68
Tabla 8. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de suelos y aguas negras frente a los 16 antibióticos empleados.	74
Tabla 9 Diámetros de halos de inhibición de extractos de cáliz de jamaica con cuatro solventes frente a cepas de <i>Salmonella</i> multiresistentes a antibióticos	96

1. Introducción

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema mundial. En un reporte publicado en meses recientes por la Organización Mundial de la Salud, se expresa la preocupación por el avance de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, con las fatales consecuencias que están teniendo en la humanidad, y con las más que se podrían presentar al llegar a generarse bacterias resistentes a todos los antibióticos conocidos y no contar con alternativas para su control.

El problema de la resistencia de las bacterias a los antibióticos radica no sólo en el hecho de la adquisición de resistencia, sino también por que con frecuencia estas bacterias se vuelven más virulentas y peligrosas para la población, con respecto a las bacterias no resistente. Además de que existen evidencias científicas que sugieren que estas bacterias resistentes podrían adquirir resistencia cruzada contra factores como el pH, elevada temperatura, desecación, entre otro, lo que les permitiría por un lado tener una muy baja dosis infectante y por el otro, sobrevivir y persistir por más tiempo en el medio ambiente en comparación con las bacterias no resistente a antibióticos.

Las bacterias resistentes a antibióticos pueden llegar a los alimentos a partir de diferentes fuentes mediante distintos mecanismos de contaminación. No obstante, se reconoce que las principales fuentes de contaminación son la materia fecal de animales infectados y las aguas negras contaminadas con materia fecal.

A pesar de estar prohibido el uso de materia fecal no tratada como fertilizante de cultivos agrícolas y la irrigación de los cultivos con aguas negras o residuales no

tratadas, con frecuencia en México éstas malas prácticas son realizadas por los agricultores y campesinos.

El estado de Hidalgo cuenta con el sistema de riego con aguas residuales más grande del mundo conocido como el Valle del Mezquital, una zona agrícola donde se utilizan las aguas negras no tratadas de la ciudad de México para riego desde el año 1912 y el estiércol de ganado es utilizado como fertilizante orgánico. Estas prácticas incrementa el riesgo de contaminación de los cultivos y de los alimentos con bacterias patógenas, como *Salmonella*, resistentes a antibióticos.

Se reconoce el papel de los alimentos como vehículo de microorganismo patógenos, *Salmonella* por ejemplo. Diferentes serotipos de *Salmonella* se han aislado en México a partir de distintos alimentos tanto cárnicos, lácteos, frutas, hortalizas y alimentos preparados. Y de hecho, las infecciones provocadas por *Salmonella* spp. y *S. Typhi* son endémicas en México; en el periodo de 2012 and 2014, un total of 298,162 casos de salmonelosis y 158,141 casos de fiebre tifoidea fueron reportados en nuestro país.

A pesar de ser México un país endémico de salmonelosis y de que *Salmonella* se aísla con frecuencia de los alimentos y el medio ambiente en nuestro país, poco se sabe sobre la presencia y diseminación de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos en el medio ambiente y alimentos, así como de las fuentes de contaminación de las cepas resistentes a antibióticos.

El conocer la prevalencia y diseminación de las cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos en el ambiente y los perfiles de resistencia a los antibióticos, así como las fuentes y mecanismos de contaminación de los alimentos con estas cepas resistentes, contribuiría al diseño de medidas racionales y eficaces para prevenir los

daños provocados por estas cepas resistentes así como para el control de este tipo de patógenos tanto en el medio ambiente como en los alimentos. Podría servir además como apoyo al sector salud en la elección de antibióticos adecuados para el tratamiento de la salmonelosis provocada por cepas resistentes a antibióticos.

Adicionalmente, es necesario contar con alternativas de antimicrobianos que puedan utilizarse, no solo como sustitutos o apoyo de los antibióticos para administrarse al humano o animales de abasto, si no también, para su uso en alimentos como desinfectantes o aditivos para el control de las cepas resistentes a antibióticos. Ante esto, los antimicrobianos de origen vegetal surgen como una alternativa viable. Recientemente, se ha encontrado que los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) ejercen un efecto antimicrobiano sobre diferentes microorganismos patógenos, no obstante, no se ha investigado su efecto sobre cepas de microorganismos resistentes a antibióticos. Los antimicrobianos de los cálices de Jamaica podrían ser una alternativa de antimicrobianos para el control de *Salmonella* resistente a antibióticos.

Por tal motivo, en el presente estudio se determinó la prevalencia y relación filogenética de cepas de *Salmonella* resistencia antibióticos en el medio ambiente y alimentos de la ciudad de Pachuca y el valle del Mezquital, también el comportamiento de cepas de *Salmonella* resistentes y no resistentes a antibióticos en alimentos y muestras ambientales, y se investigó el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de Jamaica sobre cepas de *Salmonella* resistentes antibióticos.

2. Antecedentes

En la etiología bacteriana, se incluye una amplia variedad de microorganismos productores de diarrea, y como parte de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentran diferentes géneros con dicha capacidad (Molina y col., 2010). Tal es el caso de *Salmonella* agente causal de diferentes infecciones intestinales conocidas como salmonelosis, su hábitat natural es el intestino del hombre y de los animales, además de encontrarse también en medios contaminados con excremento humano y de animales (Huss, 1999). En los últimos años se han clasificado más de 2,500 serovares de *Salmonella* que pueden ser móviles o inmóviles, solo 200 han sido asociados con enfermedad humana y se considera que el género está integrado por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*.

Desde el punto de vista epidemiológico, el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y muchos otros autores coinciden en que el género *Salmonella* se le puede agrupar en tres grupos: (Malbrán, 2001).

- a) Los que infectan solamente a personas, incluye: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* y *Salmonella paratyphi C*. Este grupo incluye a los agentes de la fiebre tifoidea y paratifoidea que son las más graves de las enfermedades producidas por *Salmonella*
- b) Los que pueden adquirirse al consumir alimentos, incluye: *S. gallinarum* (aves), *S. dublin* (bovinos), *S. abortus-equi* (equinos), *S. abortus-ovis* (ovinos) y *S. cholerae-suis* (cerdos)

- c) Serovares inadaptados (sin preferencia de hospederos). Patógenos para humanos y otras especies animales, e incluyen a la mayoría de los serovares transmitidos por alimentos.

Salmonella una vez dentro del huésped inician el proceso biológico infeccioso del cual se conocen tres formas clínicas de salmonelosis en el ser humano: (Caballero, 2008).

- Gastroenteritis, causada por *S. typhimurium* y *S. enteritidis*
- Fiebre entérica, transmitida por *S. typhi* y *S. paratyphi*
- Enfermedad invasiva sistémica, ocasionada por *S. choleraesuis*

2.1. Generalidades de *Salmonella*

El género *Salmonella* fue creado en 1900 por Lignieres y se le denominó así en honor del Dr. D.E. Salmon, bacteriólogo norteamericano codescubridor y que describió por primera vez la *Salmonella* entérica (anteriormente conocida como cholerae-suis). *La Salmonella* es un género bacteriano que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por gérmenes de forma bacilar, no esporulados, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque existen mutantes inmóviles. Son organismos Gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas, no fermentan la lactosa, reducen nitratos a nitritos, son citocromo-oxidasa negativo, la mayoría de las especies producen sulfuro de hidrógeno, forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas. Pueden desarrollarse en un amplio abanico de temperaturas que oscilan entre los 7°C y los

48°C. Presentan un pH de crecimiento óptimo entre 4 y 8 y se desarrollan en ambientes con una actividad de agua del orden de 0.93 (Pascual y Calderón, 2000).

Como bacteria Gram negativa su pared se encuentra constituida por una cubierta externa, que recibe el nombre de membrana externa de la pared, formada por una bicapa de fosfolípidos, proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos (LPS), el que a su vez está formado por el antígeno O de la naturaleza polisacárido, específico de especie altamente variable, presenta además, una porción central o antígeno común y el lípido A, constituye esta última porción la parte tóxica de lipopolisacárido o endotoxina. La segunda capa de la pared se encuentra constituida de peptidoglicano o mureina, unida a la membrana externa a través de estructuras conocidas como lipoproteína, encontrándose entre ambas capas el espacio periplásmico. Sobre la superficie de la pared celular se encuentra el antígeno Vi o K, estructura capsular localizada en *S. entérica* ser. *Typhi*, *S. entérica* ser. *Paratyphi* C y *S. entérica* ser. *Dublin*. El tercer antígeno de importancia en el género *Salmonella* lo constituye el antígeno H o flagelar (Molina y col., 2010).

2.1.1. Características ecológicas

Salmonella se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente conocida como agente zoonótico. La distribución ubicua de *Salmonella* en el ambiente, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su adaptabilidad fisiológica para cambiar según el ambiente, su resistencia a las condiciones adversas, su virulencia, la impredecible patogenicidad de sus cepas invasivas, la prevalencia de los serotipos resistentes a antibióticos, el continuo incremento global

de los casos de salmonelosis humana y su impacto económico en la industria alimentaria, hacen necesaria la continua vigilancia y control a todos los niveles, de la producción de alimentos.

Salmonella vive en el tracto intestinal de los animales infectados, incluido el hombre y se excreta a través de las heces, pudiendo permanecer viable en el material fecal durante años fuera del huésped y transmitirse a los humanos a través del contacto de las manos con los animales o con todo aquello que haya sido contaminado por las heces, ya sea la paja de los lechos de los animales, la comida, las patas, el suelo e incluso la piel. La comida, los piensos y el agua son vehículos primarios

2.1.2. Factores de sobrevivencia

La frecuencia de aislamiento y sobrevivencia de *Salmonella* en el medio ambiente y otros sustratos está determinada por factores ecológicos como la temperatura, actividad de agua, pH, potencial de óxido-reducción, exposición a agentes germicidas, la composición del material en que se encuentra y la humedad ambiental. El tiempo de sobrevivencia del microorganismo varía de días hasta meses, los tiempos más prolongados se observan en polvo, pasturas y ropa.

Es importante resaltar que el grado de sobrevivencia en heces depende de la especie animal (Torres Vitela y col., 2013).

Tabla 1. Sobrevivencia de *Salmonella* en diferentes materiales

Material	Sobrevivencia
Suelo	200 días
87 Ropa	228 días
Fundas de plástico	93 días
Polvo	300 días
Materia fecal de roedores	148 días
Materia fecal de bovinos	Más de 1000 días
Cascaron de huevo	De 31 a 350 días
Agua de la llave	87 días
Agua de pozo	115 días

Fuente: Fernández Escartín, 2000.

Cuando el germen enfrenta condiciones de estrés fisiológico por efecto del calor, congelación, desecación, acidez, sustancias microbianas, escases de nutrientes y otros agentes, responden sintetizando nuevas proteínas que concentra fuera de la membrana (Fernández Escartin, 2000).

2.2. Diseminación clonal

El término de clonación se utiliza en dos sentidos: en uno de ellos literalmente se refiere al acto de producir muchas copias idénticas de una molécula de DNA. Sin embargo también se utiliza para describir la separación de un fragmento concreto de DNA (a menudo un gen en particular) del resto del DNA de la célula debido a que su aislamiento se ve facilitado por etapas en las que se generan muchas copias idénticas del DNA de interés (Alberts y Dennis, 2006). En otras palabras, todas las células bacterianas que presentan características genotípicas y fenotípicas idénticas son consideradas como clona (Forbes y col., 2009). La diseminación en el ambiente de estas células se debe a la replicación del cromosoma, y se realiza mediante mecanismos y fuentes de contaminación, descritos más adelante.

2.3. Casos de salmonelosis en México

En México *Salmonella* spp. y *S. Typhi* son endémicas, durante el periodo de 2009 a 2014 se presentaron 677, 317 casos de salmonelosis y 328,180 casos de fiebre tifoidea (Secretaría de Salud 2015). A continuación se mencionan algunos brotes ocasionados por este microorganismo. A principios de 1972 se inició en México una epidemia de fiebre tifoidea en el Estado de Hidalgo y el Distrito Federal, producida por *Salmonella typhi*, la cual presentaba resistencia múltiple a cloranfenicol, tetraciclinas y estreptomycinas. Para el año 1989 se registraron 72 754 casos de salmonelosis y 10 939 casos de fiebre tifoidea (Parrilla y col., 1993). Durante 1998 también en México se presentó un brote de infección gastrointestinal en 155 trabajadores de un hospital. Se estudió a todo el personal que presentó síntomas y

aquellos asintomáticos que ingirieron alimentos durante el mismo periodo y en el mismo lugar, llegando a la conclusión que este brote se presentó por consumir tortas preparadas con huevo, papa y carne con insuficiente cocción (Chávez y col., 2001). En el año 2012 se presentó en Acapulco una intoxicación de 355 personas, en su mayoría niños por el consumo barbacoa y pastel con motivo del festejo del día del niño (CNN México 2012). Uno de los brotes reportados recientemente sucedió en el estado de Michoacán afectando a 150 personas (Vázquez y col. 2014), debido al consumo de caldo de camarón y agua de melón. En el Estado de Hidalgo los brotes de salmonelosis reportados sucedieron en el año 2011, donde 46 personas resultaron intoxicadas y una persona falleció por el consumo de carne de res ahumada contaminada (El universal, 2011), y en el 2012 se intoxicaron 193 personas por el consumo de crema pastelera (El independiente, 2012).

2.4. Inocuidad alimentaria

Cuando se habla de inocuidad de los alimentos se hace referencia a todos los riesgos, sean crónicos o agudos, que pueden hacer que los alimentos sean nocivos para la salud del consumidor. El concepto de calidad abarca todos los demás atributos que influyen en el valor de un producto para el consumidor. Engloba, por lo tanto, atributos negativos, como estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables, pero también atributos positivos, como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos. Esta distinción entre inocuidad y calidad tiene repercusiones en las políticas públicas e influye en la naturaleza y contenido del sistema de control de los alimentos más

indicado para alcanzar objetivos nacionales predeterminados (FAO 2015). La inocuidad alimentaria es la condición de los alimentos que garantiza que no causaran daño al consumidor cuando se preparen y /o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan, implica a los agentes físicos, químicos o microbiológicos que pudieran contaminar los productos agroalimentarios, es decir, esos microorganismos que no se ven pero hacen daño (IAOM, 2015). La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, las organolépticas, y las comerciales componen la calidad de los alimentos. El interés por la seguridad en los alimentos se ha incrementado en la mayoría de los países.

2.5. Mecanismos de contaminación

Los alimentos están expuestos a la contaminación a lo largo del proceso de elaboración o incluso antes. Desde la obtención de las materias primas hasta su consumo puede darse en cualquiera de los múltiples procesos de la cadena alimentaria, siendo los momentos más críticos su manipulación, preparación y conservación (García y col., 2009).

Los factores más frecuentes de contaminación alimentaria son:

- La conservación de alimentos a temperatura ambiente.
- Refrigerar de forma insuficiente.
- La cocción insuficiente.
- Locales, maquinaria y utensilios en malas condiciones higiénicas.
- La manipulación de un producto de forma incorrecta.

- Preparar grandes cantidades de comida a la vez, pues es más difícil de controlar, sobre todo el factor ambiente.
- Elaborar alimentos con mucho tiempo de antelación.
- Romper la cadena de frío.

En la contaminación de los alimentos intervienen los agentes transmisores de las infecciones a los alimentos en buen estado, que reciben el nombre de “vehículos de transmisión” o “mecanismos de transmisión”; son los siguientes.

2.5.1. Los manipuladores de alimentos (contaminación directa)

A través de las personas que manipulan los alimentos, cuando lo hacen de manera inadecuada o poca higiene, pueden transmitir bacterias patógenas directamente a éstos bien al hablar, toser o estornudar, ya que al realizar estas acciones eliminamos saliva y otras secreciones cargadas de estas bacterias; o bien, y sobre todo, a través de las manos, en especial de las uñas, ya que están en contacto constante y directo con otras partes del cuerpo y objetos contaminados. Los portadores de gérmenes son aquellas personas que los albergan y los eliminan, porque se encuentran enfermos y permanecen trabajando, lo cual es una negligencia; o por estar convalecientes con alguna enfermedad, de modo que mantienen restos de gérmenes en su cuerpo incluso aunque estén curados; o personas sanas que son portadoras de enfermedades (García y col., 2009).

2.5.2. Suelo y aire (contaminación directa)

La llegada de los microorganismos patógenos a los alimentos se puede producir por diferentes vías. Por ejemplo, el suelo está cargado de un gran número de

microorganismos y parásitos. Estos pueden acceder a las plantas, o ser arrastrados por las aguas. Además, el aire puede levantar corrientes de polvo que transporten a los microorganismos a los diferentes alimentos. El aire también está implicado en la transmisión de microorganismos y de esporas. Esta vía de transmisión tiene gran importancia desde el punto de vista higiénico y económico.

2.5.3. El agua

Las aguas naturales no sólo contienen su propia microbiota, si no que pueden transportar organismos procedentes de suelos, de aguas residuales o de animales y vegetales (Ángel Gil, 2010). Las aguas residuales domésticas son utilizadas en muchos casos para el riego de los cultivos, llevando millones de microorganismos patógenos a los productos. Si el agua se encuentra contaminada, traslada la contaminación tanto a los alimentos como a los utensilios que entran en contacto con ella, al ser cocinados o lavados. Se evita siempre utilizando agua potable.

2.5.4. Insectos, roedores y animales en general

Transportan con ellos en sus pelos, patas e intestinos bacterias patógenas que pueden pasar a los alimentos. Especialmente insectos voladores como las moscas, que se cargan de gérmenes al posarse sobre la basura y desperdicios, pasándolos de un lado a otro con suma rapidez en sus desplazamientos, y contaminando diversos alimentos en lugares diferentes

2.5.5. Los propios alimentos (contaminación de origen)

Muchos alimentos son susceptibles de contener pequeñas cargas de gérmenes y sustancias químicas: frutas, verdura y hortalizas que han sido regadas con aguas fecales, abonos orgánicos o cuando se hace un mal uso de los tratamientos fitosanitarios; pescados y carnes que albergan bacterias vivas que viven en los intestinos de los animales, y que pueden pasar fácilmente a su carne durante el sacrificio, desarrollándose rápidamente. Por ello, habrá que lavar bien los vegetales y conservar en frío lo más rápido posible los pescados y las carnes con el fin de evitar que esas pequeñas cantidades de gérmenes se desarrollen (García y col., 2009).

2.5.6. Contaminación cruzada

La contaminación cruzada es la transferencia de virus, bacterias y otras sustancias dañinas que se produce cuando se manejan alimentos crudos y cocidos sin la debida separación ni diferenciación de utensilios. Es uno de los factores más descuidados y difíciles de corregir en los manipuladores de alimentos, es un problema de actitud y de concienciación del manipulador (Armendáriz, 2010). Esta es una de las causas frecuentes de que la Salmonella pueda ser transferida al humano.

2.6. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Mediante modificaciones de la estructura

química de un agente obtenido naturalmente, es posible producir agentes semisintéticos, estos impiden la reproducción y matan a las bacterias, sin ser ofensivos para el ser humano (FAO, 2004). La mayor parte de los antibióticos son producidos por microorganismos, sobre todo por bacterias del género *Streptomyces* y ciertos hongos (Koolman y Röhm, 2004).

2.6.1. Clasificación

Los antibióticos se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, pero uno de los más utilizados es su mecanismo de acción, según el cual podemos clasificarlos en los siguientes grupos:

- Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana: la pared bacteriana es una estructura rígida que permite a las bacterias soportar la presión osmótica que se desarrolla en su interior sin que se produzcan la lisis de las mismas. La desaparición de esta pared conduce al estallido de la bacteria. Pertenecen a este grupo: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, quinolonas y fosfomicina, entre otros.
- Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias: como consecuencia estas ni crecen ni se reproducen. Entre ellos se encuentran el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos.
- Antibióticos que dan lugar a la formación de proteínas que no son útiles para el germen. A este grupo pertenecen los aminoglucósidos, quinolonas y otros.

2.6.2. Antibióticos bactericidas y bacteriostáticos

Los antibióticos bactericidas o bacteriolíticos destruyen a los gérmenes sensibles.

Los bacteriostáticos no destruyen a los gérmenes, si no que impiden su crecimiento y multiplicación, pero si se incrementa la concentración pueden comportarse como bactericidas (De Ahumada y col, 2002).

2.6.3. Por su espectro y tipo de microorganismo sobre el que actúan

Amplio espectro: se refiere a un antibiótico que actúa contra una amplia gama de bacterias patógenas, actúa contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram negativas.

Reducido: antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies (Forrest y col., 1998; Cancho y col., 2000; Mendoza, 2011).

2.7. Mecanismos de acción de los antibióticos

Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son consideradas:

- Pared bacteriana
- Membrana bacteriana
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos

Las drogas que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, elementos esenciales de la constitución de la pared. Los defectos de la pared celular llevan a la lisis bacteriana. Los agentes activos en la membrana celular bacteriana son las polimixinas (polimixina B y colistín). Estas drogas son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que disrumpen la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas. Interfiriendo con la síntesis de proteínas, a diversos niveles del organoide encargado de su elaboración, el ribosoma, actúa un cúmulo de agentes, a saber: Aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol y sucedáneos, lincosamidas y macrólidos. Dada la complejidad de este proceso, hay diversos blancos que son impactados por los diferentes agentes antiinfecciosos. Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos tenemos a las sulfamidas y trimetopin cuya acción como antimetabolitos impidiendo la síntesis de purinas los distingue del resto (FAO, 2004)

2.8. Resistencia a antibióticos

La resistencia antibiótica es la capacidad de un organismo para resistir los efectos de un antibiótico al que originalmente era vulnerable e impacta fuertemente a la población, a los hospitales y a los servicios de salud del país. El uso inapropiado de medicamentos antimicrobianos acelera ese fenómeno natural. Las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2013).

El problema de la resistencia bacteriana tiene repercusiones personales, pero en realidad es grave problema de salud pública, pues traspasa problemas locales, regionales e internacionales a través del intenso intercambio de personas y mercancías. La resistencia antimicrobiana en países como México, resulta tan apremiante como otras enfermedades prioritarias tales como la malaria, la tuberculosis, el cáncer o el SIDA (INSP, 2013).

