



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**Presencia de microorganismos indicadores y grupos
patógenos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos
en carne molida de res.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE LA TESIS:

DR. JAVIER CASTRO ROSAS

Mineral de la Reforma, Hidalgo 2017

HOJA DE FIRMAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.
Presente:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos Francisco Javier Hernández Hernández, quien presenta el trabajo de investigación "**Presencia de microorganismos indicadores y grupos patógenos de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos en carne molida de res**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente **Dr. Santiago Ricardo Tomas Filardo Kerstupp**

Secretario **Dra. Eva María Santos López**

Primer vocal **Dr. Javier Castro Rosas**

Segundo vocal **Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa**

Tercer vocal **Dra. Alma Delia Román Gutiérrez**

Primer suplente **Dr. Israel Oswaldo Ocampo Salinas**

Segundo suplente **Dra. Esmeralda Rangel Vargas**

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo, 20 de junio de 2017

Dra. Maria Luisa Soares da Silva
Coordinadora Adjunta
Licenciatura en Química de Alimentos

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. 2200 y 2201, Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIAS

Lo he dicho en algunas ocasiones, espero algún día poder ser por lo menos la mitad de padres que ustedes han sido conmigo a pesar de sus limitaciones siempre han intentado darme lo mejor y más allá de todo me enseñaron a luchar por lo que creo, a creer en mí a ser independiente a ser un hombre de palabra y honesto pero los admiro más porque cuando ni yo mismo creía en mí, ustedes vieron algo en me apoyaron incondicionalmente que nunca dejaron que me diera por vencido, a pesar de mis errores estuvieron a mi lado, que a pesar de los muchos problemas familiares nunca me dieron la espalda, a mis padres que son un ejemplo de vida, que son mi mayor orgullo que los quiero tanto, es a ellos a los que les debo lo que soy, este triunfo no solo es mío es de ustedes también

A mi Elena que fue el motor, la motivación que encendió esas ganas de superarme, a mi Elena este triunfo es para ti. Que eres una de las mejores cosas que me han pasado en la vida y que seguramente no podría estar donde estoy sin ti.

Para mi otra persona especial Ana Rosa, pasaste conmigo todo el trayecto fue bueno y a veces malo tu sabes que este triunfo es de los dos tuvimos problemas pero nunca han sido más fuertes que nosotros somos los dos y siempre saldremos adelante juntos, cuando no tenía ganas de seguir cuando ya no tenía motivación o me faltaban fuerzas ahí estabas para regresarme a la realidad y seguir de frente a lo que fuera te agradezco todo y esto solo es el principio.

A mi abuelita que siempre estuvo preocupándose por mí, estando ahí ese hombro que me ayudo en mis problemas y a la cual quiero mucho gracias por preocuparse y estar conmigo, en ocasiones he tenido errores pero siempre tendrá un lugar especial en mi corazón.

A mis dos hermanos que son menores que yo, pero que aunque no se los diga saben que los quiero.

Una dedicatoria muy especial para mi abuelo, se nos adelantó y no sabe cómo me hace falta, siempre tendré su recuerdo presente y aun no se me olvida que le prometí que terminaría una carrera universitaria , este es el trabajo que avala que lo he logrado , gracias por todo abuelo.

Y en general a toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

He pensado durante largo tiempo en este preciso momento, en el cual se cierra un ciclo, a lo largo de todo esta estancia en la universidad, me he encontrado con personas muy profesionales y que me han ayudado a llevar y terminar este ciclo me han ayudado en los momentos difíciles, en los amargos y también en los felices, y eso se lo agradezco de sobremanera, el principal de entre todos es el Dr. Javier que me ayudo me dirigió y a pesar de todos los problemas por los que pase, me apoyo me dio y la confianza para terminar la investigación , es un gran investigador, siempre quise trabajar con uno de los mejores y me dio la oportunidad de verdad lo admiro y respeto, y siempre es un gusto trabajar con una persona tan optimista que siempre tiene una actitud positiva y eso te contagia y te motiva gracias Dr Javier por todo.

A la Dra. Paty que me apoyo en la investigación, después de un buen jalón de orejas me enseñó, me guio a lo largo de la investigación y me enseñó un par de cosas estuvo conmigo en los análisis realizados supervisando y revisando que se hicieran las cosas bien, llegaba temprano y estaba ahí desde que iniciaba el día hasta que terminaba una profesional y agradezco poder conocerla y aprender de una persona tan dedicada y minuciosa en los pequeños detalles, gracias Dra.

A los doctores que estuvieron ligados a la investigación o son parte del laboratorio no me queda más que agradecer el apoyo, como al Dr Serna que aunque no trabaje con el tanto tiempo por lo poco que pude ver, es un especialista en su campo y cuando decide trabajar es trabajar, tiene una dedicación en lo que realiza y pareciera que no se cansa nunca gracias por el tiempo y los pequeños aprendizajes, la Dra. Esmeralda y la Dra. Eva que cualquier duda o cosa que les preguntara por insignificante que fuera siempre me respondían.

Tengo que hacer una mención especial a Jesús, que fue parte vital del proyecto, que me ayudo con dudas, que me tendió la mano casi sin conocerme, en estos tiempos encontrar a una persona que te apoye es casi imposible, es por eso que se lo agradezco.

A Magali y Maricela que me aparte de llevarnos bien casi durante toda la carrera fueron un apoyo incondicional siempre que lo necesite, nunca se negaron a escucharme o a ayudarme y también en esos días de estrés me hacían reír con sus ocurrencias y locuras, por eso y más las considero unas grandes profesiones y amigas incondicionales. A mi compañero y amigo maye que siempre estuvo un esos momentos tanto felices como amargos, compartí clases con quien yo considero un ejemplo de superación y que realmente admiro por su determinación y confianza, tuve el gusto de tener a un amigo a mi lado en

Agradecimientos

cada momento que pase y eso se lo agradezco, a Daniel que era el más cómico de nosotros, siempre nos podía poner de buen humor o todo lo contrario todo un personaje sin lugar a dudas.

Tabla de contenido

Índice de tablas	1
Abreviaturas	3
Introducción.....	5
Antecedentes.....	7
Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS).....	7
Enfermedades transmitidas por alimentos en México	9
Microorganismos indicadores	11
<i>Escherichia coli</i>.....	12
Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>.....	14
Brotos asociados a grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>	16
Reacción en cadena de la polimerasa.....	18
Carne de res	18
Carne de res en México.....	18
Microbiología de la carne.....	20
Nuevas técnicas de preservación de carne.....	22
Brotos de <i>E. coli</i> producidos por la ingesta de carne de res	23
Inocuidad alimentaria	24
Resistencia a antibióticos y su impacto en la salud humana	25
Consumo y uso de antibióticos.....	26
Objetivos	27
Materiales.....	28
Metodología experimental	31
Obtención de las muestras de carne molida	31
Preparación de la muestra	31
Determinación de coliformes fecales.....	31
Identificación de <i>Escherichia coli</i>.....	31
Obtención de DNA de las cepas de <i>E. coli</i>	34
Obtención de DNA de los controles positivos Cepas de referencia	34
Obtención de la mezcla de iniciadores	34
Preparación de los iniciadores para la reacción PCR multiplex.....	35
Preparación de la mezcla de reacción	35

Tabla de contenido

Preparación de dNTP´s.....	36
Reacción de PCR multiplex.....	37
Electroforesis en gel de agarosa.....	38
Preparación de la agarosa para el gel.....	38
Electroforesis.....	38
Prueba de resistencia a antibioticos, por la tecnica de difusion en disco de papel.....	41
Resultados.....	42
Coliformes fecales.....	42
Análisis de <i>Escherichia coli</i>.....	42
Identificación de <i>Escherichia coli</i>.....	44
Resultados de cepas de <i>E. coli</i> identificadas mediante PCR.....	45
Resultados resistencia a antibióticos.....	47
Conclusiones.....	55
Recomendaciones.....	56
Bibliografía.....	57
Anexo 1 tabla de resultados completa.....	66
Anexo 2 Preparación de reactivos.....	69