2.8.1. Mecanismos de resistencia

Así como el primer mecanismo de acción de un agente infeccioso conocido fue el de las sulfamidas, el primer mecanismo de resistencia conocido también fue el de los microorganismos a estas drogas. Por consiguiente los mecanismos de resistencia a los antibióticos siempre han formado parte de la evolución de las bacterias como un medio de supervivencia entre competidores productores de antibióticos. Sin embargo, con la introducción de los antibióticos en la práctica médica, las bacterias de importancia clínica tuvieron que adoptar mecanismos de resistencia como parte de su estrategia de supervivencia (Forbes y col., 2008). Si bien son varios los mecanismos de resistencia a las sulfas que actualmente se conocen, podemos decir que la hiperproducción de PABA fue el primero en determinarse, siendo el más conocido. Además de la hiperproducción metabólica, otros mecanismos incluyen:

2.8.2. Inactivación enzimática de los antibióticos

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad. Las enzimas beta lactamasas son las involucradas en este mecanismo. En este caso la enzima, elaborada por la bacteria, inactiva a la molécula de la droga volviéndola incapaz de actuar, son capaces de hidrolizar el anillo beta-lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. Hay que tener presente que este mecanismo es el único capaz de inactivar a la molécula de antimicrobiano. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Livermore, 1991).

2.8.3. Impermeabilidad de la membrana o pared celular

Las bacterias pueden generar cambios de la capa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente por las modificaciones en las porinas, lo que repercutirá en resistencias de bajo nivel a diversos antimicrobianos. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila y Sánchez, 2007).

2.8.4. Expulsión por mecanismos activos del antibiótico

En este mecanismo las bombas de expulsión operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que lleguen a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por bacterias gram negativas (Vila y Sánchez, 2007). Las resistencias a las tetraciclinas pueden ser debidas a este tipo de mecanismos.

2.8.5. Modificación del sitio blanco del antibiótico en la bacteria

En algunos casos hay una reducción de la afinidad del receptor por la molécula de antimicrobiano. Una mutación de la girasa de ADN, por ejemplo, puede dar lugar a una menor afinidad de las quinolonas por la citada enzima. Otro ejemplo es el cambio de las enzimas involucradas en la síntesis de ácido paraaminobenzoico, lo que da lugar a resistencias a sulfas y trimetoprima, mecanismo que se suma al mencionado en primer lugar (FAO. 2004).

2.9. Uso de antimicrobianos en animales de consumo

La utilización de antimicrobianos y antiinfecciosos en medicina veterinaria tiene tanta antigüedad como su uso médico. Además de su uso como agentes antiinfecciosos terapéuticos, se los ha usado como promotores del crecimiento, dado que a concentraciones subterapéuticas, por mecanismos no muy bien esclarecidos, son capaces de aumentar la conversión de alimento (un tema particularmente discutido actualmente, que se trata por separado en este trabajo). Hay además un grupo importante de agentes que se utilizan como anticoccidiales,

pero que tienen actividad antibacteriana, entre los que encontramos ionóforos como la monensina, lasalocid y salinomycin, quinoxalinas, avilamicina, etc. Hay una serie de productos antibacterianos, en general conocidos como desinfectantes y antisépticos, que también comparten responsabilidad en el desarrollo de resistencias, especialmente por compartir algunos de los mecanismos de bombeo desde el soma bacteriano, desarrollados por algunas bacterias, con otros antibióticos. Incluso algunos metales, como el zinc y cobre que se suelen adicionar a alimentos animales, pueden seleccionar bacterias por su capacidad de bombeo hacia el exterior de diversos agentes (FAO, 2004)

2.10. Bacterias resistentes a antibióticos presentes en alimentos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. Algunos de los antibióticos usados como promotores del crecimiento y como medicamentos han planteado riesgos (indirectos) para la salud humana. La ingesta de alimentos con residuos de antibióticos pueden conducir a un aumento de la resistencia a las bacterias; esto principalmente puede implicar: a) transferencia al hombre de las bacterias resistentes a antibióticos, vía ingesta de alimentos, y b) transferencia de factores de resistencia (factor-R) a partir de bacterias resistentes no patógenas a otra bacteria, lo cual conduce a difundir la resistencia. El uso de antibióticos en veterinaria y agricultura puede contribuir a una presión selectiva sobre los microorganismos, a reservorios de resistencias, y a vías de transmisión (Cameán y Repetto, 2012). Las víctimas de una infección causada por un germen resistente a los antibióticos

probablemente requieran hospitalización y la aplicación de drogas más caras y tóxicas, con lo que se incrementan los gastos de atención a la salud, actualmente es un problema de salud pública. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos antimicrobianos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. El problema creciente de las infecciones humanas que son difíciles de tratar por la resistencia a los antimicrobianos tiene sus raíces en el uso de los antimicrobianos tanto en la medicina humana, como en la producción pecuaria (INFOSAN, 2005).

2.11. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Los métodos de determinación de susceptibilidad antimicrobiana han sido una inquietud desde el inicio de la era antibiótica. Las pruebas de susceptibilidad están indicadas para todo microorganismo que sea capaz de contribuir a un proceso infeccioso que requiera quimioterapia, probando que su susceptibilidad no puede predecirse del conocimiento de su identidad. La mayoría de los laboratorios clínicos de Estados Unidos utilizan una prueba de difusión en disco para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos bacterianos (Murali, 2002). Dicha prueba es la más difundida por su simplicidad y economía.

2.11.1. Método de disco difusión

El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la

determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos. La prueba de Bauer-Kirby, ha sido aceptada como la técnica estándar para la realización de las pruebas de sensibilidad por difusión con discos, y en la mayoría de los casos brinda información útil. Estos discos son preparados comercialmente en forma totalmente estandarizada con las concentraciones de principio activo necesarias. Los discos son colocados sobre la superficie de agar de una placa de Petri, que ha sido previamente inoculada con una cantidad estandarizada del germen cuya susceptibilidad se desea medir (es una cantidad que oscila aproximadamente en las 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro de inóculo). Una vez completado este proceso, la placa se coloca en estufa de cultivo y comienza, por un lado, el crecimiento de la bacteria y, por el otro, la difusión del antibiótico desde el disco de papel (FAO, 2004). El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo. Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente. (G. Malbrán, 2001)

2.12. Aplicaciones clínicas de la tipificación microbiana

Las comparaciones genéticas de microorganismos se han usado para investigar brotes o epidemias en hospitales, ciudades o incluso países. Es común que para investigar brotes hospitalarios se empleen métodos de tipificación genética. Se sospecha una posibilidad de brote cuando la frecuencia de aislamiento de un microorganismo patógeno excede la proporción usual de recuperación basal. Los

métodos de tipificación molecular también se usan para investigar infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos (Koneman, 2008).

2.12.1. Electroforesis en gel con campo pulsante

La electroforesis en gel de campo pulsante (**PFGE**) es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad (Belkum, 1994). Es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Dicha técnica separa moléculas iónicas mediante la migración diferencial en un soporte sólido de acuerdo con el tamaño y la carga iónica de las moléculas un campo eléctrico. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Las variables principales que intervienen en esta técnica son: el voltaje del campo eléctrico, la concentración del gel de agarosa, el tiempo de los pulsos, la fuerza iónica del amortiguador y la temperatura de desarrollo (Puerta y Urueña, 2004). En general, la PFGE es una de las técnicas de tipificación más reproducibles y altamente discriminatorias en comparación con otras técnicas moleculares, ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas; emerge en los 90's como una técnica de la huella dactilar considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para muchas especies bacterianas tanto gram positivas como gram negativas.

2.13 Aspectos generales de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Desde el punto de vista morfológico, la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta arbusta semileñosa anual o bianual que pertenece a la familia Malvaceae y alcanza entre uno y tres metros de altura. Sus tallos son abundantes, muy ramificados y de corteza roja, con hojas alternas de bordes irregularmente aserrados (Ortíz-Marquéz, 2008). Se cultiva generalmente en suelos marginales de baja fertilidad y con poca retención de humedad. Su importancia social radica en que el cultivo lo atienden productores de escasos recursos que realizan la cosecha manual, lo que propicia ocupación pero origina incrementos en los costos de producción (Serrano, 2008). Se piensa que es nativa de Asia (India hasta Malasia) o África tropical y actualmente se conocen 500 especies de *Hibiscus* en el mundo. La producción a nivel mundial de este cultivo la encabeza China, seguido por la India, Sudan, Uganda, Indonesia, Malasia y en séptimo lugar México (SAGARPA-CONACyT, 2010). En los Estados de Guerrero y Oaxaca se cultiva 91 % de la superficie cosechada y se obtiene 85% de la producción nacional (SIAP, 2012). La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una especie vegetal que destaca por sus propiedades medicinales, ya que su consumo reduce el colesterol (Aquino y León, 2001; Lin et al., 2007) y la presión arterial disminuye (Herrera et al., 2004), además de tener efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas (Fullerton et al. 2011). Sin embargo no hay información disponible que revele actividad antibacteriana de extractos de jamaica contra cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos.

3. Objetivo general

Determinar la prevalencia, relación filogenética y resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* en muestras ambientales y alimentos de Pachuca y la región del Valle del Mezquital, Hidalgo.

3.1. Objetivos específicos

1. Aislar e identificar cepas de *Salmonella* de diferentes muestras ambientales (aguas negras, suelo de cultivo, vegetales y carnes), para determinar la prevalencia y diseminación de dichas cepas en la región del Valle del Mezquital y Pachuca mediante el método convencional.
2. Establecer los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* aisladas de las muestras ambientales para determinar la eficiencia de los antibióticos mediante el método de Kirby-Bauer.
3. Realizar dendrogramas de las cepas resistentes y no resistentes a los antibióticos para realizar agrupaciones de similitud mediante el software Past y seleccionar a las bacterias resistentes.
4. Construir cepas de *Salmonella* ATCC multiresistentes a 6 y 11 antibióticos, siguiendo la metodología descrita por Castro-Rosas et al. 1999 para ver la

viabilidad de estas en comparación con un grupo de cepas de *Salmonella* ATCC sensibles

5. Determinar el comportamiento de cepas de *Salmonella* ATCC resistentes y no resistentes a antibióticos bajo diferentes condiciones ambientales in vitro en suelo de uso agrícola, aguas negras y cilantro, mediante la metodología descrita por Youwen y col., 2006.

6. Determinar las relaciones genéticas (clonas) de las bacterias resistentes previamente seleccionadas, mediante la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados propuesta por PulseNet, 2013, para analizar la fuente primaria de diseminación.

7. Analizar el efecto antimicrobiano de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) sobre cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos, mediante el método de difusión en disco, para proponer como una alternativa de antimicrobiano viable en humanos, animales y alimentos.

4. Metodología

4.1. Identificación y aislamiento de *Salmonella*

4.1.1. Muestreo

Se analizaron un total de 100 muestras de zanahorias, 100 de cilantro, 65 de nopales, 186 de carne de res, 54 de pollo en la ciudad de Pachuca y 25 de cilantro, 35 zanahorias, 70 aguas negras y 70 de suelo de uso agrícola en la región del Valle del Mezquital.



Figura 1. Zonas de muestreo

Para el muestreo de zanahorias se compraron 500 g por cada muestra y se seleccionaron 5 zanahorias de igual tamaño, las de cilantro, nopales, carne de res, carne de pollo y suelo consistían de 100 g; las muestras de aguas negras consistían

de 100 ml. Todas las muestras fueron colocadas en una bolsa ziploc estéril y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para ser analizadas.

A cada muestra se le agregaron 500 ml de agua peptonada buferada y se agitó manualmente por 30 segundos, posteriormente se incubó durante 18 hr a 37°C, se procedió con el enriquecimiento utilizando los siguientes medios: base de caldo tetracionato y caldo rappaport-vassiliadis, a los cuales se les inoculó 1 y 0.1 ml de muestra (agua peptonada) incubándose 24 hr a 42°C, después de esto se tomó una asada de los caldos sospechoso y se estirió en los medios selectivos: agar XLD, sulfito bismuto y BG sulfa, incubándose a 35°C por 24 a 48 hr. Se tomaron una o dos colonias sospechosas de estos medios y fueron sembradas en tubos con LIA y TSI incubándose 24 hr a 35°C, las colonias presuntivas que resultaron de estos tubos fueron sembradas en caldo urea para descartar cepas sospechosas falsas. La prueba confirmativa se realizó con el antisuero somático polivalente O y las cepas positivas fueron tomadas del medio LIA para ser purificadas en agar cuenta estándar.

4.2. Sensibilidad antibiótica

Se determinó el perfil de resistencia a las cepas de *Salmonella* aisladas de las muestras ambientales y de alimentos, siguiendo la metodología de difusión en disco (Bauer y col. 1966) Se purificaron las cepas almacenadas en caldo de soya tripticaseína y se incubaron 24 hr a 35°C. Posteriormente se tomaron 100 µl del inóculo, se sembró y se extendió con una varilla acodada en toda la superficie del agar Muller Hilton y se colocaron los discos con 10 µl de los siguientes antibióticos:

Ampicilin 10 µg/ml, Amoxicillin/Clavulanic acid 20/10 µg/ml, Sulfisoxazole 250 µg/ml, Colistine 10 µg/ml, Streptomycin 10 µg/ml, Erythromycin 15 µg/ml, Nalidixic acid 30 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml, Neomycin 10 µg/ml, Tetracycline 30 µg/ml, Gentamicin 10 µg/ml, Chloranfhenicol 30 µg/ml, Amikacin 30 µg/ml, Trimethoprim-Sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg/ml, Ceftriaxone 30 µg/ml, Ciprofloxacin 5 µg/m., se incubaron 24 hr a 35°C. Posteriormente se midieron los halos de inhibición con un vernier digital.

4.3. Realización de Dendrogramas

Para la construcción de los dendrogramas se utilizó el software Past, empleando el índice de Jackard para realizar agrupaciones de acuerdo al porcentaje de similitud entre las cepas aisladas. Se capturaron los siguientes códigos: 1 (resistente); 0 (sensible), que corresponden al perfil de resistencia que presentaron las cepas.

4.4. Construcción de cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos

Se activaron cepas de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium ATCC 14028 en 10 ml de caldo soya tripticaseina, se incubaron 24 hr a 37°C, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 3 ml de solución salina isotónica al 0.85%, se decantó y el pellet obtenido se resuspendió con 1 ml de peptona, posterior a esto se sembró por extensión en superficie en agar método estándar con rifampicina (1ml rif/100 ml ame), para crear resistencia a este antibiótico, se incubó 24 hr a 37°C. Se volvió a

repetir el procedimiento 11 veces más con diferentes antibióticos para generar dos grupos de cepas multiresistentes (11 y 6 antibióticos). Posteriormente se realizaron diluciones para el recuento en placa y con esto conocer la concentración inicial de microorganismo.

4.5 Evaluación del comportamiento en suelo, agua de irrigación y cilantro

Se tomaron 1,600 g de suelo con una espátula estéril, el cual fue obtenido de 0-20 cm de capa superficial del suelo en la región del valle del mezquital, se depositó y transportó en una bolsa ziploc al laboratorio para su procesamiento. Posteriormente se tamizó y almacenó en un recipiente plástico a temperatura ambiente hasta necesitarlas. Posteriormente las muestras se sometieron a un peso constante en estufa, y se esterilizaron por 15 minutos. Para la optimización de humedades de 80% y 50% se agregó agua destilada estéril a cada muestra dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente la muestra se seccionó y se pesaron 5 g de suelo, se colocaron en bolsas plásticas estériles e inmediatamente se inocularon 50 µl de concentración bacteriana, las cuales fueron selladas e incubadas a temperatura ambiente. Todo esto se realizó para los 3 grupos de cepas (sensible, resistente a 6 y 11 antibióticos).

Se tomaron 500 ml de agua negra de canales de riego de la región del Valle del Mezquital, se transportó en bolsas ziploc al laboratorio para su procesamiento. Dichas muestra se esterilizaron en un frasco de vidrio, después de esto la muestra se seccionó y se midieron 5 ml y se colocaron el bolsas plásticas estériles e

inmediatamente se inocularon 50 μ l y se siguió la misma metodología de las muestras de suelo.

Las muestras de cilantro se lavaron con desinfectante comercial y se secaron en una campana de flujo laminar, se colocó una hoja de cilantro en una bolsa plástica estéril, después de esto se inocularon 10 μ l de concentración bacteriana las cuales fueron selladas e incubadas a temperatura ambiente. De igual manera se trabajó con los 3 grupos de cepas por triplicado. El monitoreo del comportamiento fue llevado a cabo durante 10 días, haciendo recuento en placas con diluciones hasta la 10^{-7} .

4.6. Campos pulsados

4.6.1. Etapa 1 Crecimiento bacteriano

Para la realización de esta técnica se siguió la metodología propuesta por PulseNet, 2013. Se activaron las cepas en caldo soya tripticaseina y se incubaron 24 hr a 37°C. Posteriormente las cepas fueron purificadas en agar soya tripticaseina e incubadas a las condiciones mencionadas anteriormente.

Después de 24 hr el crecimiento bacteriano fue raspado con un hisopo estéril y transferido a tubos rotulados con 2 ml de Buffer de Suspensión Celular (CSB). Se ajustaron las concentraciones de las suspensiones celulares haciendo diluciones 1:10 (100 μ l de concentración celular y 900 μ l de CSB) y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 610 nm. Los cálculos se hicieron a 200 μ l.

4.6.2. Etapa 2 Preparación de bloques de agarosa (plugs) a partir de cultivos en agar.

Se preparó una solución de proteinasa K (20 mg/ml agua estéril ultrapura) y agarosa Seakem Gold al 1% (0.25 g/25 ml TE Buffer). Se transfirieron 200 μ l de suspensión celular ajustada en tubos eppendorf, a los cuales se les agregaron 10 μ l de la solución de proteinasa K y 200 μ l de agarosa, se mezcló suavemente con micropipeta e inmediatamente se dispensaron en moldes de plugs, se dejaron solidificar 10-15 minutos a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar.

4.6.3. Etapa 3 Lisis celular en plugs de agarosa

Se calculó el volumen total de buffer de lisis y proteinasa K; 5 ml de buffer de lisis y 25 μ l de proteinasa K por muestra. Se preparó una master mix de acuerdo al número de muestras en tubo falcom, quedando una concentración de 0.1 mg/ml de proteinasa K. Posteriormente se dispensaron 5 ml de disolución en tubos falcom con dos plug de agarosa, se incubaron en baño de 54-55°C 2 hr a 175 rpm. De igual manera se incubaron agua ultrapura estéril y buffer TE en un baño estacionario a 55°C para realizar los lavados. Después de las dos horas de incubación se colocó un tamiz a los tubos para decantar la solución de lisis y se agregó de 10 a 15 ml de agua ultrapura estéril a cada tubo, se incubó 15 minutos en baño con agitación de 54-55°C. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después de estos lavados

se procedió a lavar nuevamente con buffer TE cuatro veces con las mismas condiciones. Después del último lavado se agregaron 5-10 ml de TE estéril y se almacenaron a 4°C hasta necesitarlos.

4.6.4. Etapa 4 Digestión del ADN en plugs de agarosa con la enzima

Pre-restricción: se preparó una master mix 1:10 como se indica;

Reactivo	µl/plug
Agua ultrapura estéril	180 µl
10X Buffer de restricción	20 µl
Volumen total	<hr/> 200 µl

La master mix se realizó en un tubo falcom, posteriormente se agregaron 200 µl de buffer de restricción diluido a tubos eppendorf de 1.5 ml.

Los plugs fueron removidos de los tubos con una espátula estéril y puestos en una caja Petri estéril para ser cortados a 2 mm con navaja estéril, después fueron colocados en los tubos eppendorf con buffer de restricción, se incubaron a 37°C en baño por 10 minutos. Después de la incubación se quitó el buffer con una micropipeta. Se continuó con la preparación de la master mix de la enzima de restricción de la siguiente manera;

Reactivo	µl/plug
Agua libre de endonucleasas	173
10x Buffer de restricción	20

Albumina Sérica Bovina BSA	2
Xbal	<u>5</u>
Volumen total	200 μ l

Se agregaron 200 μ l de esta solución a los tubos eppendorf con los plugs, y se incubaron en baño estacionario 2 hr a 37°C.

4.6.5. Etapa 5 Preparación del gel de agarosa

Se diluyó 1.5 g de agar Seakem Gold en 150 ml de TBE 0.5X, se hirvió en horno de microonda y se llevó al baño a 55°C hasta su uso.

4.6.6. Etapa 6 Electroforesis

Se removió la enzima de restricción y se adicionaron 200 μ l de TBE 0.5X a los tubos con plugs, los cuales se incubaron a temperatura ambiente por cinco minutos posterior a esto, los plugs se retiraron con una espátula estéril y fueron colocados en la parte inferior del peine, se removió el exceso de buffer con papel absorbente, el peine se colocó en el molde del gel y enseguida se vertió la agarosa, se dejó solidificar 15-20 minutos a temperatura ambiente y se colocó en el centro de la cámara de electroforesis con 2.5 L de buffer TBE 0.5X, posteriormente se programó el equipo con las siguientes condiciones;

Flujo de bomba: 1L/min Temperatura: 14°C

Voltaje: 6 V Tiempo de corrida: 19 hr

Pulso inicial: 2.2 s Pulso final: 63.8 s

4.6.7. Etapa 7 Tinción y documentación del gel

Se colocó el gel en un recipiente con solución de tinción de bromuro de etidio y se dejó por 30-45 minutos para teñir los fragmentos de ADN. Posteriormente se colocó el gel en el fotodocumentador para capturar la imagen.

4.7 Producción del extracto de jamaica

Se utilizó una muestra (5 kg) de cálices de roselle H. *sabdariffa* L. deshidratada variedad "criolla de Oaxaca" del estado de Oaxaca, México. La muestra fue manejada bajo condiciones asépticas y transportada al laboratorio el día de la compra, se colocó en una bolsa de plástico estéril y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. Los extractos se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Cruz-Galvez y col., 2013; Morales-Cabrera y col 2013. Bajo condiciones asépticas, se pesaron las muestras (100 g) de cálices secos, y fueron colocadas por separado en matraces estériles con 900 ml de metanol, acetona y acetato de etilo. Los matraces se cerraron herméticamente y se almacenaron a temperatura ambiente durante siete días con agitación manual una vez al día. Después del período de extracción, la fase líquida se filtró a través de papel de filtro. Estos extractos filtrados se concentraron en un rotoevaporador. Los solventes (metanol, acetona y acetato de etilo) fueron eliminados de los concentrados, colocándolos en una incubadora de aire de recirculación durante 24 hr a 45 ± 1 °C. Para el extracto acuoso se pesaron 100 g de cálices secos y se colocaron en un matraz estéril al cual se le agregaron 900 ml de agua destilada, se calentó a ebullición durante 10

minutos y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de este periodo de extracción, el agua se eliminó del concentrado como se describió anteriormente.