Índice de tablas

Tabla 1	Número de casos en México en el periodo de 2008 a 2010.....	10
Tabla 2	Casos de enfermedades diarreicas agudas (EDAS) registradas en Hidalgo en	10
Tabla 3	Pruebas bioquímicas comúnmente utilizadas en los laboratorios para la identificación de <i>E. coli</i>.....	13
Tabla 4	Brote y casos de síndrome urémico hemolítico (SHU) e infecciones por EHEC ocurridos en Alemania y el resto de la Unión Europea en Mayo de 2011.....	17
Tabla 5	Producción de carne en canal de res producida en todo México.....	19
Tabla 6	Pruebas bioquímicas para la confirmación de cepas de <i>E. coli</i> en las muestras de carne analizadas.....	32
Tabla 7	Secuencia a amplificar para cada grupo patógeno de <i>E. coli</i>.....	35
Tabla 8	Relación entre volúmenes y concentraciones de los iniciadores para cada gen de virulencia	36
Tabla 9	Mezcla de reacción utilizada para correr en el termociclador	37
Tabla 10	Ciclos del termociclador para la obtención de la ampliación del segmento de DNA a analizar.....	38
Tabla 11	Antibióticos utilizados en la prueba de resistencia a antibióticos por difusión en disco de papel.....	41
Tabla 12	Conteo de coliformes fecales en las muestras analizadas	42
Tabla 13	resultados totales de muestreos por comercio, conteo de coliformes fecales, <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> patógena con sus respectiva mediana, máximo y mínimo	43
Tabla 14	Valores de UFC/gr para todo el muestreo.....	44
Tabla 15	Cepas de <i>E. coli</i> aisladas, positivas a algún grupo patógeno y porcentaje por lugar de muestreo	45
Tabla 16	Número de cepas positivas gen y grupo identificado	46
Tabla 17	porcentaje de gen de virulencia.....	46
Tabla 18	Número de cepas de <i>E. coli</i> patógenas resistentes o sensibles a los antibióticos.....	48

Tabla 19 Comparativa de diferentes estudios acerca de resistencia antibióticos.....	52
Tabla 20 Resultados completos.....	66

Índice figuras

imágen 1 Proceso de obtención de cepas confirmadas de <i>E. coli</i> a partir de carne molida.....	33
Imágen 2 Metodología utilizada para el grupo patógeno.....	40
Imágen 3 Gel #4 de 16 en el barrido general a las cepas positivas de <i>E. coli</i> a algún gen patógeno.....	45
Imágen 4 Gel específico después del barrido general, para determinar a qué gen y grupo corresponden.	47

Abreviaturas

DNA	Acido desoxirribonucleico
Aw	Actividad de agua
ACS	Agar citrato simmons
AMB	Agar eosina azul de metileno
AMK	Agar mckonkey
AP	Agua peptonada
BE	Bromuro de etidio
CL	Caldo lactosado
CVB	Caldo verde brillante
NaCl	Cloruro de sodio
CF	Coliformes fecales
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogenica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigenica
EDA	Enfermedades diarreicas agudas
ETAS	Enfermedades transmitidas por alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados unidos
FAO	Food and Drugs organization
°C	Grado centígrado
GPE	Grupos patógenos de <i>E. coli</i>
Hrs	Horas
IMVIC	Indol, rojo de metilo, Vogues Proskauer y citrato Simmons
Kg	Kilogramo
BAM	Manual bacteriológico analítico
mL	Microlitro
Ma	Miliamperes
MIN	Minuto
OMS	Organización mundial de la salud
%	Porcentaje
Ph	Potencial de iones hidronio
Eh	Potencial oxido reducción
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Regulador tris boratos EDTA
SAGARPA	Secretaria de agricultura y pesca
S	Segundos
SIAP	Servicio de información agroalimentaria

Tablas de contenido y abreviaturas

SHU	Síndrome urémico hemolítico
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxinas shiga
HACCP	Sistema de análisis de puntos críticos y de control
T	Temperatura
TL	Termolábil
T	Tiempo
TIF	Tipo inspección federal
ST	Toxina shiga
UV	Ultra violeta
UFC	Unidades formadoras de colonias
VT	Vero toxina
VP	Vogues Proskauer
V	Volt

Introducción

Las enfermedades gastrointestinales que afectan a la población mexicana y a la población mundial, tienen diversos orígenes, pueden ser víricos, parasitarios y bacterianos. Comúnmente en México, los agentes patógenos que más afectan a la población son las bacterias, como los grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella Spp*, *Shigella*, *Vibrio Spp*, *Campylobacter*, entre otros. Estas bacterias se pueden transmitir por alimentos y agua contaminada; las cuales pueden llegar a los alimentos por contaminación directa o por contaminación cruzada y por una inadecuada manipulación y limpieza de equipos y utensilios que se utilizan en la elaboración y producción de alimentos.