4.7.1 Preparación del inóculo y perfiles de resistencia de los extractos de jamaica

Se utilizó la técnica de difusión en disco para analizar la actividad antibacteriana de los extractos cáliz de Jamaica (Cruz-Gálvez *et al.* 2013; Morales-Cabrera *et al.* 2013). Se inocularon las cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos aisladas de zanahorias en tubos con 3 ml de caldo de soya tripticaseína y se incubaron a 35 °C /18 h. Los cultivos se lavaron dos veces en solución salina isotónica estéril (ISS; 0.85% NaCl) con centrifugación a 3500 rpm durante 20 min, el pellet resultante fue resuspendido en agua peptonada estéril resultando un aproximado de 10⁹ CFU / ml. Se realizó un lavado nuevamente para tener una concentración aproximada final de 8 log CFU / ml. Se tomó una suspensión de 100 µl de la primera dilución de cada cultivo bacteriano lavado, posteriormente se inocularon en placas de TSA y se distribuyó sobre el agar utilizando la técnica de extensión de superficie. Se colocaron los discos de papel de filtro con 5 mm de diámetro sobre el agar con la ayuda de unas pinzas estériles, después de esto se agregaron 10 µl de cada extracto sobre los discos, incluyendo solución salina isotónica como control negativo. Se realizaron cuatro replicas por extracto. Una vez que los extractos fueron absorbidos por el agar las placas fueron incubadas por 24 h a 35°C. Los diámetros (mm) de inhibición fueron medidos y promediados para cada extracto.

4.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey usando el programa Statistica 8 para analizar diferencias significativas ($p < 0.05$) en el comportamiento de las cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos contra cepas sensibles de *Salmonella*

5. Resultados y discusión

5.1. Prevalencia de *Salmonella* en las muestras de zanahorias

Para analizar la presencia de *Salmonella* se tomaron colonias típicas y atípicas en los medios selectivos siguiendo la norma MLG 4.05 del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA 2011). De las muestras colectadas en mercados de Pachuca se obtuvieron 32 cepas presuntivas, y se confirmó la presencia de *Salmonella* en 13 cepas en base a la morfología y serología de las colonias. De las 35 muestras provenientes del municipio de Tlahuelilpan (perteneciente al valle del mezquital) solo 5 resultaron contaminadas, de las cuales se aislaron 7 cepas de *Salmonella*. Con esto se obtuvo una prevalencia de 11% y 16% de *Salmonella* en las muestras de zanahorias correspondientes a las dos regiones, encontrándose en un rango similar en comparación con lo realizado por Miranda y col. 2009, quienes detectaron *Salmonella* en 17 de 78 muestras de vegetales crudos (lechuga, espinacas, zanahorias, cebollas, jitomates y chiles), teniendo mayor prevalencia en lechuga (33.3%) y zanahoria (27.3%). Nuestra prevalencia fue más alta en comparación con otros autores (Santiago Quiroz y col. 2009, Garcia-Villanova y col. 1987 y Raufu y col. 2014), quienes reportan una prevalencia de *Salmonella* en vegetales frescos de 6.15%, 7.5% y 6.3% respectivamente. En 2013 Torres-vitela y col. analizaron la calidad microbiológica de los jugos de zanahoria que se venden en restaurantes en la ciudad de Pachuca México, teniendo *Salmonella* una prevalencia de 8.6% de 280 muestras. Esto demuestra la pobre calidad sanitaria de vegetales en Hidalgo. En 2011 se aislaron bacterias resistentes a antibióticos en zanahorias y jitomates, encontrándose un total de 2607 cepas resistentes, teniendo

mayor prevalencia las muestras de zanahorias (Akter y col. 2011). Países como Nigeria, Bangladesh y México emplean malas prácticas en la agricultura como: utilizar las aguas negras para la irrigación de cultivos y utilizar las heces de ganado como fertilizante, lo cual se convierte en un problema ambiental, ya que esta contaminación entra a la cadena alimenticia y origina infecciones a la población. Es evidente que el consumo de vegetales crudos es un riesgo para quien los consume y una importante fuente potencial de salmonelosis.

5.1.1. Sensibilidad antibiótica

Se realizaron los perfiles de resistencia a todas las cepas aisladas, los resultados obtenidos mostraron que todas presentaron resistencia a por lo menos dos antibióticos. En la tabla 2. Se muestra la clasificación y porcentaje de las cepas según los halos de inhibición basados en las recomendaciones de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

Tabla 2. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* aisladas en mercados de Pachuca y Tlahuelipan frente a 16 antibióticos empleados.

Antibiótico	Resistentes%	Sensibilidad Intermedia %	Sensibles %
Ampicilina	85	15	0
Amoxicilina/ ácido clavulánico	80	20	0
Sulfisoxazol	50	50	0
Colistina	50	40	10
Estreptomina	50	40	10
Amikacina	40	35	25

Trimetoprim/sulfametoxazol	25	35	40
Eritromicina	30	40	30
Kanamicina	30	45	30
Ácido Nalidíxico	25	45	35
Neomicina	20	45	35
Tetraciclina	10	40	50
Gentamicina	5	35	60
Cloranfenicol	10	30	60
Ceftriaxona	10	35	65
Ciprofloxacina	0	0	100

En la siguiente tabla se muestra el número total de cepas resistentes y no resistentes a los antibióticos empleados.

Tabla 3. Número de cepas resistentes, sensibilidad intermedia y sensibles.

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad Intermedia	Sensibles
Ampicilina	17	3	0
Amoxicilina/ácido clavulánico	16	4	0
Sulfisoxazol	8	12	0
Colistina	10	8	2
Estreptomina	10	8	2
Amikacina	10	7	3
Trimetoprim/sulfametoxazol	5	7	8
Eritromicina	6	8	6
Kanamicina	5	9	6
Ácido Nalidíxico	4	9	7
Neomicina	2	9	9

Tetraciclina	2	8	10
Gentamicina	1	7	12
Cloranfenicol	2	6	12
Ceftriaxona	0	7	13
Ciprofloxacina	0	0	13

Respecto a ampicilina se muestra que el 85% del total de las cepas presentaron resistencia. Al igual que otros trabajos se demuestra que este antibiótico tiene poca efectividad sobre cepas de *Salmonella* no solo aisladas de vegetales, sino también de casos clínicos, carnes, productos lácteos, animales silvestres, composta, suelos, aguas negras y potable (Monthon y col., 2012; Nigad y col., 2011; Chien-Shun y col., 2009; Edrington y col., 2009; Zaidi y col., 2006). La segunda resistencia más común fue para amoxicillin/clavulanic acid, seguido de estreptomina 80% y 50% respectivamente, de igual manera otras investigaciones han reportado bacterias resistentes estos antibióticos que fueron aisladas de alimentos como: carne de pollo, carne molida de res y vegetales (Brahim Bouchrif y col., 2009; Nunes Madeiros y col., 2011 y Akter y col., 2011). En el caso eritromicina se presentó una resistencia menor (30%) a lo reportado en Corea: 100% en cepas aisladas de pollo y puerco (M.-S. Kim y col., 2012; Hyeon JY y col., 2011). De igual manera se presentó un porcentaje menor para tetraciclina (10%) en comparación con cepas aisladas de carnes reportado previamente por Ali Akbar y col., 2013.

En el caso de ceftriaxona y ciprofloxacina se obtuvo un 65% y 100% de efectividad, siendo los más recomendables para tratar una infección ocasionada por *Salmonella*, ya que aunque cloranfenicol presentó efectividad de 60%, pero su uso está limitado

a infecciones graves, debido a sus efectos colaterales tóxicos (Voet y col., 2009). En 2012 Shan y col. aislaron cepas de *Salmonella* en carne de pollo, y también no obtuvieron resistencia a gentamicina, ciprofloxacina y cloranfenicol, más tarde se aislaron cepas sensibles a gentamicina y cloranfenicol en muestras vegetales (Monthon y col., 2012). De igual manera ciprofloxacina ha mostrado buena actividad antimicrobiana en cepas aisladas de heces de vacas y humanos en Ethiopia y Nigeria, esto debido a que este antibiótico no es usado ampliamente en estos países (Zelalem Addis y col. 2011). Sin embargo en China y USA se aislaron cepas de *Salmonella* de carnes y de un caso clínico que fueron resistentes a ciprofloxacina y ceftriaxona, debido a conjugación de plásmidos y mutaciones en bombas de eflujo (Marcus Ho Yin Wong y col., 2013; Fey y col., 2000), lo cual representa un gran problema de salud pública, ya que estos antibióticos son los más recurrentes frente a infecciones severas ocasionadas por *Salmonella*. También se ha demostrado la presencia de *Salmonella* resistente a cloranfenicol en carnes y vegetales en México y otros países, (Miranda y col., 2009; Lertworapreecha y col., 2013; Bouchrif y col., 2008). Nigad y col., 2011, aislaron y realizaron el perfil de resistencia a distintos microorganismos entre ellos *Salmonella* en 8 vegetales, incluido zanahoria, sus resultados coinciden con los nuestros, pues mostraron una alta y nula resistencia a ampicilina y ciprofloxacina.

Las cepas aisladas en las muestras de zanahorias provenientes de mercados de Pachuca fueron enviadas al INDRE para su tipificación, encontrándose cuatro serotipos diferentes (Tabla 3).

En México *S. Typhimurium* ha sido reportada como el serotipo más común aislada de vegetales, también se ha encontrado *S. Gallinarum* y *S. Typhi* (Quiros y col., 2009). En la tabla 3 se observa que también *S. Typhimurium* resultó ser el más frecuente con diferentes perfiles de resistencia, a excepción de las cepas 10 y 12 que presentaron el mismo patrón, pues provenían de la misma muestra. *S. Typhi* y *S. Gallinarum* presentaron la misma resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y ampicilina. Respecto a gentamicina se obtuvo una buena respuesta, ya que solo una cepa multiresistente (*S. Typhimurium*) a 10 antibióticos presentó resistencia a este. En 2012 *S. Typhimurium* presentó resistencia a antibióticos como: estreptomina, colistina y eritromicina, mientras que la especie *S. Montevideo* (ambos serotipos aislados de carne de pollo) a: colistina, ácido nalidixico y estreptomina (M.-S. Kim y col., 2012), al igual que nuestras cepas identificadas con el mismo serotipo.

Tabla 4. Tipificación y combinación de los antibióticos empleados en las cepas aisladas provenientes de mercados de Pachuca.

No. de cepa	Especie	Antibióticos a los que fueron resistentes
1	<i>S. Typhi</i>	(4)-AMC-COL, AMP, ERI
2	<i>S. Typhimurium</i>	(8)-EST-NAL- AMC, COL, AMP, TSX, ERI, AMK
3	<i>S. Typhimurium</i>	(6)-NAL, AMC, COL, AMP, ERI, AMK,
4	<i>S. Montevideo</i>	(4)-EST, NAL, COL, AMP
5	<i>S. Typhimurium</i>	(10)-EST, AMC, CHL, NEO TCY, SOX, GEN, K, COL, AMP
6	<i>S. Typhimurium</i>	(5)-AMC, K, AMP, TSX, AMK
7	<i>S. Typhimurium</i>	(3)-EST, AMC, AMP
8	<i>S. Typhimurium</i>	(4)-EST, AMC, COL, AMP

9	<i>S. Typhimurium</i>	(2)-NAL, SOX
10	<i>S. Typhimurium</i>	(3)-AMC, SOX, AMP
11	<i>S. Gaminara</i>	(4)-NAL, AMC, SOX, AMP
12	<i>S. Typhimurium</i>	(3)-AMC, SOX, AMP
13	<i>S. Typhimurium</i>	(2)-AMC, AMP

AMP=Ampicilina, AMK=Amikacina, CIP= Ciprofloxacina, SOX=Sulfisoxazol, GEN =Gentamicina, CHL=Cloranfenicol, CRO=Ceftriaxona, TCY=Tetraciclina, NAL=Ácido nalidíxico, STR=Estreptomocina, K=Kanamicina, SXT=Trimetoprim-Sulfametoxazol, AMC= Amoxicilina/ Ácido clavulánico, ERY=Eritromicina, COL=Colistina, NEO=Neomicina.

Recientemente en 2015 se aislaron *S. Typhi* de vegetales que igualmente presentaron resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico y ceftriaxona resultó ser el antibiótico más eficiente (Abakpa y col., 2015).

5.1.2. Dendrogramas construido de acuerdo al perfil de resistencia

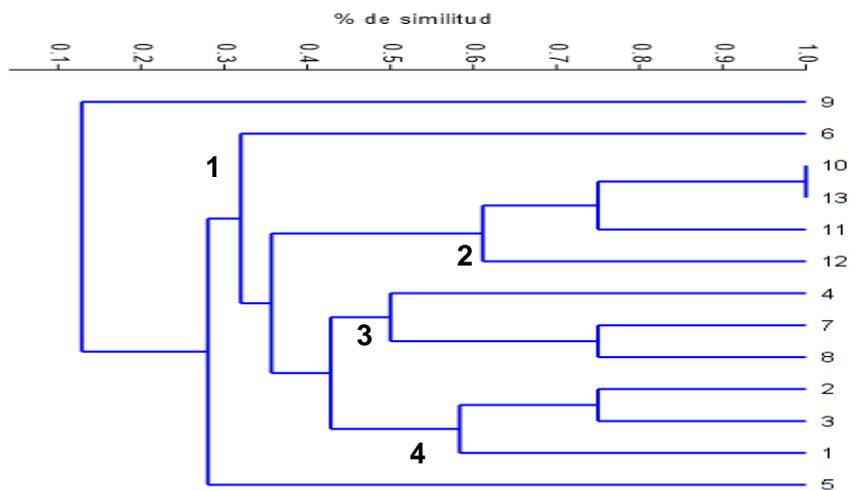


Figura 2 . Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia de las cepas aisladas de zanahorias provenientes de mercados de Pachuca.

Es importante señalar que los dendrogramas que se construyeron proporcionan la relación existente entre las cepas aisladas, mostrando porcentajes de similitud (de acuerdo al perfil de resistencia) con el fin de seleccionar las cepas más resistentes que posteriormente son analizadas mediante electroforesis de campos pulsados.

El dendrograma obtenido de las 13 cepas de zanahorias (figura 2) mostró 4 grupos:

El grupo 4 presentó un 58% de similitud, sin embargo entre la cepa 2 y 3 hay dos antibióticos de diferencia teniendo un 75 % de similitud entre ellas. Respecto al grupo 3 se observa una menor similitud (50%), sin embargo las cepas 7 y 8 difieren solo de un antibiótico, y están cercanamente relacionadas con el grupo 4.

La cepa 9 muestra un perfil de resistencia diferente al resto de las cepas, sin embargo la cepa 5 resultó ser la más resistente y muestra un 29 % de similitud (más cercano con el resto de las cepas).

El grupo formado por las cepas 10, 11, 12 y 13 presenta un 61% de similitud, siendo estas las cepas más sensibles. La cepa 12 difiere de dos antibióticos en comparación con 10 y 13, es por ellos que se observa más alejada, sin embargo la cepa 11 solo difiere de un antibiótico. En este grupo se observaron dos cepas con el mismo perfil de resistencia (100%) que fueron aisladas de la misma muestra.

También se puede observar que hay una gran distancia entre la cepa 1 y la cepa 9, lo cual indica que no hay similitud entre ellas, puesto que no tienen ningún antibiótico en común. Respecto a las cepas aisladas de zanahorias de Tlahuelipan, se puede observar en la figura 3 la formación de dos grupos, quedando la cepa 6 fuera de ellos, con un perfil de resistencia muy diferente.

La cepa 5 y 7 arrojaron un porcentaje de similitud de 50% al igual que la cepa 1 y 2.

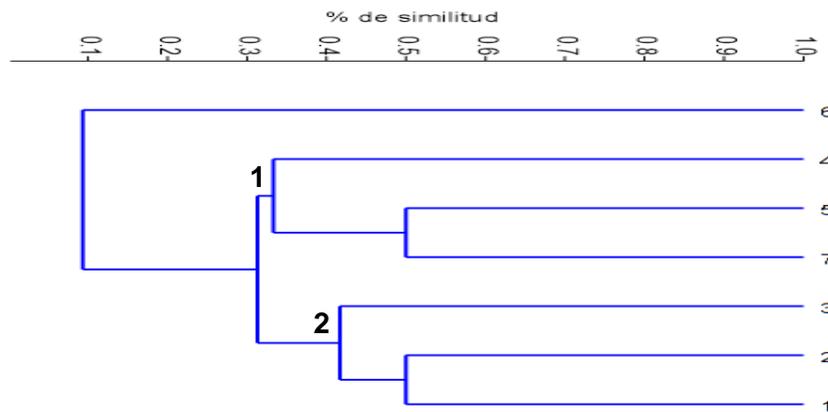


Figura 3. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia de las cepas aisladas de zanahorias provenientes de mercados de Tlahuelilpan.

Estas cepas aisladas en mercados de Tlahuelilpan mostraron perfiles de resistencia muy parecidos al de las cepas aisladas en mercados de Pachuca.

Analizado el porcentaje de similitud se procedió seleccionar a las cepas resistentes para el su estudio filogenético.

5.2. Prevalencia de *Salmonella* en muestras de cilantro y nopales

La prevalencia obtenida en cilantros colectados en Pachuca y Tlahuelilpan fue de 28%, lo cual resulta alta en comparación con las siguientes investigaciones; Singh y col., 2007 analizaron 304 muestras de cilantro teniendo una prevalencia de *Salmonella* de 2.96%, mientras que Jean-Gilles y col., 2014 obtuvieron 6% de 365 muestras de cilantro y recientemente Pan y col., 2015 encontraron una prevalencia de 6.6% en 242 muestras de albahaca, frijoles, calabaza y cilantro, siendo este último el más contaminado. Sin embargo en 2009 Quiroz-Santiago y col. Obtuvieron

un 11% de prevalencia en cilantros en la Ciudad de México, lo cual indica que el consumo de este vegetal es un riesgo para el consumidor, si no se implementan las medidas de higiene (lavado y desinfección). La prevalencia en nopales resultó ser de 20%, lo cual indica que también es necesario la desinfección y buena cocción de este vegetal. En la actualidad no hay investigaciones que hablen de la calidad sanitaria de este vegetal.

5.2.1. Sensibilidad antibiótica

Se puede observar en la tabla 5 que estreptomicina resultó ser el antibiótico menos eficiente, ya que todas las cepas de cilantro presentaron resistencia, en el caso de nopales las cepas presentaron un 87.5 % de resistencia. Se ha demostrado en otros países como Bangladesh que este antibiótico tiene poca efectividad, no solo frente a *Salmonella*, sino también *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *E. coli.*, *Staphylococcus spp.*, entre otros (Nigad y col., 2011). Dicho estudio se llevó a cabo en vegetales incluido cilantro, las cepas mostraron una resistencia de 96% para ampicilina sin embargo nuestros resultados difieren en este antibiótico, ya que obtuvimos 26.66% y 18.75 % de resistencia para cilantro y nopales respectivamente. Otra investigación realizada con vegetales mostró resultados semejantes a los nuestros, pues reportaron una resistencia de 42% para amoxicilina/ácido clavulánico y 18% para ciprofloxacina (Akter y col., 2011), mientras que nuestros cilantros analizados presentaron 46.41 % para amoxicilina/ácido clavulánico y 13% ciprofloxacina. Aquí hubo discrepancia con las muestras de nopales respecto a amoxicilina/ácido clavulánico (92.3%), pero no para cloranfenicol (0%). En otra investigación más

reciente no se obtuvo resistencia a cloranfenicol en cepas de *Salmonella* aisladas de vegetales (Lertworapreecha y col., 2013).

Se encontraron 16 cepas de cilantro y 9 de nopales resistentes a eritromicina, mientras que en el año 2012, 15 de 16 cepas de *Salmonella* fueron resistentes a este antibiótico (Smith y col., 2012).

Tabla 5. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* aisladas de cilantros y nopales frente a los 16 antibióticos empleados.

Antibiótico	Muestras	Resistentes %	Sensibilidad intermedia %	Sensibles %
Estreptomina	Cilantro	100	0	0
	Nopales	87.5	12.5	0
Sulfisoxazol	Cilantro	86.66	13.33	0
	Nopales	81.25	18.75	0
Neomicina	Cilantro	53.33	46.66	0
	Nopales	87.5	6.25	6.25
Kanamicina	Cilantro	60	40	0
	Nopales	62.5	37.5	0
Amoxicilina/ ácido clavul.	Cilantro	46.41	26.8	26.8
	Nopales	92.3	7.6	0
Eritromicina	Cilantro	53.33	46.66	0
	Nopales	56.25	43.75	0
Colistina	Cilantro	53.33	46.66	0
	Nopales	62.5	37.5	0
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Cilantro	40	53.33	6.66
	Nopales	62.5	37.5	0
Ampicilina	Cilantro	26.66	13.33	60
	Nopales	18.75	12.5	68.75
Gentamicina	Cilantro	20	60	20
	Nopales	43.75	37.5	18.75
Tetraciclina	Cilantro	33.3	26.66	40
	Nopales	18.75	12.5	68.75
Ciprofloxacina	Cilantro	13	20	66.66
	Nopales	0	31.25	68.75
Amikacina	Cilantro	6.66	53.33	40
	Nopales	0	68.75	31.25
Cloranfenicol	Cilantro	0	13.33	86.66

	Nopales	0	18.75	81.25
Ácido nalidíxico	Cilantro	0	33.33	73.3
	Nopales	0	25	75
Ceftriaxona	Cilantro	0	6.66	93.33
	Nopales	0	0	100

Los perfiles de resistencia de las cepas de *Salmonella* aisladas de cilantro (provenientes de Pachuca y Tlahuelilpan) y nopales guardan cierta semejanza, lo cual puede indicar que estos vegetales provienen de la misma región, aunque hay unas pequeñas discrepancias solo en 2 antibióticos (amoxicilina/ácido clavulánico y kanamicina).

5.2.2. Dendrogramas construido de acuerdo al perfil de resistencia

El dendrograma construido con las cepas aisladas de nopales arrojó 5 agrupaciones, de las cuales el grupo 3 resultó ser el más grande con un porcentaje de similitud de 72%, en este mismo grupo se puede observar que las cepas 7 y 8 mostraron el mismo perfil de resistencia. En contraste el grupo 5 resultó ser el más pequeño y el más alejado al resto de las cepas. Respecto al dendrograma construido con las 35 cepas de *Salmonella* aisladas de cilantro, se puede observar en la figura 5 la formación de 6 grupos. La cepa 33 mostró un perfil de resistencia muy diferente al resto de las cepas, es por ello que no se agrupó con ninguna otra cepa y tiene un porcentaje de similitud de 51%. Se encontraron posibles clonas en los grupos 2,3 y 5. El grupo 1 arrojó un 50% de similitud entre las cepas 5,10 y 1.

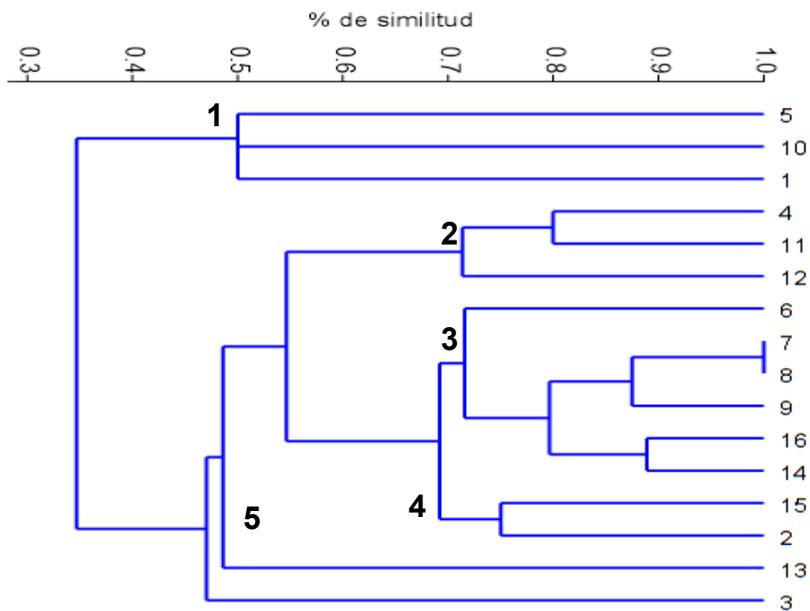


Figura 4. Dendrograma construido con cepas de *Salmonella* aisladas de nopales.

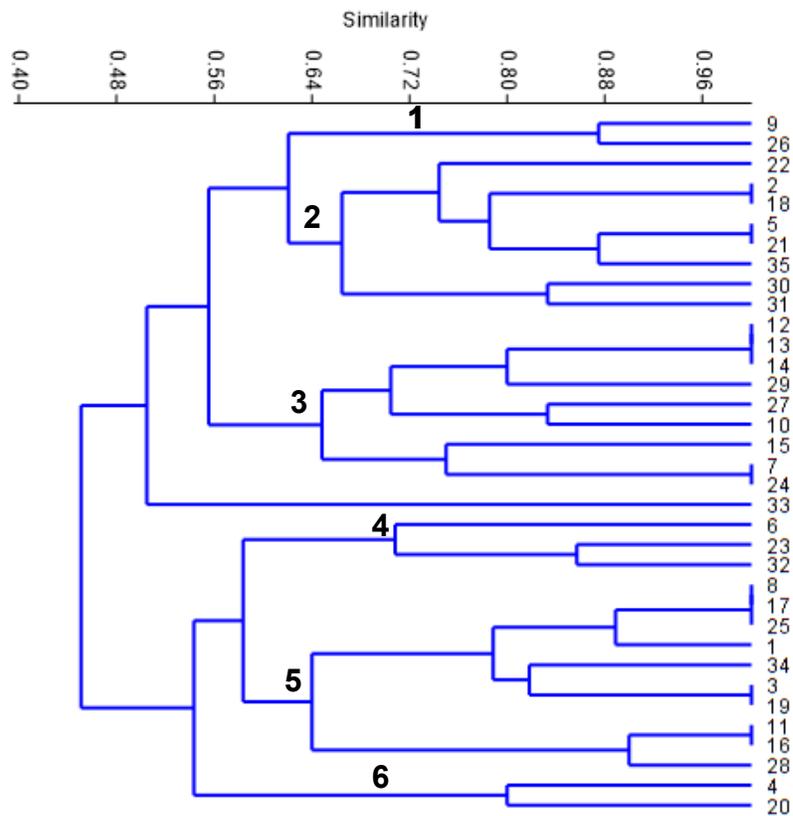


Figura 5. Dendrograma construido con cepas de *Salmonella* aisladas de cilantro

5.3. Prevalencia de *Salmonella* en muestras de carne molida de res y pollo

Salmonella fue aislada en 130 (70%) de 186 muestras de carne molida de res y se confirmaron 450 cepas, 27 (50%) de 54 muestras de pollo y se confirmaron 162 cepas. De igual manera autores como Boonmar y col., 2013; Cabrera-Díaz y col., 2013., y Soltan Dallal y col., 2009 han confirmado una alta prevalencia (82%, 56.7% y 49.6% respectivamente) de *Salmonella* en carne de res. En 2013 se encontró en Tailandia una prevalencia de (82% y 67.5%) de este patógeno en carne cruda de puerco y pollo (Lertworapreecha y col., 2013), en Indonesia y Vietnam también se ha encontrado una alta prevalencia en carne de pollo (52.5% y 53.3% respectivamente) (Kusumaningrum y col., 2012; Hao Van y col., 2007). Esta alta incidencia puede ser el resultado de la contaminación durante la producción de la carne (sacrificio, cortes, almacenamiento y transporte), y también de las malas prácticas de higiene tanto en rastro como en expendios. También existen investigaciones reportadas por M.M.S Dallal y col., 2010; Ejeta y col. 2004; Neema Mrema y col., 2006; Lin Thong y Modarressi., 2011, las cuales mencionan prevalencias de *Salmonella* en carne de res que van de 14% a 22%, todas muy inferiores a la nuestra (70%). De igual modo Kim y col., 2012; Zdragas y col., 2012 también encontraron prevalencias menores 22.4% y 39.5% en carne de pollo. Estas diferencias en prevalencias pueden ser debido a factores socio-económicos (Shah y Korejo., 2012).

5.3.1. Sensibilidad antibiótica

Todas las cepas de *Salmonella* presentaron resistencia a por lo menos 2 antibióticos (Tabla 6). Las resistencias más frecuentes fueron a: sulfisoxazol 95.75%, colistina 90.20%, estreptomycin 86.76% y eritromicina 76.96%. Por el contrario la mayoría de cepas fueron sensibles a ciprofloxacina 65.52%, seguido de ceftriaxona 33.01% y tetraciclina 31.05%. Cloranfenicol presentó mayor porcentaje (55.39%) para cepas de sensibilidad intermedia, pero también se encontraron cepas resistentes (16.18%).

Tabla 6. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* aisladas de carne de res y pollo a los 16 antibióticos empleados.

Antibióticos	Resistentes %	Sensibilidad intermedia %	Sensibles %
Sulfisoxazol	95.75	3.11	1.14
Colistina	90.20	0	9.80
Estreptomycin	86.76	11.28	1.96
Eritromicina	76.96	20.43	2.61
Trimetoprim/sulfametoxazol	66.50	27.94	5.56
Ampicilina	66.18	15.36	18.46
Ácido nalidíxico	65.69	29.08	5.23
Kanamicina	64.22	31.53	4.25
Neomicina	63.56	32.03	4.41
Tetraciclina	62.25	6.70	31.05
Amikacina	59.31	27.45	13.24
Gentamicina	55.23	24.02	20.75
Amoxicilina/ácido clavulánico	46.41	26.80	26.80
Ceftriaxona	44.28	22.71	33.01
Cloranfenicol	16.18	55.39	28.43
Ciprofloxacina	15.20	19.28	65.52

Los perfiles de resistencia difieren mucho de una cepa a otra. Las diferencias de resistencias pueden ser debido a los hábitos locales en el uso de antibióticos, o tal

vez a que la carne que se comercializa en los mercados de Pachuca procede de diferentes regiones o estados del país.

La resistencia más alta que se obtuvo fue a: sulfisoxazol (95.7%), recientemente Yang B y col., 2014 obtuvieron una resistencia de 74.1%, las cuales son semejantes. También es importante mencionar la elevada resistencia que se presentó para: estreptomicina, trimetoprim/sulfametoxazol, y ampicilina (86.76%, 66.50% y 66.18% respectivamente), las cuales han sido reportadas con porcentajes similares en China, Túnez, Thailand, Malasia y México (Li YC y col., 2014; Yang B y col., 2014; Turki Y y col., 2014; Boonmar y col., 2013; Thong Lin y Modarressi., 2011; Cabrera-Díaz y col., 2013). En el caso de ampicilina distintas investigaciones han observado resistencia de 100% (Soomro y col., 2012; Shah y Korejo, 2012; Zalalen Addis y col., 2011), lo cual sugiere no prescribir ni automedicarse con este antibiótico, ya que solo se genera gasto económico con poco o nulo beneficio.

Salmonella mostró una resistencia mayor (62.25%) a tetraciclina, en comparación con lo realizado por Cabrera-Díaz y col., 2013 (40.7%). De igual manera Cabrera y col., 2013; Soltan Dallal y col., 2009; Hao Van y col., 2007 observaron cepas resistentes a tetraciclina, siendo este antibiótico uno de los más empleados para promover el crecimiento en animales de abasto.

Ceftriaxona es uno de los antibióticos más recomendados para tratar una infección causada por *Salmonella*, sin embargo nuestros resultados mostraron una resistencia de 44.28%, lo cual tiene semejanza con la resistencia que obtuvieron Fortuna y col., 2012 (53.33%), esto es debido a la enzima CTX-M-14 que es transferida mediante el plásmido IncN (Yin Wong y col., 2013).

Se puede sugerir el uso de las Fluoroquinonas como ciprofloxacina en infecciones leves y severas ocasionadas por *Salmonella*, ya que su eficiencia arrojó un 65.52%. En 2010 Dallal y col. aislaron cepas de *Salmonella* en carne de pollo y res, analizando su susceptibilidad a antibióticos, siendo ciprofloxacina también el más eficaz; Bhatia y col., 2007 aislaron *Salmonella* de 45 casos humanos que presentaron fiebre entérica y obtuvieron un 88% de sensibilidad para este antibiótico; por último Zalalen Addis y col., 2011 también mostraron que ciprofloxacina tiene una buena actividad antimicrobiana para este patógeno. Nuestros resultados en conjunto con los de otros investigadores indican que la presencia y multiresistencia de *Salmonella* es común en carne cruda de res y pollo. Es importante destacar la elevada multiresistencia de las cepas aisladas: 3 cepas fueron sensibles a los 16 antibióticos, más del 50 % de las cepas fueron resistentes a por lo menos 10 antibióticos y el 30.2% a por lo menos 12 antibióticos (Tabla 7).

Tabla 7. Combinación de los antibióticos empleados en las cepas aisladas de carnes.

No. de cepas	(Número) y antibióticos a los que fueron resistentes las cepas
3	(16)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-CHL-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(15)-AMP-AMK-SOX-GEN-CHL-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(15)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
20	(14)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
7	(14)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
5	(14)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
2	(14)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
2	(14)-AMP-AMK-CIP-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL
2	(13)-AMP-SOX-GEN-CHL-CRO-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL-N
2	(13)-AMP-AMK-CIP-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL
2	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-COL-N
2	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL-N
4	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
5	(13)-AMP-AMK-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6	(13)-AMP-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL-N
12	(13)-AMP-AMK-SOX-GEN-CHL-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6	(13)-AMP-CIP-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(12)-AMP-AMK-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL-N
6	(12)-AMP-AMK-SOX-CHL-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL
6	(12)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL-N
6	(12)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-TSX-AMC-COL-N

6 (12)-AMP-AMK-SOX-CRO-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6 (12)-AMP-AMK-SOX-GEN-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
15 (12)-AMP-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6 (12)-AMP-AMK-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
12 (12)-AMP-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6 (12)-AMP-AMK-SOX-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N
6 (12)-AMK-SOX-GEN-CHL-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
9 (11)-AMP-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL-N
9 (11)-AMK-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6 (11)-AMK-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6 (11)-AMP-AMK-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6 (11)-AMP-AMK-SOX-GEN-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL-N
6 (11)-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-TSX-COL-N
6 (10)-AMP-AMK-SOX-CRO-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL
6 (10)-AMP-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL
9 (10)-AMP-SOX-GEN-CRO-NAL-TSX-AMC-ERI-COL-N
6 (10)-AMP-GEN-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL
6 (10)-AMP-SOX-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL
6 (10)-AMP-AMK-SOX-CRO-NAL-STR-K-AMC-COL-N
6 (10)-AMP-AMK-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-COL-N
6 (10)-AMP-AMK-SOX-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL-N
6 (10)-AMP-AMK-SOX-CRO-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6 (10)-AMK-CIP-SOX-GEN-CRO-NAL-STR-K-COL-N
9 (10)-AMP-AMK-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-ERI-N
9 (10)-AMP-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-AMC-ERI-N
9 (10)-AMK-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-ERI-COL-N
6 (10)-AMP-SOX-GEN-CHL-TCY-STR-K-TSX-ERI-N
6 (9)-AMP-AMK-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-TSX-COL
9 (9)-AMP-SOX-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI-COL
6 (9)-AMP-AMK-SOX-NAL-STR-K-AMC-ERI-COL
6 (9)-AMP-AMK-SOX-GEN-TCY-NAL-STR-K-ERI
24 (9)-AMK-SOX-GEN-STR-K-TSX-ERI-COL-N
12 (9)-AMK-SOX-GEN-TCY-STR-K-TSX-ERI-N
9 (9)-AMP-SOX-GEN-TCY-STR-K-ERI-COL-N
6 (9)-SOX-CRO-TCY-NAL-K-TSX-ERI-COL-N
6 (9)-AMP-SOX-CRO-NAL-STR-K-ERI-COL-N
6 (8)-AMP-AMK-SOX-NAL-STR-TSX-AMC-COL
6 (8)-AMP-AMK-SOX-CRO-TCY-TSX-ERI-COL
6 (8)-AMP-SOX-TCY-NAL-STR-TSX-AMC-ERI
6 (8)-SOX-CRO-TCY-NAL-STR-TSX-ERI-COL
6 (8)-SOX-CRO-TCY-NAL-TSX-AMC-COL-N
6 (8)-SOX-CHL-TCY-NAL-STR-TSX-COL-N
6 (8)-AMP-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-COL
6 (8)-AMP-AMK-SOX-GEN-STR-K-TSX-ERI
21 (8)-AMK-SOX-GEN-STR-K-ERI-COL-N
6 (8)-AMK-SOX-GEN-K-TSX-ERI-COL-N
6 (7)-AMP-AMK-GEN-NAL-STR-AMC-ERI
9 (7)-SOX-CRO-TCY-NAL-TSX-ERI-COL
6 (7)-SOX-CHL-TCY-NAL-STR-TSX-COL
6 (7)-AMP-SOX-GEN-AMC-ERI-COL-N
6 (7)-AMP-SOX-STR-K-AMC-ERI-COL
9 (7)-AMK-SOX-GEN-STR-K-COL-N
18 (7)-AMK-SOX-GEN-K-ERI-COL-N
6 (6)-AMP-SOX-CRO-AMC-ERI-COL
6 (6)-AMP-AMK-SOX-STR-ERI-COL
6 (6)-SOX-TCY-STR-ERI-COL-N
6 (6)-SOX-GEN-K-ERI-COL-N
6 (6)-SOX-STR-K-ERI-COL-N
6 (5)-AMP-SOX-NAL-STR-AMC
6 (5)-SOX-TCY-NAL-TSX-COL
6 (5)-SOX-TCY-STR-ERI-COL
4 (5)-SOX-NAL-STR-ERI-COL
4 (4)-SOX-NAL-STR-COL
4 (4)-SOX-STR-ERI-COL
4 (3)-SOX-TCY-COL
3 (3)-SOX-ERI-COL
3 (2)-AMP-SOX

Ampicilina (AMP), Amikacina (AMK), Ciprofloxacina (CIP), Sulfisoxazol (SOX), Gentamicina (GEN), Cloranfenicol (CHL), Ceftriaxona (CRO), Tetraciclina (TCY), Ác. Nalidíxico (NAL),

Estrfeptomicina (STR), Kanamicina (K), Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT), Ámoxicilina/Ácido Clavulánico (AMC), Eritromicina (ERI), Colistina (COL), Neomicina (NEO).

5.3.2. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia

El dendrograma se construyó con 89 cepas de diferentes combinaciones formando 15 agrupaciones de acuerdo a similitudes (Figura 6). El grupo 1 se puede observar que se conforma de 7 cepas, arriba de este grupo se encuentra la cepa 89, la cual no forma parte de ningún grupo, puesto que solo presentó resistencia a sulfisoxazol y ampicilina, teniendo un porcentaje de similitud de 17% con el resto de las cepas, de igual manera se observa que la cepa 69 y 81 presentan un perfil de resistencia distinto y una lejanía al resto del grupo. El grupo 5 formado por las cepas C35 y C45 obtuvieron un porcentaje de similitud de 92% entre ellas y solo difieren de un antibiótico para ser consideradas como posibles clonas. El grupo 10 resultó ser el más grande conformado por 15 cepas, mientras que los grupos 2, 5, 7, 11 y 15 solo se conformaron de 2 cepas siendo estos los más pequeños.

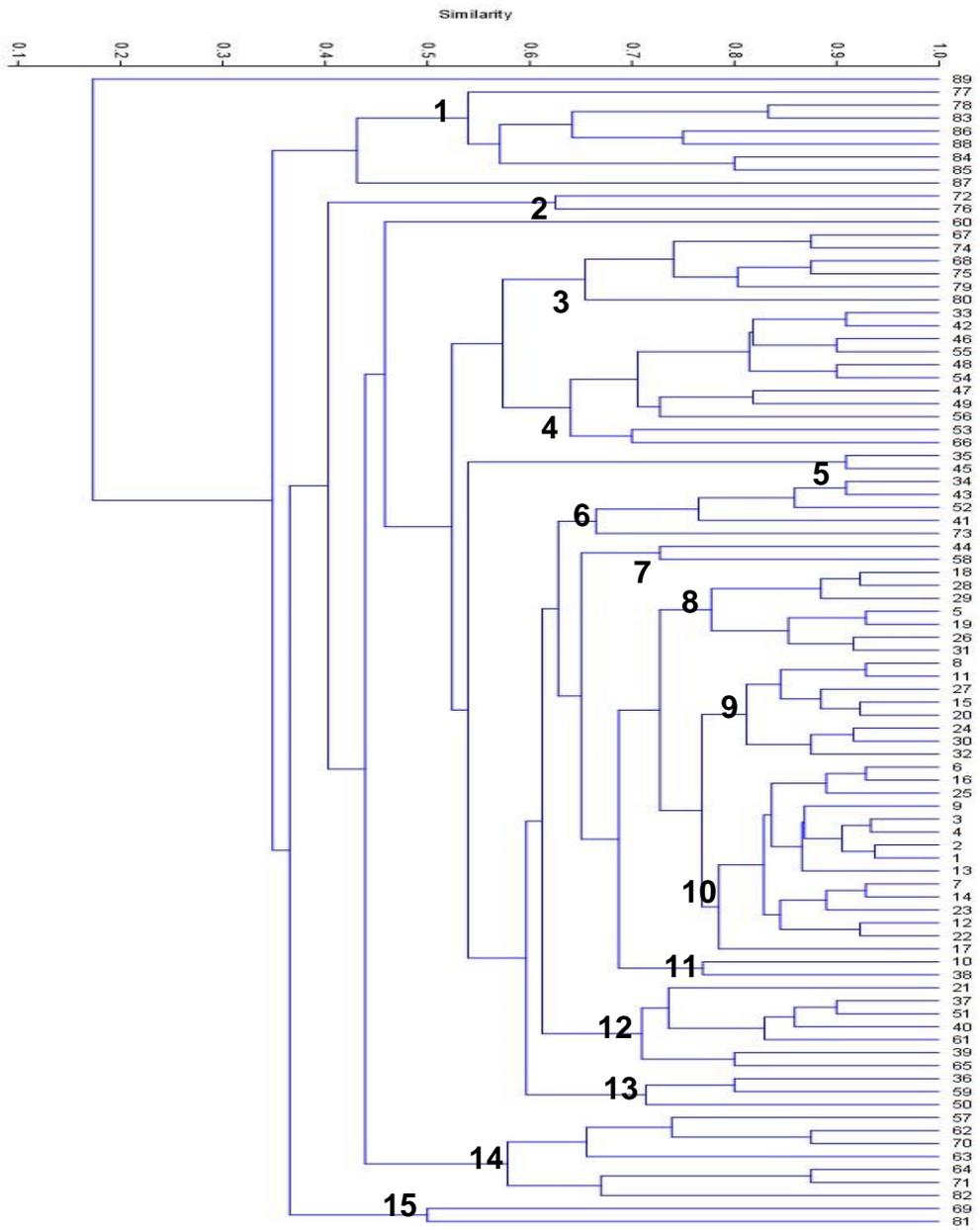


Figura 6. Dendrograma construido con las cepas aisladas de carnes de res y pollo provenientes de mercados de Pachuca.

5.4. Prevalencia de *Salmonella* en muestras de suelo y aguas negras

La prevalencia en las muestras de suelos y aguas negras fue de 54.5% y 64.5%. Se seleccionaron 77 cepas presuntivas en suelos y 94 en aguas negras, y se confirmaron 71 y 84 cepas de *Salmonella* en base a la morfología y serología de las colonias. En comparación con otra investigación realizada en el Estado de Guerrero, nuestra prevalencia en aguas negras fue alta, ya que ellos reportaron un 13% de *Salmonella* en aguas de uso agrícola provenientes de un río para la producción de melón. En Nigeria Abakpa y col., 2015 obtuvieron una prevalencia de 13.9% en muestras de suelos, aguas y vegetales, la cual resulta inferior a la nuestra. Sin embargo en Sinaloa López cuevas y col., 2009 analizaron suelo y agua también de uso agrícola obteniendo una prevalencia de *Salmonella* de 39.29 % en aguas y nula en suelos, explicando que esta nula prevalencia no es debido a la ausencia, ya que se ha reportado que las bacterias en ambientes hostiles entran en estado viable con cultivable, lo que dificulta su aislamiento en medios selectivos. Existen investigaciones realizadas en Marruecos que muestran una alta incidencia de este microorganismo; AL-Jaboobi y col., 2013 obtuvieron un 100% (n=165); Melloul y col., 2001: 80% (n=35) ambos estudios en aguas residuales. Esto indica que el uso de aguas residuales en la agricultura constituye una fuente importante en la diseminación de *Salmonella* en el ambiente, de igual manera en suelos, el uso de estiércol como fertilizante eleva los riesgos de infección por el consumo de vegetales producidos en estas zonas agrícolas.