La carne es un producto ampliamente consumido en todo el mundo y la forma de preparación es muy diversa. En México, la carne se consume en distintos grados de cocimiento como el término medio, cocida y cruda, además de consumirla marinada en jugo de limón y es parte fundamental de los embutidos. La carne puede contaminarse con microorganismos patógenos por vía endógena o exógena. La forma endógena ocurre cuando la microbiota intestinal puede contaminar la carne durante el sacrificio por mal manejo sanitario. Por otro lado, la contaminación exógena se da principalmente por los utensilios, equipos, fauna y el operario, debido a fallas en la higiene.

La carne es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos debido a su composición; factores como el pH, actividad de agua, nutrientes y temperatura la hacen adecuada para el desarrollo de microorganismos. Por ello, el proceso para la obtención de carne debe ser controlado y monitoreado en todo momento.

Los productos cárnicos han sido implicados en diversos brotes de enfermedades gastrointestinales y en los más severos casos se ha llegado a presentar Síndrome urémico hemolítico (SHU) en varias partes del mundo, en donde los microorganismos más comunes detectados son *Salmonella* y *E. coli* y sus diferentes grupos patógenos (GPE).

En los países en desarrollo, incluido México, los GPE están tomando relevancia debido a la alta incidencia de enfermedades gastrointestinales y que cada vez son más complicadas de controlar.

Anexo a este problema, está la resistencia a los antibióticos, el cual también es un problema a nivel mundial. En un reporte publicado en noviembre del 2016 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 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.

Recientemente se ha reportado la presencia de los grupos patógenos de *E. coli* multi-resistentes a los antibióticos en diversas hortalizas que se comercializan en el estado de Hidalgo; sin embargo, no se ha investigado su presencia en carne molida de res.

En este trabajo se determinó la presencia de grupos patógenos de *E. coli* mediante la técnica de biología molecular PCR, la cual consiste en identificar los genes de virulencia para así determinar el grupo patógeno al que pertenecen, después las cepas de *E. Coli* pertenecientes a los distintos grupos se sometieron a antibiogramas para así determinar su resistencia a distintos antibióticos. Las muestras de carne molida de res se obtuvieron de diferentes mercados en el estado de Hidalgo.

Es posible que la carne molida de res este participando también como vehículo de grupos patógenos de *E. coli* multiresistentes a antibióticos. En tal caso, es necesario determinar su presencia en la carne molida de res para tener idea del posible riesgo al consumidor y tener antecedentes para realizar un tratamiento oportuno y eficaz.

Antecedentes

Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)

Las enfermedades transmitidas por alimentos, constan de intoxicaciones e infecciones, que se presentan por ingerir alimentos contaminados en cantidad suficiente de agentes químicos o microbiológicos (bacterias, toxinas, virus y parásitos) los cuales sugieran un riesgo al consumidor. Dentro de los padecimientos más frecuentes que provocan las ETAS, se encuentran: dolor estomacal, diarrea y vómito; aunque pueden derivar en enfermedades diarreicas agudas (EDAS) y graves, como encefalitis, o crónicas degenerativas como la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, lo cual una vez adquirido en pocos días puede llevar a la muerte del individuo o a una disminución en la expectativa y calidad de vida, respectivamente.

Las causas de la contaminación o presencia de agentes patógenos en los alimentos son diversas, algunos de los factores que contribuyen a la contaminación del alimento es la mala higiene personal, contaminación cruzada, una manipulación inadecuada del alimento, no respetar la cadena de frío, mala desinfección en el caso de frutas y leguminosas así como una mala cocción de alimentos (Cervantes *et al.* 2008).