5.4.1. Sensibilidad antibiótica

Las resistencias más frecuentes en suelos fueron a: eritromicina 80.9%, amoxicilina/ácido clavulánico 80%, estreptomina 76.19% y ampicilina 71.42% (Tabla 8). Por el contrario la mayoría de cepas fueron sensibles a ciprofloxacina 100%, seguido de ceftriaxona 95.23% y cloranfenicol con 71.42%. Las resistencias más frecuentes en las muestras de aguas negras fueron las siguientes: estreptomina 100%, ampicilina 84% y eritromicina 68%. Ceftriaxona 80% y cloranfenicol 80% resultaron los más eficientes.

Al igual que nuestros resultados, una investigación en 2013 mostró que ampicilina, amoxicilina, estreptomina, tetraciclina, trimetropim y sulfasoxazol presentaron altos porcentajes de resistencias en cepas de *E.coli* aisladas de muestras de suelo, aguas de irrigación y lechugas (Holvoet y col., 2013), lo cual indica que la presencia de patógenos resistentes en el ambiente es de gran preocupación, ya que los vegetales actúan como reservorios y vectores de estos microorganismos.

En el Estado de Sinaloa se han aislados cepas de *Salmonella* resistentes a tetraciclina con un porcentaje de 60% en aguas de irrigación, nuestras muestras de aguas también mostraron el mismo porcentaje de cepas resistentes a este antibiótico y se obtuvo un 40% de resistencia intermedia, sin embargo no se observaron cepas sensibles. Para el caso de ampicilina se presentó una resistencia de 71.42% para suelos y 84% para aguas, ambos porcentajes están por debajo de lo reportado por AL-Jaboobi y col., 2013 (100%).

Tabla 8. Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* aisladas de suelos y aguas negras frente a los 16 antibióticos empleados.

Antibiótico	Muestras	Resistentes %	Sensibilidad intermedia %	Sensibles %
Estreptomicina	Suelos	76.19	9.52	14.28
	Aguas negras	100	0	0
Ampicilina	Suelos	71.42	28.57	0
	Aguas negras	84	16	0
Eritromicina	Suelos	80.9	19.04	0
	Aguas negras	68	32	0
Amoxicilina/ Ácido Clavulánico	Suelos	80	16	4
	Aguas negras	57.14	28.57	4.28
Tetraciclina	Suelos	66.66	14.28	19.04
	Aguas negras	60	40	0
Kanamicina	Suelos	66.66	33.33	0
	Aguas negras	64	32	4
Neomicina	Suelos	42.85	52.38	4.76
	Aguas negras	40	60	0
Amikacina	Suelos	66.66	14.28	19.04
	Aguas negras	60	40	0
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Suelos	57.14	42.85	0
	Aguas negras	48	52	0
Sulfisoxazol	Suelos	52.38	47.61	0
	Aguas negras	40	60	0
Ácido Nalidíxico	Suelos	28.57	9.52	61.9
	Aguas negras	32	24	44
Colistina	Suelos	23.8	76.19	0
	Aguas negras	36	64	0
Ciprofloxacina	Suelos	0	0	100
	Aguas negras	12	24	64
Cloranfenicol	Suelos	0	28.57	71.42
	Aguas negras	0	20	80
Gentamicina	Suelos	0	28.57	71.42
	Aguas negras	0	60	40
Ceftriaxona	Suelos	0	4.76	95.23
	Aguas negras	0	20	80

La persistencia de *Salmonella* en el ambiente incrementa el continuo contacto con antimicrobianos y genera una selección natural que evade el ataque de éstos (Refsum y col., 2002). Es importante la implementación de medidas preventivas y correctivas para disminuir el impacto que están ocasionando la presencia de bacterias multiresistentes en el ambiente.

5.4.2. Dendrograma construido de acuerdo al perfil de resistencia

El dendrograma construido con las cepas aisladas de aguas negras mostró 8 agrupaciones. El grupo 1 conformado por 6 cepas muestra un porcentaje de similitud de cero, puesto que dichas cepas fueron sensibles a todos los antibióticos. De igual manera el grupo 8 solo presentó resistencia a ciprofloxacina, es por ellos que se observa alejado del resto de las cepas, dicho grupo resultó ser el más pequeño. El grupo 6 resultó ser el más grande conformado por 22 cepas teniendo un 50% de similitud con el resto de las cepas, en este grupo 9 cepas arrojaron el mismo perfil de resistencia, de igual manera el grupo 2 conformado por 14 cepas mostró un 50% de similitud.

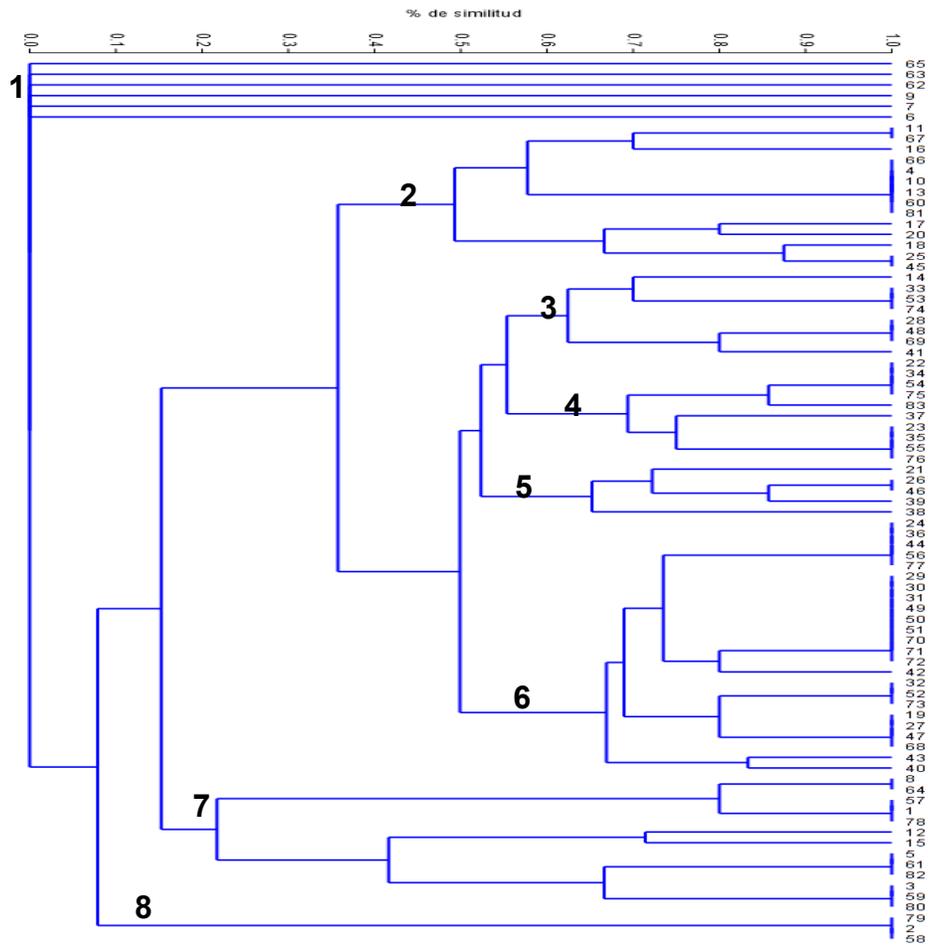


Figura 7. Dendrograma construido con cepas de *Salmonella* aisladas de aguas negras.

En la figura 7 se observan 8 grupos que conforman el dendrograma generado por las cepas aisladas de aguas negras. Dentro del grupo 1 se encuentra la cepa 66, la cual arrojó un perfil de resistencia muy diferente a las 74 cepas. El siguiente grupo más alejado del resto de las cepas fue el 9, dentro de este grupo la cepa 50 mostró un 78% de similitud con las cepas 56 y 11. Respecto al grupo 8 la cepa 32 y 1 obtuvieron un 100% de similitud, el mismo caso se presentó para las cepas 4, 22 y 35. Los grupos que no presentaron cepas con el mismo perfil de resistencia fueron:

1, 2, 3, 4 y 9. En el dendrograma general (figura 9) pueden observar 24 agrupaciones. Dentro del grupo 1 se encuentran las cepas que fueron sensibles a los 16 antibióticos empleados, las cuales se localizan en la parte superior e inferior. El grupo 24 se conforma de 5 cepas, las cuales presentaron un perfil de resistencia muy diferente al resto de la cepas con 12% de similitud con los 22 grupos formados. El grupo 2 solo se formó con 2 cepas con 100% de similitud entre ellas. En contraste los grupos 9 y 10 resultaron ser los extensos. De igual manera se pueden observar anillos de colores que muestran secciones mas representativas del arbol construido.

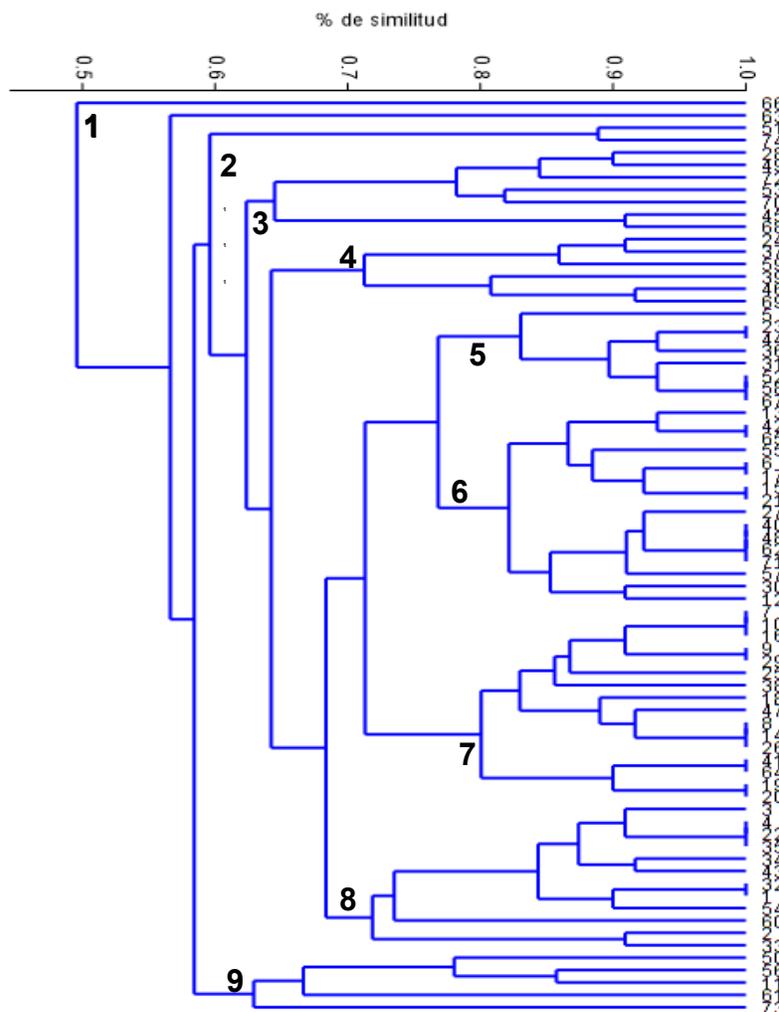


Figura 8. Dendrograma construido con cepas de *Salmonella* aisladas de suelos.

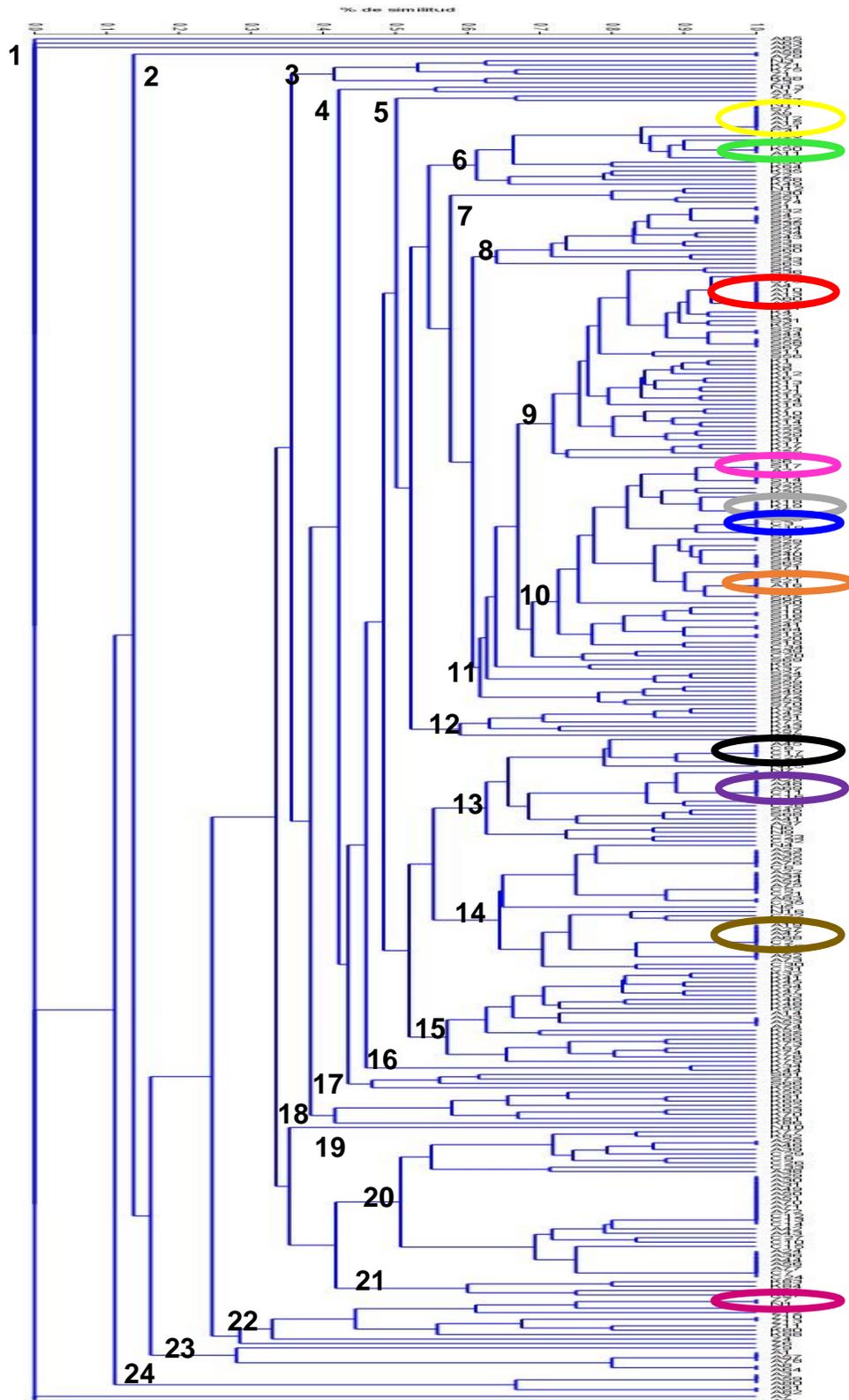


Figura 9. Dendrograma general construido con el total de cepas aisladas.

Todos los anillos mostraron cepas con un 100% de similitud entre ellas; en el anillo amarillo se encuentran cepas de nopales, suelos, agua y cilantro; el verde mostró cepas aisladas de carne y agua con el mismo perfil de resistencia, de igual manera para el gris; los anillos rojo, rosa y naranja mostraron cepas de suelo y aguas negras; la cepas de cilantro y aguas negras se agruparon en el anillo azul, morado y café.

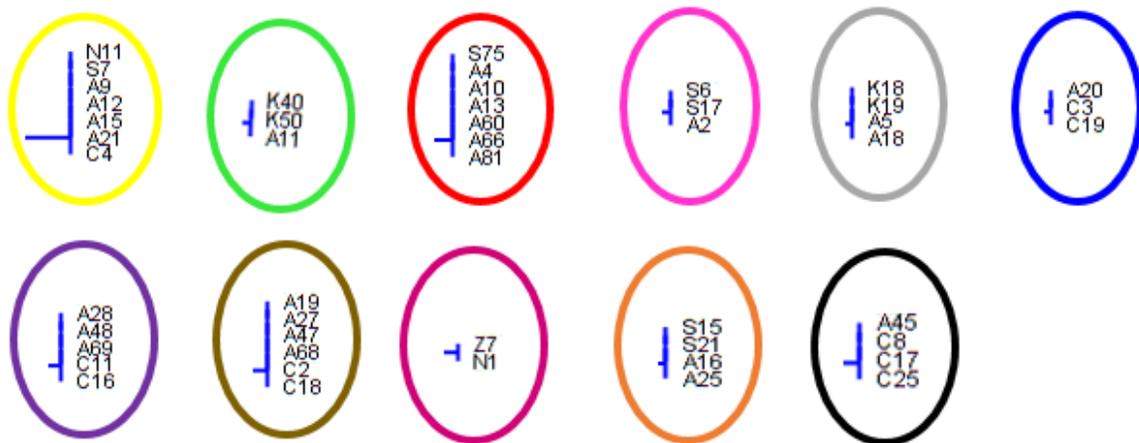


Figura 10. Secciones más representativas del dendrograma construido

Es importante señalar que las cepas aisladas de *Salmonella* independientemente de la fuente y tiempo de muestreo, mostraron la misma sensibilidad en algunos casos. En la actualidad hay escasa información relacionada con dendrogramas construidos de acuerdo a la sensibilidad a antibióticos. Fortuna y col., en 2012 construyeron un dendrograma con cepas resistentes a antibióticos, con el mismo fin que nuestro estudio, mostrando agrupaciones de cepas aisladas de carne para hamburguesa, independientemente que fueran de pollo o res.

5.5. Construcción de cepas de *Salmonella* ATCC multiresistentes a 6 y 11 antibióticos.

Para la construcción de los 2 grupos de cepas resistentes, se tomaron cepas de *Salmonella* ATCC, aquí los antibióticos ejercieron presión selectiva y se identificaron aquellas cepas que presentaron mutación inducida (al azar) en los genes que codifican las enzimas encargadas del desenrollamiento del ADN en el proceso de división celular. Cuando se empleó rifampicina, se obtuvieron colonias aisladas y con morfología característica de *Salmonella*. Al emplear kanamicina, se aislaron colonias con las mismas características. Sin embargo, al emplear ciprofloxacina, estreptomicina y una mezcla de tetraciclina, eritromicina y kanamicina, el crecimiento fue masivo y no había ninguna colonia aislada (figura 11). Por ello, se volvió a repetir el procedimiento con estos últimos antibióticos pero el resultado fue similar al anterior.

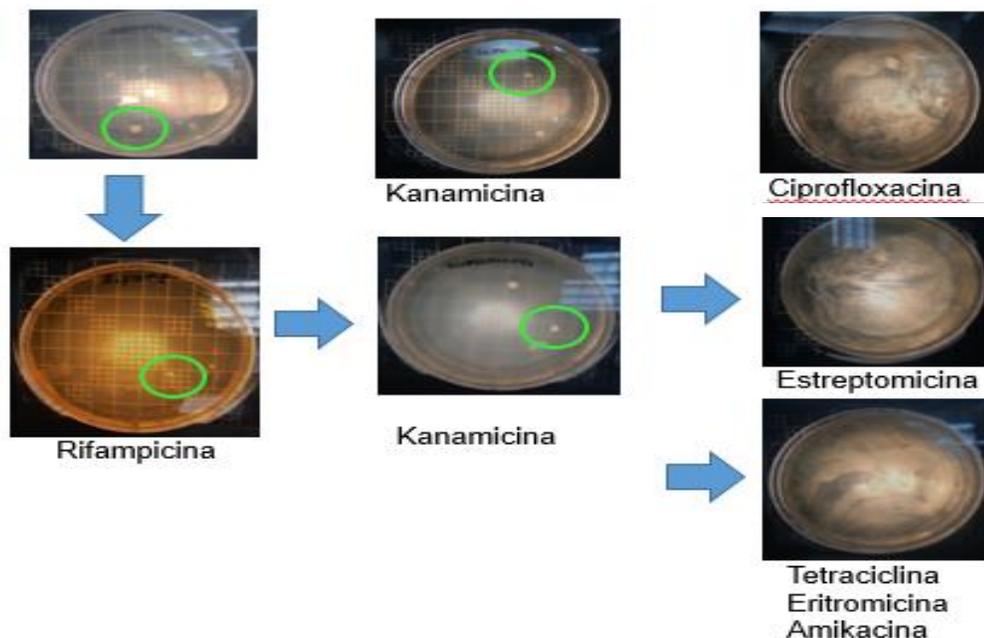


Figura 11. Resistencia cruzada en la mutación inducida a *Salmonella*.

Debido a estos resultados, se infirió que las concentraciones de los antibióticos empleados no eran las adecuadas, la mezcla estaba provocando una resistencia cruzada o simplemente no había un buen sinergismo entre ellos.

Debido a que la kanamicina fue el antibiótico probable responsable del crecimiento masivo de microorganismos, se volvió a sembrar la cepa en el mismo agar, pero sin este antibiótico. Los resultados mostraron que, efectivamente fue kanamicina quien provoco esa resistencia, esto se determinó ya que las colonias crecieron aisladas y con características típicas (figura 12). Es importante señalar que las bacterias que presentan resistencia cruzada son aquellas que han desarrollado métodos de supervivencia eficaces frente a varios tipos de antimicrobianos con uno o varios mecanismos de acción similares.

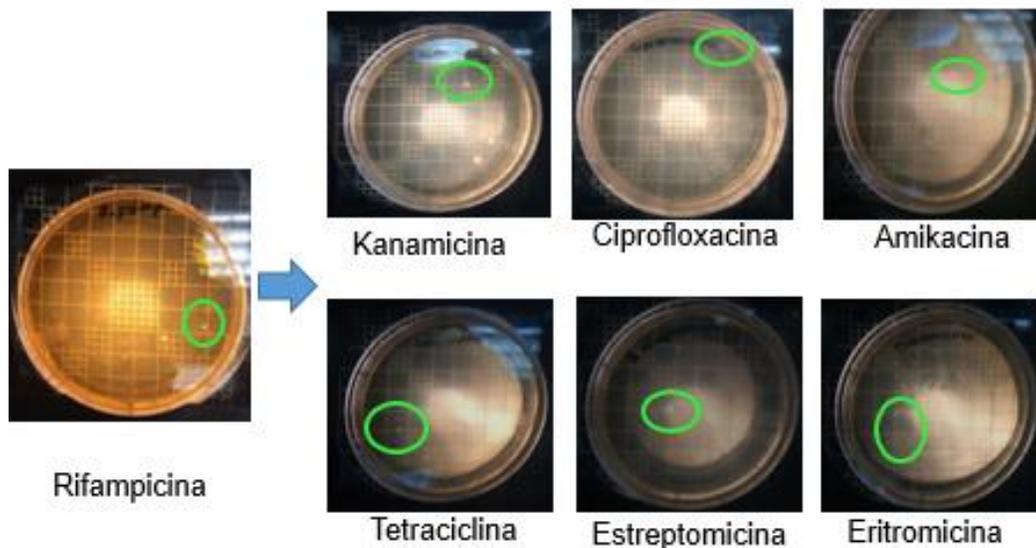


Figura 12. Mutación inducida a *Salmonella*

El mecanismo de resistencia frente a kanamicina se debe a enzimas modificadoras, las cuales pueden actuar en tres tipos de reacciones generales: N-acetilación (acetiltransferasas, ACC), O-adenililación (nucleotidiltransferasas, ANT) y O-fosforilación (fosfotrasferasas, APH), estas enzimas se encuentran en el espacio periplásmico y su función es interferir en la síntesis de proteína (Figura 13), específicamente en la subunidad ribosomal 30S (Fuchs y col., 2003).

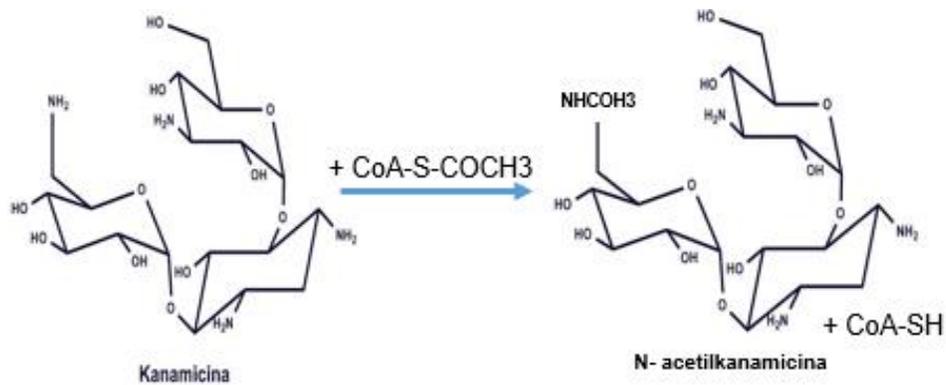


Figura 13. Mecanismo de resistencia de kanamicina.

Las mezclas se siguieron ensayando hasta lograr 2 grupos de cepas resistentes a 11 y 6 antibióticos. Se observó un crecimiento masivo debido a la dispersión que se genera por la misma cepa resistente. Por otro lado, este efecto también se debió a la dispersión de los genes, a través de elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) (Guilfoile, 2007). En algunos casos se identificaron cepas con aspecto rugoso y morfología diferente a *Salmonella*, esto se debe al estrés que sufren y a la adaptación frente nuevo medio de cultivo. Las cepas fueron confirmadas con pruebas bioquímicas y antisuero.

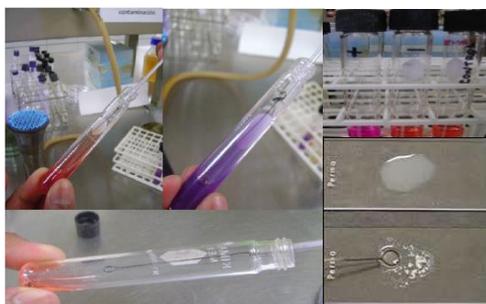


Figura 14. Pruebas bioquímicas y serología de *Salmonella*

Diversos estudios se han llevado a cabo con respecto a resistencia antibiótica, como el realizado en el año 2002, donde se investigó la resistencia antibiótica y líneas clonales del serogrupo B *Salmonella*, aisladas de pacientes con sospecha de padecer fiebre tifoidea en Accra, Ghana, utilizando técnicas moleculares como PCR y electroforesis en gel de agarosa (Mills-Robertson y col., 2002). En Reino Unido se examinaron 397 cepas de *Salmonella* de origen humano y animal que comprenden 35 serotipos, se analizó la especificidad que tienen algunos genes resistentes a antibióticos y la relación que tienen éstos con los integrones para crear el mecanismo de resistencia (P. Randall y col., 2002).

Para el año 2006 se estudiaron 147 cepas de *Salmonella* serotipificadas como Typhimurium procedentes de tres provincias españolas, esto para ver la resistencia que presentaban a antibióticos. Los distintos patrones de resistencia se determinaron por técnicas de biología molecular: RAPD y PFGE. Por RAPD se diferenciaron 36 patrones de bandas, y por PFGE 38. Se encontró una proporción alta de clones: el 27% de las cepas fueron idénticas por ambos métodos. Además, en cada área se encontraron algunos clones diferentes adicionales. Con PFGE se

obtuvo el mayor poder discriminatorio, pero el mayor grado de diversidad genética se observó usando ambas técnicas conjuntamente (Delgado y col., 2006).

5.6. Evaluación del comportamiento de cepas de *Salmonella* en suelos con humedades de 80%, 50% y 0%, aguas de irrigación y cilantro

Durante el estudio del comportamiento de los grupos de cepas en suelo con humedad de 80%, se observó que los tres grupos mostraron una disminución en su concentración en el día 2, esto pudo ser debido a la adaptación y al estado de estrés que presentaban. Las cepas multiresistentes a 11 antibióticos mostraron mayor crecimiento en las muestras de suelos (8.22 log CFU). De otra forma, a pesar que no se observó diferencia en el comportamiento general entre los 3 grupos de cepas, las cepas sensibles mostraron una disminución en su concentración a partir del día 10, donde los microorganismos de los otros dos grupos continuaban en la fase estacionaria (Figura 15).

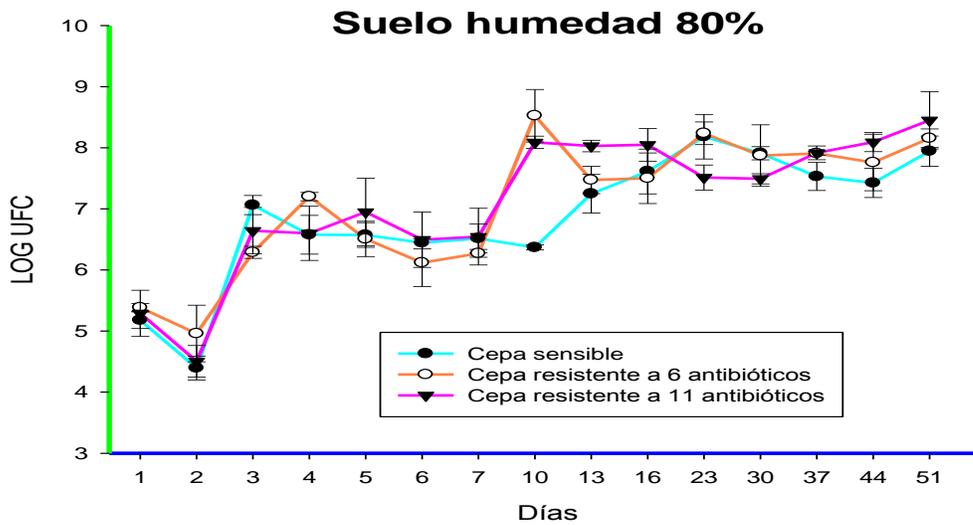


Figura 15. Comportamiento en suelo con humedad de 80%.

En el caso del comportamiento en suelo con 50% de humedad, se observó un crecimiento menor que en el estudio realizado en el suelo con 80% de humedad. Lo cual puede deberse a la materia orgánica presente.

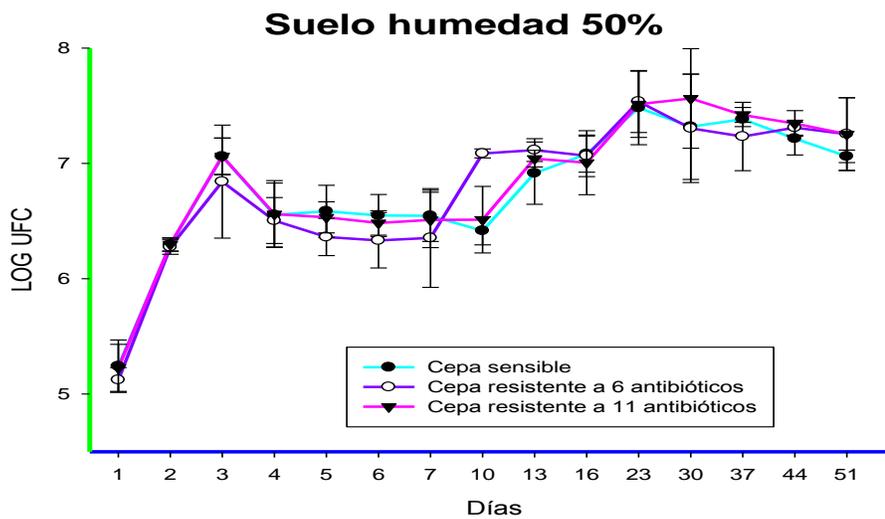


Figura 16. Comportamiento en suelo con humedad de 50%.

En el caso de las cepas inoculadas en agua de irrigación, el grupo resistente a 11 antibióticos mostró el mayor crecimiento durante el día 4 (6.62 log CFU).

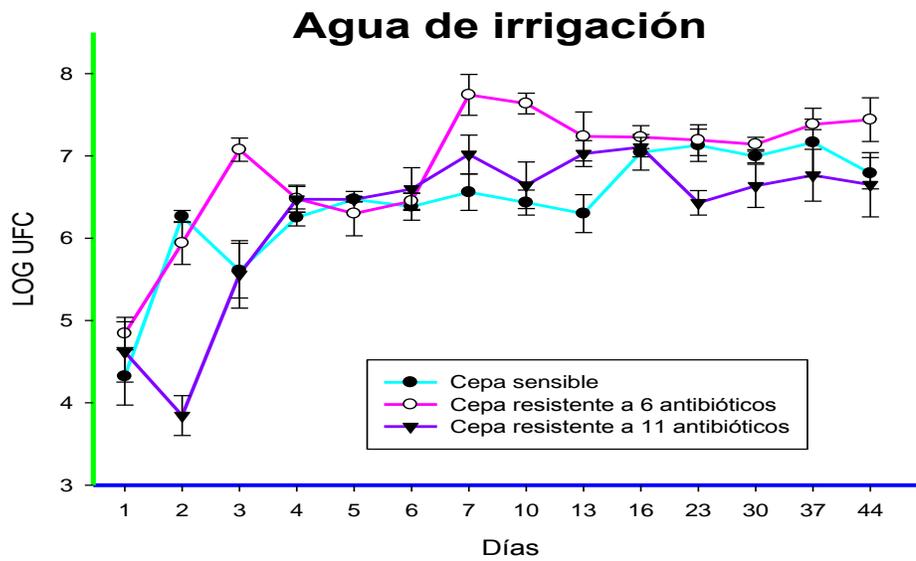


Figura 17. Comportamiento de *Salmonella* en agua de irrigación.

Más aún, se observó que durante la segunda semana este mismo grupo exhibió el mayor crecimiento de los tres grupos. En otro sentido, el grupo sensible presentó la fase de muerte a partir del día 10 (Figura 17). En este día, se observó crecimiento del grupo de cepas resistentes a 6 antibióticos.

Respecto al comportamiento de *Salmonella* en las muestras de cilantro, se observó una disminución en la concentración de microorganismos durante los siete días (Figura 18).

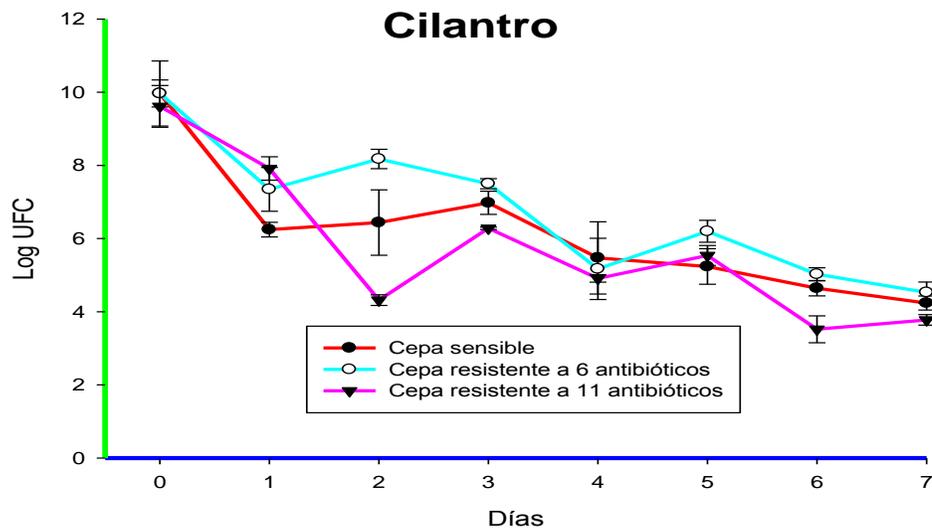


Figura 18. Comportamiento de *Salmonella* en cilantro

Estadísticamente solo se observa diferencia significativa en el día 2, pues hay aproximadamente 4 ciclos logarítmicos de diferencia entre los grupos resistente a 11 y 6 antibióticos. Respecto a los otros días se observa la misma tendencia en el comportamiento, independientemente que sean sensibles o resistente a 11 y 6 antibióticos. De igual manera el análisis de varianza muestra un valor de $P < 0.05$ en el día 2 (Figura 19).

Analysis of Variance (Spreadsheet1)								
Marked effects are significant at $p < .05000$								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	0.63810	2	0.31905	2.5033	6	0.41722	0.764704	0.506024
Dia 1	4.27702	2	2.13851	5.7494	6	0.95823	2.231721	0.188551
Dia 2	45.70149	2	22.85074	14.0528	6	2.34214	9.756371	0.013007
Dia 3	2.23926	2	1.11963	10.0603	6	1.67672	0.667750	0.547223
Dia 4	0.39738	2	0.19869	120.7862	6	20.13104	0.009870	0.990195
Dia 5	8.52014	2	4.26007	24.0258	6	4.00429	1.063876	0.402293
Dia 6	5.74151	2	2.87076	20.5430	6	3.42383	0.838463	0.477410
Dia 7	1.04339	2	0.52169	25.6965	6	4.28274	0.121813	0.887449

Figura 19. Análisis de varianza

En la siguiente grafica se puede observar de igual manera la misma tendencia en el comportamiento, no obstante el análisis estadístico nos arrojó diferencias significativas durante los días 1,3, 5 y 6, arrojando valores de P inferiores a 0.05 (Figura 21).

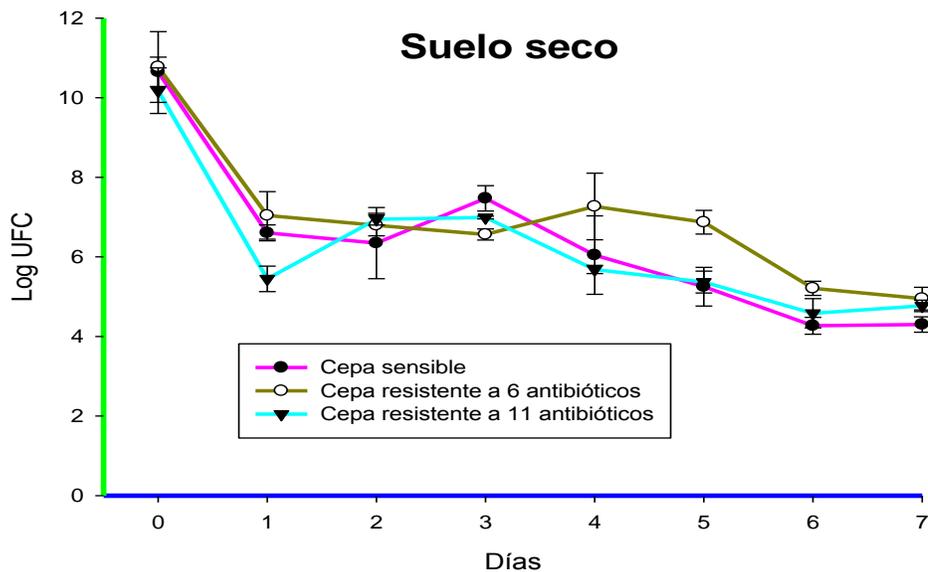


Figura 20. Comportamiento de *Salmonella* en suelo seco

Analysis of Variance (Spreadsheet1)								
Marked effects are significant at p < .05000								
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Dia 0	0.638096	2	0.319048	2.503305	6	0.417218	0.76470	0.506024
Dia 1	5.942390	2	2.971195	1.000566	6	0.166761	17.81709	0.002993
Dia 2	0.090399	2	0.045199	1.783546	6	0.297258	0.15205	0.862149
Dia 3	1.643517	2	0.821759	0.242592	6	0.040432	20.32449	0.002128
Dia 4	3.639627	2	1.819814	3.363861	6	0.560643	3.24594	0.110808
Dia 5	1.859834	2	0.929917	0.800798	6	0.133466	6.96743	0.027266
Dia 6	1.036974	2	0.518487	0.422267	6	0.070378	7.36719	0.024232
Dia 7	0.249730	2	0.124865	0.276827	6	0.046138	2.70634	0.145308

Figura 21. Análisis de varianza

De igual manera Youwen y col., 2006; realizaron un estudio de comparación de sobrevivencia de cepas de *Salmonella* multiresistentes y susceptibles en suelo, en dicha investigación no hubo deferencia significativa, puesto que los dos grupos presentaron un comportamiento similar. Años más tarde Hughes y col., 2010; realizaron un estudio comparando la sobrevivencia de cepas de *Salmonella* multiresistente a antibióticos y cepas susceptibles en carne cruda, dicho estudio se basó en analizar la reducción en la concentración de los dos grupos de cepas usando un antimicrobiano, los resultados mostraron el mismo comportamiento en respuesta a la acción antagonista del antimicrobiano que comúnmente es usado en carne. Recientemente D'Amico y col., 2014; inocularon y compararon el comportamiento de cepas multiresistentes y sensibles de *Salmonella* en la producción de queso gouda hecho con leche bronca, en general demostraron que las cepas multiresistentes no representan una mayor amenaza para la seguridad en este tipo de queso, pues el comportamiento resultó similar al de las cepas sensibles.

5.7. Relación filogenética mediante electroforesis en gel de campo pulsado

5.7.1. Estandarización

Se realizó la estandarización de la técnica siguiendo el protocolo de PulseNet 2013, con cepas de *Salmonella* aisladas de suelo, cilantro y nopal, así como también cepas de listeria como marcador negativo y el marcador de peso molecular correspondió a *Salmonella* Braenderup. En la siguiente figura se observa que dicho marcador va de 20.5 a 1135 kb.

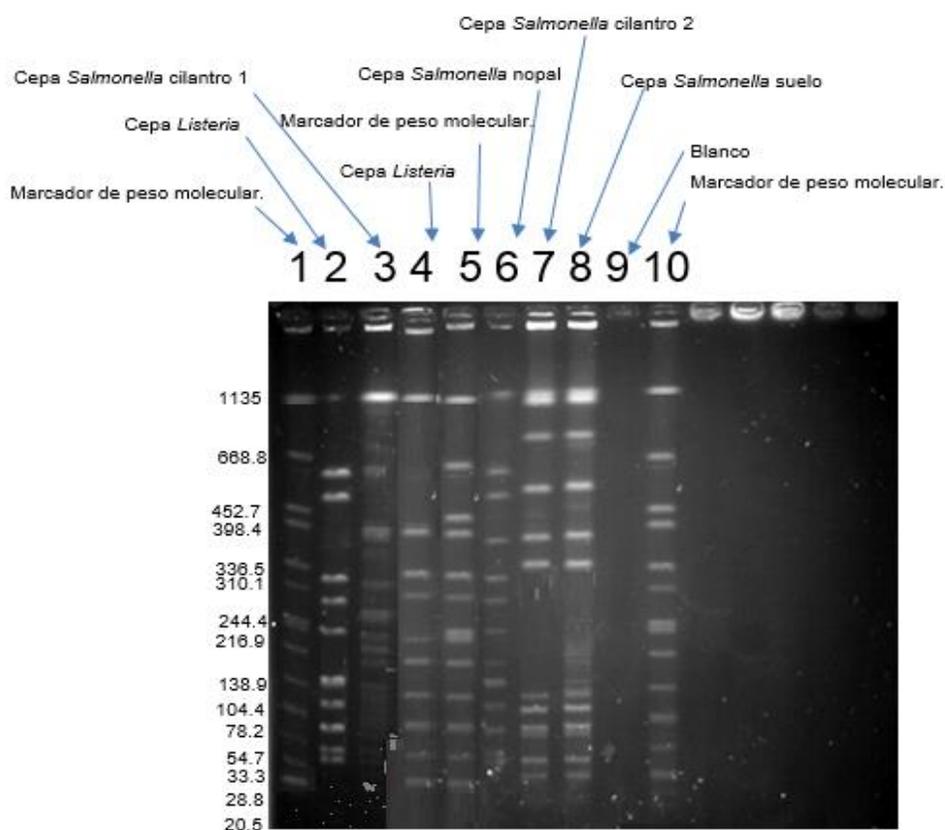


Figura 22. PFGE con *Salmonella* entérica, subespecie *enterica* serovariedad Braenderup ATCC BAA-664

Se pudo observar en el carril 7 y 8 que las bandas de adn son idénticas, solo con pequeñas discrepancias entre 104.4 y 216.9 kb, puesto que se observó un ligero barrido de banda, lo cual se pudo deber a la acción de la proteinasa K (falta de degradación de proteínas).