Las enfermedades diarreicas son la mayor causa de muerte en niños menores de 5 años, cada año enferman 2 millones de niños y alrededor de 760,000 fallecen. Generalmente, las enfermedades diarreicas son causadas por una infección en el sistema digestivo y puede ser causada por bacterias, parásitos y virus. Estos agentes se transmiten por alimentos o agua contaminada, aunque en ocasiones es causada por la mala higiene de las personas adultas ya que también se puede presentar por contacto persona a persona (OMS, 2013).

Las enfermedades gastrointestinales en su mayoría se presentan en niños menores a 5 años y en personas con sistema inmune comprometido o con enfermedades degenerativas como diabetes, desnutrición, anemia entre otros (Lund, 2015). No obstante, cabe señalar que también afectan a todo tipo de consumidores.

Antecedentes

Cabe mencionar que anualmente alrededor de 80 millones de personas viajan de vacaciones o por negocios a otros países, y enferman por la denominada “diarrea del viajero”, generalmente se da en personas que viajan de países desarrollados a países en desarrollo, algunos de los causantes de esta enfermedad son los siguientes: el grupo patógeno de *Escherichia coli* EPEC 47%, EAEC 46%, ETEC 22%, EHEC 7%, *Campylobacter* 6%, *Shigella* 2% y *Salmonella* 2% (Antikainem, 2013).

Los alimentos generalmente implicados en las toxiinfecciones son (OMS, 2014):

- Frutas y verduras no lavadas ni desinfectadas
- Productos de origen animal (carne y leche)
- Mariscos crudos

Por nombrar los más implicados, sin embargo cualquier alimento que sea manipulado sin el cuidado necesario, se vuelve un riesgo a la población que lo consume (OMS, 2014).

Este tipo de enfermedades afectan a la población mundial, siendo los países en desarrollo donde se presentan más casos y la mortalidad es mayor (Escartín, 2000).

En los últimos años han aparecido nuevas especies de microorganismos en alimentos y algunos otros están presentando una mayor incidencia que en años anteriores, esto se cree que es debido a los nuevos hábitos alimenticios de la población, cambios genéticos, nuevas tecnologías tanto de producción como de distribución de los alimentos y al incremento de personas con un sistema inmune más débil (Escartín, 2000).

Los microorganismos más recurrentes en las enfermedades que se han documentado son:

Salmonella, *Shigella*, *E. coli*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Giardia* *Lambliia*, *Amibas*, *Rotavirus* y el *Virus de Norwalk* por nombrar los más importantes, con sus respectivos subespecies.

Enfermedades transmitidas por alimentos en México

En los países que se encuentran en desarrollo como México, las enfermedades transmitidas por alimentos, desencadenan principalmente padecimientos gastrointestinales, los cuales representan un problema de salud grave. México es uno de los países que registra una tasa de mortalidad elevada y por ende esto representa un alto costo de vidas humanas, recursos financieros para atender los servicios de salud y horas de trabajo perdidas por la enfermedad (Vásquez y Cabral, 2002).

Durante el periodo comprendido de 2000 a 2008 se llevó a cabo un recuento de brotes asociados al consumo de alimentos en México por la secretaria de salud, y se identificó al causante de estas enfermedades, este arrojo que el 37% de los niños menores de 5 años que enferman es causado por algún grupo patógeno de *E. coli*; mientras que, en países desarrollados ese porcentaje es muy cercano a 0. Otras bacterias que han sido responsables de los brotes en México son *Shigella* 10%, *Campylobacter* 3% y *Salmonella* 3% (Hernández *et al.* 2011).

En México el causante de la diarrea del viajero es principalmente el grupo patógeno ETEC presentado en 42% del total de pacientes analizados.

Los grupos de edad más afectados son los niños de 1 a 4 años y adultos de entre 25 y 45 años, las enfermedades de origen viral se dan preferentemente en otoño e invierno, mientras que las bacterianas se dan en primavera – verano (Hernández *et al.* 2011).

Las enfermedades gastrointestinales representan el 20% del total de consultas en infantes menores a 5 años y el 10% requiere de hospitalización, también este tipo de problemas trae consigo la desnutrición del infante (Herrera y Montoya, 2012).