5.7.2. Análisis de muestras

Debido a que la técnica de campos pulsados es muy costosa y requiere de varios días, solo se realizaron 10 corridas en la cámara de electroforesis con 118 cepas resistentes (previamente seleccionadas de acuerdo a dendrogramas construidos) aisladas de las muestras analizadas (30 cepas aisladas de agua negra, 27 de suelo, 34 de carne, 12 de cilantro, 8 de zanahorias y 7 de nopales). Los resultados más relevantes se muestran en el siguiente dendrograma:

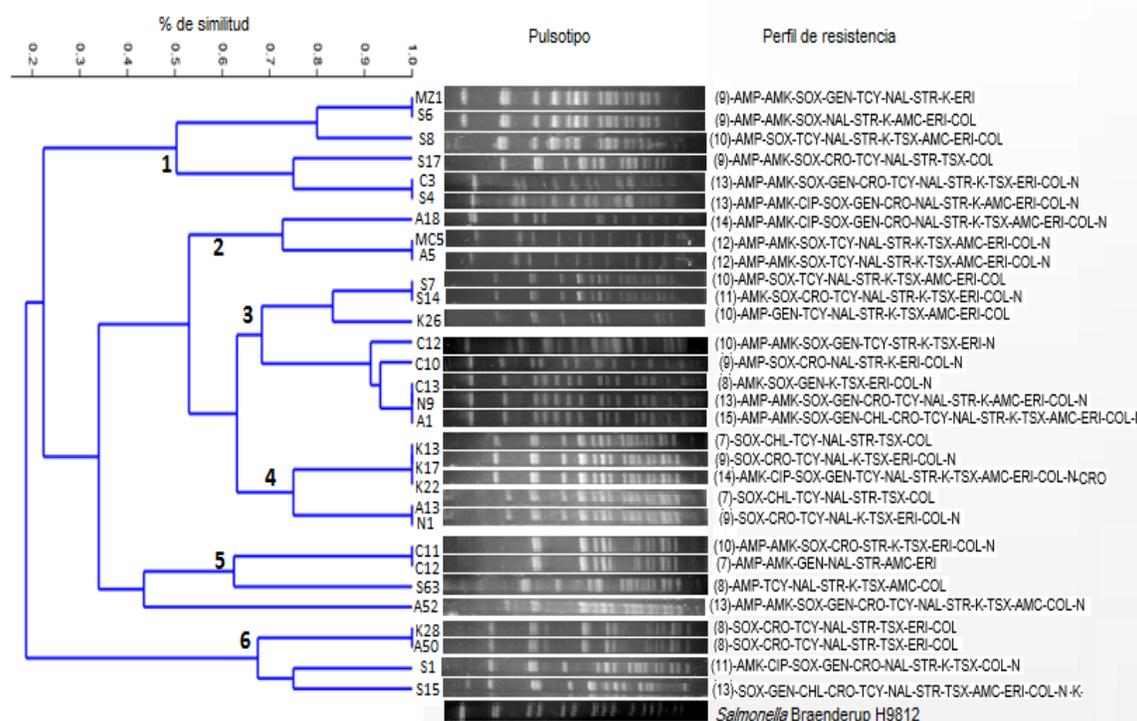


Figura 23. Dendrograma construido de acuerdo a patrones de PFGE.

La figura 23 muestra el dendrograma construido con las cepas de mayor porcentaje de similitud de acuerdo a los pulsotipos arrojados, se observaron 19 patrones de PFGE diferentes, es importante señalar que se encontraron clonas en las muestras analizadas, muestra de ello en el grupo 1 se encuentran dos clonas de *Salmonella* aislada de zanahorias y suelo colectadas en el valle del mezquital (MZ1 Y S6), cabe señalar que el muestreo se realizó en diferentes tiempos, lo cual indica la persistencia en el ambiente de esta cepa. Respecto al antibiograma ambas cepas presentaron resistencia a 9 antibióticos, pero con diferentes combinaciones, el mismo caso se presentó para las clonas aisladas de cilantro y suelo (C3 y S4). En contraste las clonas MC5 y A5 (aisladas de cilantro y agua del Valle del Mezquital) mostraron el mismo perfil de resistencia (AMP-AMK-SOX-TCY-NAL-STR-K-TSX-AMC-ERI-COL-N).

De igual manera se observó que el grupo 4 resultó ser el de mayor porcentaje de similitud (76%), dicho grupo se formó con las clonas aisladas de carnes, agua y nopal (K13, K17, K22, A13 y N1) y presentaron diferente combinación en los antibiogramas. Nuestros grupos construidos demuestran que las cepas analizadas pueden tener o no el mismo patrón de resistencia, sin embargo si una cepa sensible está en constante interacción con otra multiresistente la transferencia de genes resistentes se lleva mediante conjugación, transformación y transducción. Es por ello que el fin de construir los dendrogramas de acuerdo al perfil de resistencia es para seleccionar posibles clonas que mostraron el mismo patrón de resistencia.

De igual manera en el año 2009 Chien-Shun y col., también demostraron que las cepas con el mismo pulsotipo (clonas) pueden o no mostrar el mismo perfil de resistencia, esto debido a los plásmidos involucrados en la transferencia de los genes de resistencia.

En el grupo 6 de nuestro dendrograma se encontró que las cepas K28 y A50 mostraron el mismo patrón de FPGE, lo cual indica que esta carne colectada en Pachuca proviene del Valle del Mezquital, ya que la res pudo haber ingresado este microorganismo mediante la alimentación y fue durante el sacrificio donde se diseminó en el canal, cabe mencionar que dichas cepas también mostraron la misma resistencia a 8 antibióticos incluido ceftriaxona, lo cual resulta alarmante ya que la diseminación de estas cepas es un riesgo de salud pública. Las cepas C13, N9 Y A1 que formaron el grupo 3 también resultaron ser clonas, a pesar de tener diferentes perfiles de resistencia y de ser de regiones diferentes. Estos resultados indican que el origen de estas muestras fue el Valle del Mezquital, debido a la irrigación con aguas negras. De igual manera Zaidi B. y col., 2006 realizaron un rastreo de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos en casos clínicos y muestras de carnes crudas en Yucatán México, demostrando que algunas cepas de *Salmonella* aisladas de carnes crudas eran las mismas con las cepas aisladas de casos clínicos, puesto que mostraron el mismo pulsotipo en los geles de agarosa, y concluyeron que la transferencia de este microorganismo multiresistente a través de la cadena alimenticia es de gran preocupación, ya que las infecciones atribuidas a *Salmonella* han incrementado significativamente, tanto en incidencia como en severidad en los últimos años (Lertworapreecha y col., 2013), es por ello que sugieren la implementación de organismos encargados de monitorear la prevalencia

y resistencia a antibióticos de *Salmonella* en casos clínicos, carnes y alimentos para animales de abasto.

Años más tarde en Taiwan en el año 2009 se analizó la diseminación clonal de *Salmonella* entérica serovar *Braenderup* del serogrupo C1 resistente a múltiples fármacos, las cepas fueron colectadas de 19 centros médicos y hospitales distritales. Se compararon los resultados de la electroforesis en gel de campo pulsante y los perfiles de resistencia antibiótica de los casos clínicos mostrando las mismas bandas de ADN amplificadas (clonas) pero no todas las cepas que formaron los grupos clonales mostraron el mismo perfil de resistencias y se concluyó que los serogrupos B, C1, C2 y C3, D1 y E1 de *Salmonella* fueron los responsables del 95% de casos (N=8941) de salmonelosis (Chien-Shun y col., 2009).

En el año 2005 en Brasil fue realizado un estudio de clonalidad y resistencia antibiótica de *Salmonella* entérica serovar *Infantis* aislados de cuatro hospitales públicos en Río de Janeiro. En este estudio, 35 cepas de serovar *Infantis*, aisladas de niños se caracterizaron por electroforesis en gel de campo pulsado y se realizaron antibiogramas con fin de determinar la relación existente con ambos métodos y determinar el gen causante de la resistencia antibiótica. Dicha investigación concluyó que los genes *bla_{TEM}*, *catI*, *ant(3'')Ia*, y *ant(3'')Ib*, fueron los responsables de la resistencia de dichas cepas, además la electroforesis indicó que 33 de las 35 cepas analizadas provienen de un mismo linaje genético, es por ello que Fonseca y col., 2006 mencionan que es de suma importancia la existencia de programas de vigilancia epidemiológica y procedimientos efectivos de desinfección para la prevención de brotes nosocomiales causados por cepas multiresistentes.

Por todo lo anterior nuestros resultados sugieren fuertemente que la hipótesis planteada en un principio puede ser correcta, ya que se demostró mediante campos pulsados la existencia de clonas presentes en agua negra, suelo, cilantro, zanahorias y carne. Siendo las aguas negras las que están propiciando la aparición de cepas de *Salmonella* resistentes en la cadena alimentaria mediante la irrigación de los campos agrícolas, sin embargo no todas las cepas aisladas en alimentos mostraron relación con las cepas aisladas de suelo y agua negra, lo cual indica que no todos los productos que vienen de la región del Valle del Mezquital están contaminados, o no todos provienen de dicha zona, es por ellos que las causas de contaminación de estos productos con *Salmonella* pueden deberse a la contaminación cruzada (transporte, manipulación, empaque, etc.)

Es importante señalar la importancia de implementar medidas correctivas, como el uso de aguas tratadas para frenar la problemática que existe con patógenos mutiresistentes a antibióticos, metales pesados, antibióticos, pesticidas y todos aquellos agentes contaminantes que deterioran la salud del ser humano. En la actualidad se cuenta con una planta tratadora de aguas negras en la región de Atotonilco de tula, la cual está a punto de operar, tendrá una capacidad para tratar 23 metros cúbicos por segundos (mediante proceso convencional) y un módulo adicional (mediante proceso físico-químico) para tratar 12 metros cúbicos por segundo en época de lluvia. Sin embargo no sabemos cuál será el impacto que esto ocasione, ya que dicha agua tendrá un costo para los agricultores, es por ello que no sabemos qué sucederá con esta región que por años ha sido una zona productiva de recursos agrícolas para el estado de Hidalgo.

5.8 Perfiles de resistencia de los extractos de Jamaica frente a las cepas de *Salmonella* multiresistentes aisladas de zanahorias

Nuestros resultados mostraron que todas las cepas de *Salmonella* multiresistentes aisladas de zanahorias fueron sensibles a los cuatro extractos utilizados (Tabla 9). El mayor efecto inhibitorio fue mostrado por el extracto con metanol y el más bajo se observó en el extracto acuoso.

Tabla 9. Diámetros de halos de inhibición de extractos de cáliz de jamaica con cuatro solventes frente a cepas de *Salmonella* multiresistentes a antibióticos

Código de cepa	Serotipo	Ciprofloxacina ¹	Extractos			
			Agua	Acetato de etilo	Metanol	Acetona
Z1	S. Typhimurium	20 ± 0.2*	10 ± 0.4	10 ± 0.4	12 ± 0.2	14 ± 0.2
Z2	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.6	10 ± 0.6	12 ± 0.4	15 ± 0.4
Z3	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.6	12 ± 0.6	12 ± 0.2	13 ± 0.2
Z4	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.6	10 ± 0.4	12 ± 0.2	14 ± 0.4
Z5	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.8	11 ± 0.8	12 ± 0.3	15 ± 0.2
Z6	S. Montevideo	20 ± 0.2	10 ± 0.5	10 ± 0.6	13 ± 0.2	15 ± 0.2
Z7	S. Gaminara	20 ± 0.3	10 ± 1.0	12 ± 1.0	12 ± 0.2	13 ± 0.2
Z8	S. Typhi	20 ± 0.2	10 ± 0.4	10 ± 0.4	13 ± 0.2	13 ± 0.2
Z9	S. Typhimurium	20 ± 0.1	10 ± 0.8	10 ± 0.8	11 ± 0.2	15 ± 0.4
Z10	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.4	10 ± 0.4	10 ± 0.2	15 ± 0.2
Z11	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.6	10 ± 0.6	12 ± 0.2	13 ± 0.2

Z12	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.8	11 ± 0.8	12 ± 0.3	14 ± 0.4
Z13	S. Typhimurium	20 ± 0.2	10 ± 0.8	10 ± 0.8	11 ± 0.4	14 ± 0.2

¹control positivo, *Media en mm ± SD de cuatro replicas

La actividad antimicrobiana de los cálices de jamaica se ha atribuido a compuestos como el ácido protocatecuico y antocianinas (Liu y col., 2005; Hatil y Moneer 2006; Kang y col., 2007; Olaleye, 2007; Wong y col., 2010), pero ninguna investigación publicada tiene aún identificado los compuestos específicos responsables de esta actividad.

Los presentes resultados coinciden con los reportados anteriormente por nuestro grupo de investigación en la evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de diferentes genotipos de *Hibisco* contra cepas de *S. typhimurium* y *S. Choleraesuis* sensibles los antibióticos (Morales-Cabrera y col., 2013). Esto sugiere que los compuestos con actividad antimicrobiana en los cálices de jamaica constituyen una alternativa potencial para el control de bacterias mutiresistentes a antibióticos tales como *Salmonella*, la cual que está presente en alimentos y fuentes ambientales.

6. Conclusiones

1. Se registró una alta prevalencia (32%) de *Salmonella* en las muestras de alimentos, sin embargo las muestras de suelo y aguas de irrigación presentaron una mayor prevalencia (54% y 64.5% respectivamente).
2. Se aislaron cepas de *Salmonella* multiresistentes a los antibióticos, todas presentaron resistencia a por lo menos a dos antibióticos, dos cepas aisladas de carnes fueron multiresistentes a 16 antibióticos. Ciprofloxacina, ceftriaxona y cloranfenicol fueron los antibióticos más eficientes, en contraste estreptomomicina y ampicilina no presentaron una inhibición eficaz sobre este microorganismo.
3. Se encontró un porcentaje elevado de similitud (100%) de acuerdo al perfil de resistencia entre cepas de *Salmonella* aisladas de suelos, aguas de irrigación y alimentos.
4. Se obtuvieron cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos por mutación (inducida) al azar.
5. Se presentó resistencia cruzada a 5 antibióticos al ejercer presión selectiva mediante kanamicina, para la construcción de *Salmonella* mutiresistente.
6. En general no se observó diferencia significativa en el comportamiento de los tres grupos de cepas en suelo de cultivo, aguas negras y cilantro.
7. Se observó relación clonal entre las cepas aisladas de suelo, aguas negras, cilantro, carne y nopales, lo cual sugiere un mismo origen o fuente de contaminación.

8. Desafortunadamente no se tuvo acceso a casos clínicos para sugerir que los casos reportados en las institución de salud de la ciudad de Pachuca son originados por clonas de *Salmonella* presentes en las muestras de agua de irrigación y alimentos analizados.
9. Los extractos de cálices de Jamaica con metanol ejercieron mayor poder antimicrobiano (sobre las cepas resistentes aisladas de zanahoria en comparación con los extractos con acetona, acetato de etilo y agua, lo cual sugiere que los compuestos con actividad antimicrobiana de estos cálices constituyen una alternativa para prevenir y mitigar daños a la salud causados por cepas multiresistentes.

7. Recomendaciones

Es evidente que el uso de aguas negras para la irrigación de los cultivos detona un problema de contaminación microbiológica en la cadena alimentaria, además de otros contaminantes como metales pesados, pesticidas y antibióticos. Con este trabajo demostramos la importancia que tiene las investigaciones enfocadas en microbiología ambiental, ya que pudimos observar la alta incidencia de *Salmonella* resistente a antibióticos en las muestras analizadas, además confirmamos nuestra hipótesis que es el Valle del Mezquital donde empieza esta diseminación. Con esto podemos sugerir medidas preventivas y correctivas para poder controlar este problema de salud pública y ambiental, involucrando al sector social, político y de salud para que en conjunto se lleve a cabo una vigilancia y seguimiento de buenas prácticas de higiene durante toda la cadena de producción de alimentos, esto para garantizar la buena calidad sanitaria de los productos que se producen y venden en el Estado de Hidalgo. Es importante también concientizar a la población de la severidad que implica el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica agropecuaria y médica, esto se puede lograr mediante campañas que difundan la información de manera objetiva. A continuación se presentan algunos puntos que se deben de abordar y ejecutar:

- ✓ Seguimiento continuo y meticuloso de las resistencias bacterianas.
- ✓ Implantación de políticas sanitarias que establezcan protocolos de actuación
- ✓ Adaptar la prescripción a la patología médica

- ✓ Integrar a la industria farmacéutica en las políticas de lucha contra la resistencia bacteriana
- ✓ Información y formación de la opinión pública
- ✓ Formación de comités antibióticos
- ✓ Prohibir el uso de antibióticos para la engorda de animales de abasto

Es de gran importancia que se actué y se haga algo al respecto, como lo hacen países europeos, ya que esta grave amenaza es ya una realidad que puede afectar a cualquier persona. Actualmente la OMS considera que el mundo avanza a una era postantibiótica, en donde las enfermedades menores y comunes volverán a ser potencialmente mortales como lo fueron hace años, debido a la multiresistencia.

Esta investigación también sugiere la evaluación del efecto del extracto de jamaica sobre otras bacterias involucradas con infecciones de origen alimentario, tales como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni* sobre zanahoria cruda y otros vegetales, para que se implemente su uso como agente desinfectante en frutas y hortalizas, así como también para tratar y prevenir infecciones en humanos y animales.

8. Bibliografía

1. Abakpa, G. O., Umoh, V. J., Ameh, J. B., Yakubu, S. E., Kwaga, J. K. P., Kamaruzaman, S.. 2015. Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolated from fresh produce and environmental samples. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. Vol. 3; 38–46.
2. Aijaz Hussain Soomro,, Muhammad Khaskheli, Muhammad Bachal Bhutto, Ghiasuddin Shah, Azizullah Memon, Parkash Dewani. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from poultry meat in Hyderabad, Pakistan. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. Vol. 34(5); 455-460.
3. Alberts Bruce, Bray Dennis. *Introducción a la biología celular*. 2ª edición. Ed. Medica Panamericana Buenos Aires. Año 2006. 864 pp.
4. Ali Akbar, Anil Kumar Anal. 2013. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. *Asian Pac J Trop Biomed*. Vol 3(2): 168-168.
5. AL-Jaboobi Muamar, Bouksaim Mohammed, M'hamed Tijane and Shawqi EL-Ariqi. 2013. Agricultural Quality Evaluation of Wastewater, Used in Yemen Vegetables Production. *Middle-East Journal of Scientific Research*. Vol. 16 (5); 667-677.
6. Ángel gil. *Tratado de nutrición* 2ª edición. Ed. Medica panamericana 2010. Madrid 786 pp.
7. Aquino D. Y. y A. León C. (2001) Efecto de la jamaica en enfermedades cardiovasculares. *Conexión Sur* 1:7-9
8. Armendáriz Sanz José Luis. *Seguridad e higiene en la manipulación de alimentos* 2010. 4ª Edición. Ed. Paraninfo. España. 137pp.
9. Armstrong, J. L., D. S. Shigeno, J. J. Calomiris, and R. J. Seidler. 1981. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*42:277–283.
10. Aurelio Mendoza Medellín. 2001 *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. Vol. 54 (1); 18-27.
11. Ausina Ruiz Vicente., Moreno Guillén Santiago. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Ed. Médica panamericana. Año 2005. España. 1597 pp.

12. Akter S., Rafiq-Un-Nabi, F. Ahmed Rupa, Md. L. Bari and M. A. Hossain. 2011. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles in Bacteria Isolated from Market-Fresh Vegetables. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 1: 140-149,
13. B.R. Singh, Preetam Singh, Sugandh Agrawal, Uvs Teotia, Anita Verma, Shipra Sharma, Mudit Chandra, N. Babu, and Ravi Kant Agarwal. 2007. Prevalence of Multidrug Resistant Salmonella in Coriander, Mint, Carrot, and Radish in Bareilly and Kanpur, Northern India. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE.* Vol. 4(2). 233- 240
14. Bauer A W., Kirby W M., Sherris J C., Turck M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* Vol. 45 (4): 493-6.
15. Bello Pérez Luis Arturo., Abarca Mateos Claudia. 1991. Incidencia de *Salmonella* en chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero. *Salud Pública México.* Vol. 33(2):178-183
16. Bhatia, J. K., Mathur, A. D., Arora, M. M. 2007. Reemergence of chloramphenicol sensitivity in enteric fever
17. Blanc-Potard A.B., F. Solomon, J. Kayser & E.A. Groisman.. The SPI-3 pathogenicity of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 1999: Vol.181:998-1004.
18. Boonmar, Sumalee, Morita, Yukio Pulsrikarn, Chaiwat Chaichana, Phattharaphron Pornruagwong, Srirat Chaunchom, Sujate Sychanh, Thongsay Khounsy, Thongdam Sisavath, Davanh Yamamoto, Shigeki Sato, Hiroshi
19. Brahim Bouchrif, Bianca Paglietti, Manuela Murguia, Andrea Piana, Nozha Cohen, Moulay Mustapha Ennaji, Salvatore Rubino, Mohammed Timinouni. 2009. Prevalence and antibiotic-resistance of salmonella isolated from food in morocco. *Journal Infection Developing Contries.* Vol: 3: 35-40.
20. Caballero Torres Ángel E. Tema de higiene de los alimentos. La habana 2008. Ed. Ciencias médicas. 382pp.
21. Cabrera-Diaz, Elisa; Barbosa-Cardenas, Claudia M; Perez-Montaña, Julia A; Gonzalez-Aguilar, Delia; Pacheco-Gallardo, Carlos; Barba, Jeannette. 2013. Occurrence, Serotype Diversity, and Antimicrobial Resistance of Salmonella in Ground Beef at Retail Stores in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection.* Vol.76 (12). 2004-10.
22. Cameán Ana María, Manuel Repetto. Toxicología alimentaria. Ed. Díaz de Santos. Madrid. Año 2012.
23. Carlos G. Malbrán. 2001. Manual de Procedimientos Para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Instituto

Nacional de Enfermedades Infecciosas Departamento Bacteriología Servicio Antimicrobianos Buenos Aires, Argentina.

24. Castro-Rosas, J. and Escartín, E.F. 1999. Incidence and germicide sensitivity of *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae* O1 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Safety*. 19: 137-146.

25. Chávez De la Peña Ma. Eugenia., Higuera-Iglesias Anjarath L., Huertas-Jiménez Martha A., Báez-Martínez Rosa., Morales-de León Josefina., Arteaga-Cabello Fernando., Rangel-Frausto Sigfrido., Ponce de León-Rosales Samuel. . 2001. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud pública México*. Vol.43 (3).

26. Chen S, Yee M, Griffiths C, Larkin C, Yamashiro R. 1997. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int J Food Microbiol.*: Vol.35:239-50.

27. Chien-Shun. Chiou, Jui-Ming Lin, Cheng-Hsun Chiu, Chi-Hong Chu, Shu-Wun Chen, Yung-Fu Chang, Bor-Chun Weng, Jwu-Guh Tsay, Chyi-Liang Chen, Chien-Hsing Liu and Chishih Chu. 2009 Clonal dissemination of the multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Braenderup, but not the serovar Bareilly, of prevalent serogroup C1 *Salmonella* from Taiwan. *BMC Microbiology*; 9:264

28. Chuanwu Xi., Yongli Zhang., Carl F. Marrs., Wen Ye., Carl Simon Betsy Foxman and Jerome Nriagu. 2009. Prevalence of Antibiotic Resistance in Drinking Water Treatment and Distribution Systems. *Applied and Environmental microbiology*. p. 5714–5718.

29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Consultado el 23/04/2014. Disponible en: <http://clsi.org/blog/2011/11/11/clsi-publishes-a-guideline-on-methods-for-antimicrobial-susceptibility-testing-for-human-mycoplasmas-m43/>

30. CNN México consultado el 05/17/2015 disponible en: <http://mexico.cnn.com/nacional/2012/05/02/salmonela-y-estafilococo-causa-de-intoxicacion-de-317-ninos-en-guerrero>

31. Cruz-Gálvez, A.M., Gómez-Aldapa, C.A., Villagómez-Ibarra, J.R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Baños, J., Rangel-Vargas, E. and Castro-Rosas, J. 2013. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies *in vitro* and in raw beef. *Food Control*. 32, 289-295.

32. Dallal, M.M.S., Doyle, M.P., Sanaei, M., Modarresi, S., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M.R. and Sharifi-Yazdi, M.K. 2010. Prevalence and antimicrobial

resistance profile of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food control* 21, 388-392.

33. D'Amico DJ, Druart MJ, Donnelly CW. 2014. Comparing the behavior of multidrug-resistant and pansusceptible during the production and aging of a Gouda cheese manufactured from raw milk. *J Food Prot.*;77 (6):903-13.

34. De Ahumada Vázquez Ignacio., Santana Falcon Luisa., Serrano Molina José. *Farmacología práctica*. Ed. Díaz de Santos. Madrid España. Año 2002.

35. Delgado N. Ronda, J.L. Muñoz Bellido, M.I. García García, R. Ibáñez Pérez, S. Muñoz Criado, R. Serrano Heranz, M.C. Sáenz González and J.A. García Rodríguez. 2006. Molecular epidemiology of drug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Spain. *Rev Esp Quimioterap*. Vol. 19 (2): 152-160

36. Duffy E. A., Lucia L. M., Kells J. M., Castillo A., Pillai S. D., and Acuff. G. 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Profiling of *Salmonella* Isolated from Irrigation Water, Packing Shed Equipment, and Fresh Produce in Texas. *Journal of Food Protection*,: Vol. 68 (1), 70–79.

37. Ejeta, G., Molla, B., Alemayehu, D. and Muckle, A. 2004. *Salmonella* serotypes isolated from minced meat beef, mutton and pork in Addis Ababa, Ethiopia. *Revue Méd. Vét* 155(11), 547-551.

38. El independiente 2015 consultado el 10/08/2015 Disponible en: <http://www.elindependientedehidalgo.com.mx/hemeroteca/2012/07/52547>

39. El universal 2011 Consultado el 03/11/2014 Disponible en: <http://archivo.eluniversal.com.mx/notas/789864.html>

40. FAO 2004. Roma 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Producción y sanidad animal, consultado el 01/08/2015 Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>

41. Fao 2015 Documento consultado el 01/09/2015 Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y8705s.pdf>

42. Fernández, E. E. *Microbiología de los alimentos*. Universidad Autónoma de Queretaro. México. 2000.

43. Fonseca E. L., Mykytczuk O. L., M. D. Asensi, E. M. F. Reis, L. R. Ferraz, F. L. Paula, L. K. Ng, and D. P. Rodrigues. 2006. Clonality and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Multidrug- Resistant *Salmonella enterica* Serovar Infantis Isolates from Four Public Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*; 2767–2772.

44. Forrest A, Thomas JK, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballow CH. 1998. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with development of bacteria resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*; 8;42:521-7.
45. Forbes A. Betty., F. Sahm Daniel., S. Weissfeld Alice. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica panamericana. Año 2009. Buenos Aires Argentina. 1026 pp.
46. Fortuna Jorge Luiz, Elmiro Rosendo do Nascimento, Robson Maia Franco. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. strains isolated from hamburgers. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 6 (49); 7525-7533.
47. Fuchs Lidia Yolanda, M.C., Ph. D; Chihu Lilia, Biol; Conde Carmen, M. en C.; González Víctor Manuel, M. en C., Noguez Abimael Humberto, Quim.; Calderón Ernesto, M.C., M.S.P.; Avonce Nelson, Biol., César Ovando, M. en C. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana *Salud Pública de México*, vol. 36 (4); 428-438.
48. FULLERTON, M., KHATIWADA, J., JOHNSON, J.U., DAVIS, S. and WILLIAMS, L.L. 2010. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. *J. Med. Food*. 14,950-956.
49. Garcia Ortiz Francisco, García Ortiz Pedro Pablo, Muela Mario Gil. Hostelería. Técnicas de servicio y atención al cliente. 2ª edición Ed. Parainfo, S.A.España Año 2009. 214pp.
50. Garcia-Villanova Ruiz, B., Galvez Vargas, R. Garcia-Villanova, R. 1987-. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 4(4): 285-291.
51. Guilfoile PG. 2007. Antibiotic-resistant bacteria. Deadly diseases and epidemics series. 1st ed. New York: Chelsea House publications; 2007.
52. Gutiérrez-Cogco Lucina., Montiel-Vázquez Edith., Aguilera-Pérez Pablo., González-Andrade María del Carmen. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública Méx*. Vol. 42(6):490-495
53. Hatil, H.E.K. and Moneer. F.M. 2006. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Acacia seyal* var. *seyal* and *Sphaeranthus suaveolens* var. *suaveolens* against upper respiratory tract pathogens. *Sud J. Med. Sci*. 1, 121-126.

54. Hao Van Thi Thu, George Moutafis, Taghrid Istivan, Linh Thuoc Tran, and Peter J. Coloe. 2007. Detection of *Salmonella* spp. in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Vol. 73 (21); 6885–6890.
55. Huss, H. H. Aseguramientos de la calidad de productos pesqueros 1999. Documento técnico de pesca. No. 334. Roma, FAO. 1997. 174p. Consultado el 19/10/2014. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/T1768S/T1768S00.HTM>
56. Hughes MK, Yanamala S, San Francisco M, Loneragan GH, Miller MF, Brashears MM. 2010. Reduction of multidrug-resistant and drug-susceptible *Salmonella* in ground beef and freshly harvested beef briskets after exposure to commonly used industry antimicrobial interventions. *J Food Prot.*; 73(7):1231-7.
57. Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi IS, Song CS, Park C, Seo KH. 2011. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. *J Food Prot.*
58. IAOM 2015. Sanidad e inocuidad alimentaria. Documento consultado el 10/07/2015 Disponible en <http://www.iaom.info/content/wp-content/uploads/Importancia-de-Seg-e-Inocuidad-Alim-en-el-Molino-revision-1.pdf>
59. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2013 Consultado el 07/04/2015. Disponible en: <http://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/medicamentos-en-salud-publica/investigacion/resistencia-antimicrobiana.html>
60. Ishioka, Taisei Noda, Masahiro Kozawa, Kuniyoshi Kimura, Hirokazu. 2013. *Salmonella* prevalence in meat at retail markets in Pakse, Champasak Province, Laos, and antimicrobial susceptibility of isolates. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Vol 1(3). 157-161.
61. J. Puerta Concepción, P. Urueña Claudia. *Prácticas de biología molecular*. Ed. Pontificia Universidad Javeriana.
62. Jean-Gilles Beaubrun, J. Ewing, L. Jarvis, K. Dudley, K. Grim, C. Gopinath, G. Flamer, M. L. Auguste, W. Jayaram, A. Elmore, J. Lamont, M. McGrath, T. Hanes, D. E. 2014. Comparison of a PCR serotyping assay, Check&Trace assay for *Salmonella*, and Luminex *Salmonella* serotyping assay for the characterization of *Salmonella enterica* identified from fresh and naturally contaminated cilantro. *Food Microbiology*. Vol. 42; 181-187.
63. Kalsoom Farzana., Saeed Akhtar and F. Jabeen. 2009. Prevalence and antibiotic resistance of bacteria in two ethnic milk based products. *Pak. J. Bot.*, 41(2): 935-943.
64. Kang, P.S., Seok, J. H., Kim, Y. M. Eun, J. S. and OH, S. H. 2007. Antimicrobial

and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation. Food Sci. Biotechnol. 16, 409-414.

65. Kevin Holvoet, ImcaSampers , Benedicte Callens , Jeroen Dewulf , Mieke Uyttendaele. 2013. Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 79 (21); 6677-6683.

66. Koneman Elmer., Allen Stephen. Diagnostico microbiológico Texto y atlas a color. 6ª Edición Ed. Médica Panamericana. Año 2008. Argentina 1696pp.

67. Koolman Jan, Röhm Klaus- Heinrich. Bioquímica: texto y atlas. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Año 2004. Madrid. 492 pp.

68. Kusumaningrum, H. D., Suliantari and Dewanti-Hariyadi, R. 2012. Multidrug resistance among different serotypes of Salmonella isolates from fresh products in Indonesia. International Food Research Journal. Vol 19 (1): 57-63.

69. Lateef A., J. K. Oloke and E. B. Gueguimkana. 2005. The prevalence of bacterial resistance in clinical, food, water and some environmental samples in southwest Nigeria. Environmental Monitoring and Assessment 100: 59–69.

70. Li YC, Pan ZM, Kang XL, Geng SZ, Liu ZY, Cai YQ, Jiao XA. 2014. Prevalence, characteristics, and antimicrobial resistance patterns of Salmonella in retail pork in Jiangsu province, eastern China. J Food Prot. Vol. 77

71. Lin T. L., H. Lin H., Ch. Chen Ch., Ch. Lin M., Ch. Chou M. and J. Wang Ch. (2007) Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. Nutrition Research 27:140-145.

72. Liu, K. S., Tsa, S.M., and Yin, M.C. 2005. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. Phytother Res. 19, 942-945.

73. Livermore DM. Mechanisms of resistance of beta-lactam antibiotics. Scand J infect Dis. 1991:78: 7-16.

74. López Cuevas Osvaldo, León Félix Josefina, Jiménez Edeza Maribel, Chaidez Quiroz Cristóbal. 2009. DETECCIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE Escherichia coli Y Salmonella EN AGUA Y SUELO AGRÍCOLA. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 32 (2); 119-126.

75. M.-S. Kim, T.-H. Lim, J.-H. Jang, D.-H. Lee, B.-Y. Kim, J.-H. Kwon, S.-W. Choi, J.-Y. Noh, Y.-H. Hong, S.-B. Lee, S.-Y. Yang, H.-J. Lee, J.-B. Lee, S.-Y. Park, I.-S. Choi, and C.-S. Song. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella

species isolated from chicken meats produced by different integrated broiler operations in Korea. *Poultry Science*. Vol: 91:2370–2375.

76. Marcus Ho Yin Wong, Li Zeng, Jian Hua Liu, and Sheng Chen. 2013. Characterization of *Salmonella* Food Isolates with Concurrent Resistance to Ceftriaxone and Ciprofloxacin. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*;10(1);42-46. *Medical Journal Armed Forces India*. Vol. 63(3); 212-214.

77. Meher Nigad, Nipa., Reaz Mohammad, Mazumdar., Md. Mahmudul, Hasan., Md. Fakruddin., Saiful, Islam., Habibur R. Bhuiyan and Asif Iqbal. 2011. Prevalence of Multi Drug Resistant Bacteria on Raw Salad Vegetables Sold in Major Markets of Chittagong City, Bangladesh. *Middle-East Journal of Scientific Research*. Vol.10 (1): 70-77.

78. Melloul A. Ait and Hassani L. 1999. *Salmonella* infection in children from the wastewater-spreading zone of Marrakesh city (Morocco). *Journal of Applied Microbiology* Vol. 87(4); 536–539.

79. Mills-Robertson F. Crupper S.S., Addy M.E. and Mensah P. 2003. Antibiotic resistance and genotyping of clinical group B *Salmonella* isolated in Accra, Ghana. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 94, 289–294.

80. Miranda J. M., Mondragon A. C., Martinez B., Guarddon M., and Rodriguez J. A. 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. *Journal of Food Protection* 72 (5), 966–971.

81. Molina López José, Manjarrez Zavala María Eugenia y Tay Zavala Jorge. *Microbiología Bacteriología y virología*. 1ª Edición. Ed. Méndez Editores Año 2010. México, D.F. 912 pp.

82. Monthon Lertworapreecha, Suparat Sutthimusik, and Kumchai Tontikapong. 2012. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated From Pork, Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 6(1): 36-41

83. Morales-C, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Salinas-Moreno, Y., Soto-Rojas, I. and Jastro-Rosas, J. 2013. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *J. Med. Plan. Res*. 7(31), 2319-2322

84. Mrema, Neema, Mpuchane, Sisai, Gashe, Berhanu A. 2006. Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. *Food Control*. Vol. 17 (3); 207-212.

85. Murali Dharan. *Control de calidad de los laboratorios clínicos*. Ed. Reverté. España. Año 2002. 315 pp.

86. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.

87. Nunes Medeiros Marcelo Augusto; Nunes de Oliveira Diana Carmem; dos Prazeres Rodrigues Dália; Coradi de Freitas Daniel Roberto. 2011. Rev Panam Salud Publica vol.30 (6)

88. OMS 2015. Resistencia a antibióticos. Consultado el 06/07/15 Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

89. Olaleye, M.T. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. J. Med. Plan. Res. 1, 9-13.

90. Ortíz-marquéz, S. 2008. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de Jamaica cultivada en el estado Monagas. Tecnología y pensamiento, 3 (1-2): 61-75.

91. Pan F, Li X, Carabez J, Ragosta G, Fernandez KL, Wang E, Thiptara A, Antaki E, Atwill ER. 2015. Cross-sectional survey of indicator and pathogenic bacteria on vegetables sold from asian vendors at farmers' markets in northern california. J Food Prot. Vol. 78(3). 602-8.

92. Parrilla-Cerrillo María Cristina, Vázquez-Castellanos J. Luis, Saldate-Castañeda E. Ofelia, Luz María Nava-Fernández. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública Méx. Vol. 35(5):456-463.

93. Pascual Anderson María del Rosario, Calderón Pascual Vicente. Microbiología alimentaria Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Edición. Ed. Díaz de Santos. Año 2000. España. 417 pp.

94. Paul D. Fey, Thomas J. Safranek, Mark E. Rupp, Eileen F. Dunne, Efrain Ribot. 2000. Ceftriaxone-Resistant Salmonella Infection Acquired by a Child from Cattle. N Engl J Med. Vol. 342 (17). 1242-9

95. Peleg, A. Y. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. The New England Journal of Medicine 2010: Vol. 362:1804-1813

96. Poole, T.L., T.S. Edrington, D.M. Brichta-Harhay, A. Carattoli, R.C. Anderson, and D.J. Nisbet. 2009. Conjugative transferability of the A/C plasmids from Salmonella enterica isolates that possess or lack bla(CMY) in the A/C plasmid backbone. Foodborne Pathog. Dis. 6:1185– 1194.

97. Pulsenet 2013. Protocolo de electroforesis en gel de campo pulsado. Consultado el 13/04/2015. Disponible en: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/salmonella.html>

98. Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez OR, Carlos R V, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *J Food Prot.* Vol. 72(6). 1279-82.
99. Randall L. P., Cooles S. W., Osborn M. K., L. Piddock J. V. and Woodward M. J. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: Vol. 53, 208–216.
100. Raufu IA, Zongur L, Lawan FA, Bello HS, Adamu MS, Ameh JA & Ambali AG. 2014. Prevalence and antimicrobial profiles of *Salmonella* serovars from vegetables in Maiduguri, North eastern Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, Vol.12 (1). 23-28.
101. Red internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota de información INFOSAN 3/2005-*Salmonella*. Resistencia Antimicrobiana a *Salmonella*.
102. Refsum T, E Heir, G Kapperud, T Vardund, G Holstad. 2002. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. *Environ. Microbiol.* Vol. 68; 5600-5606.
103. SAGARPA-CONACyT, 2010. Fondo Sectorial de Investigación en materia agrícola, pecuaria, acuacultura, agrobiotecnología y recursos fitogenéticos . Anexo B. Demandas del sector 2010-7.
104. Salvatierra-González Roxane., Benguigui Yehuda. Resistencia antimicrobiana en las Américas: magnitud del problema y su contención. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. Año 2000. 268 pp.
105. Sánchez de Rivas Carmen. 2006. Antibióticos de ayer, hoy y mañana. *Química viva.* Vol. 5 (02): 63-67
106. Shah A. H, Korejo N. A.. 2012. Antimicrobial Resistance Profile of *Salmonella* Serovars Isolated from Chicken Meat. *J. Vet. Anim. Sci.* Vol. 2. 40-46
107. Secretaria de salud 2012. Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Boletín epidemiológico, México. Consultado el 23/11/2014. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010imagen/plantilla/indice-2012.htm>
108. Secretaria de salud 2012. Enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Boletín epidemiológico, México. Consultado el 3/03/2014. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010imagen/plantilla/indice-2012.htm>

109. Serrano A. V. (2008) Algunas características del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en la Costa de Oaxaca. INIFAP. SAGARPA. Folleto Técnico Núm. 14. Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá, Oax., México. 51 p
110. SIAP, Sistema de Información Agropecuaria (2012) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Anuario Estadístico 2012. México, D. F.
111. Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., Kaupenjohann, M., 2008, Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley: *Water Research*, 42(8-9), 2124-2134.
112. Soltan Dallal Mohammad Mehdi, Mahnaz Taremi, Latif Gachkar, Shabnam Modarressi, Maryam Sanaei Rounak Bakhtiari, Mohammad Kazem Sharifi Yazdi, Mohammad Reza Zali. 2009. Characterization of antibiotic resistant patterns of *Salmonella* serotypes isolated from beef and chicken samples in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. Vol 2(4). 124-131.
113. Thong, Kwai Lin, Modarressi, Shabnam. 2011. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. *Food Research International*. Vol. 44 (9); 2641-2646.
114. Tom S. Edrington, William E. Fox, Todd R. Callaway, Robin C. Anderson, Dennis W. Hoffman, and Nisbe J. David. 2009. Pathogen Prevalence and Influence of Composted Dairy Manure Application on Antimicrobial Resistance Profiles of Commensal Soil Bacteria. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*. Vol. 6, (2).
115. Torres-Vitela M. del Refugio, Gómez Aldapa Carlos A., Cerna-Cortes Jorge F., Villarruel-López Angélica, Rangel-Vargas Esmeralda and Castro-Rosas Javier. 2013. Presence of indicator bacteria, diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*. 56:180-185.
116. Turki Y, Mehr I, Ouzari H, Khessairi A, Hassen A. 2014. Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes. *J Gen Appl Microbiol*. Vol. 60 (4); 123-30.
117. U.S. Department of Agriculture. 2011. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg and Catfish Products. Microbiology laboratory guidebook, MLG 4.05. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_05.pdf Fecha de acceso: julio, 2012.
118. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174-8.

119. Vázquez-Garcidueñas Ma. Soledad, Romero-Pérez Nallely Lizbeth, Figueroa-Aguilar Gloria Alicia, Jaime-Sánchez Juan Luis, Vázquez-Marrufo Gerardo. 2014. Investigation of a food-borne Salmonella Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *J Infect Dev Ctries*; 8(2): 143-153.
120. Velez A. Hernán., Rojas William M., Borrego Jaime R., Restrepo M. Jorge. Fundamentos de medicina. Enfermedades infecciosas. 6ª edición. Fondo editorial CIB. Medellín Colombia. Año 2003.
121. Vila J. Martí S., Sanchez- Cespedes J. Porins efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter Baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:2 10-5.
122. Voet Donald. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. 2ª edición. Ed. Médica panamericana. Argentina año; 2009. Vol: 74(1). 161-166
123. Wong, S.K., Lim, Y.Y. and Chan, E.W.C. 2010. Evaluation of antioxidant, anti-tyrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. *Ethnobot Leaflets*. 14, 781-796.
124. Wright D. Gerard. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13:589-594.
125. Yanez Edna, Mattar Salim, Alba Durango. 2008. Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Asociacion Colombiana de Infectologia*. Vol. 12 (4).
126. Yang B, Cui Y, Shi C, Wang J, Xia X, Xi M, Wang X, Meng J, Alali WQ, Walls I, Doyle MP. 2014. Counts, serotypes, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates on retail raw poultry in the People's Republic of China. *J Food Prot*. Vol. 77 (6); 894-902.
127. You Youwen, Rankin Shelley C., Aceto Helen W., Benson Charles E., Toth John D., and Dou Zhengxia. Survival of *Salmonella enterica* Serovar Newport in Manure and Manure-Amended Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; Vol. 72 (9): 5777–5783.
128. Zaidi, M.B., P.F. McDermott, P. Fedorka-Cray, V. León, C. Canché, S.K. Hubert, J. Abbott, M. León, S. Zhao, M. Headrick, L. Tollefson. 2006. Non-typhoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin. Infect. Dis*. 42:21-28.
129. Zamudio María Luz., Meza Ana., Bailon Henri 2011. Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. Vol. 28:128-135.

130. Zdragas A K., Mazaraki, G. Vafeas, V. Giantzi, T. Papadopoulos and L. Ekateriniadou. 2012. Prevalence, seasonal occurrence and antimicrobial resistance of Salmonella in poultry retail products in Greece. Letters in Applied Microbiology. Vol. 55(4):308-13.

131. Zelalem Addis, Nigatu Kebede, Zufan Sisay, Haile Alemayehu, Alehegne Yirsaw, Tesfu Kassa. 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. BMC Infectious Diseases. Vol: 11(222): 1-7.