En México durante los años comprendidos de 2008 a 2010, se tuvo el siguiente reporte de casos (Tabla 1), con esto se puede decir que el número de casos que se presenta por año es muy similar (Herrera y Montoya, 2012).

Tabla 1 Número de casos en México en el periodo de 2008 a 2010

Año	Número de casos
2008	5,564,956
2009	5,564,841
2010	5,706,226

En 2010 se registraron los meses en los que se presentaron los picos más altos de enfermedades que fueron Marzo, Mayo, Julio y Octubre, y al ser meses calurosos las infecciones bacterianas fueron las más implicadas. Así mismo en 2010 los datos de casos de enfermedades gastrointestinales en Hidalgo fueron los siguientes (Tabla 2) (Herrera y Montoya, 2012).

Tabla 2 Casos de enfermedades diarreicas agudas (EDAS) registradas en Hidalgo en

Edad (años)	# casos
Menor a 1	12,621
1 – 4	29,925
5 – 14	31,087
15 – mas	70,056

En 2010 se registraron 3,165 defunciones, de las cuales 585 fueron de infantes menores a 1 año. La Secretaria de Salud y demás instituciones dedicadas al tratamiento de salud, intentan disminuir estas defunciones y este tipo de enfermedades, sin embargo resulta difícil por el hecho de que las personas, y los servicios de salud no pueden documentar todos los casos, y además en la mayoría de los casos no se detecta si la enfermedad fue de origen bacteriano, vírico o parasitario.

Es importante señalar que es ampliamente sabido y aceptado que el número de enfermedades que comúnmente se registra y reporta por los sistemas de salud en todo el mundo, aun en los países desarrollados, con respecto a los casos que realmente ocurren se encuentra entre el 0.1 y 1 %. En otras palabras para tener

un estimado del número de casos de enfermedad que realmente están ocurriendo en México y en particular en el estado de Hidalgo, se tendría que multiplicar el número de casos reportados por las autoridades de Salud por 99 y 99.9 para tener un límite estimado de los casos que están muy probablemente ocurriendo en la región a estimar.

Microorganismos indicadores

Se trata de microorganismos que se utilizan para evaluar las condiciones de higiene con las cual un alimentos o las materias primas fueron preparadas o manipuladas (Escartín, 2000).

Existen tres grupos de microorganismos y una especie bacteriana que generalmente se emplean como indicadores en México

- Mesófilos aerobios
- Coliformes totales
- Coliformes fecales
- *E. coli*

Para el caso de la carne cruda, los microorganismos que generalmente se emplean como indicadores, son los coliformes fecales y *E. coli*. Por lo que, solo haremos referencia en los antecedentes a estos microorganismos indicadores.

Los coliformes fecales tienen alrededor de medio siglo, siendo utilizados como indicadores en la calidad sanitaria de los alimentos y agua potable, entre sus características se encuentran las siguientes:

- Bacilos aerobios o anaerobios facultativos
- Gram negativos
- No esporulados
- Fermentan lactosa con producción de gas a 44.5 °C en un lapso de 24 a 48 horas

El grupo de coliformes fecales está integrado por diferentes géneros y especies de bacterias como por ejemplo:

- *E. coli*
- *E. freundii*
- *Enterobacter aerogens*
- *Klebsiella pneumonia*
- *Citrobacter sp*

En la carne molida de res se utilizan los coliformes como indicadores de fallo en las medidas de higiene durante su obtención o manipulación (Escartín, 2000).

Para la evaluación del agua y los alimentos, en cuanto a su calidad sanitaria y a la posible presencia de bacterias patógenas, se utiliza generalmente *E. coli* (Alonso *et al.* 1999).

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra comúnmente en el intestino de los seres humanos y en animales de sangre caliente, se le considera de la flora normal del ser humano (Rodríguez, 2002). Forma parte de la familia *enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, no esporulado, con flagelos inmóviles o peritricos, aerobio o anaerobio facultativo crece en medios de cultivo simples, con o sin presencia de NaCl, fermenta y oxida la lactosa y reduce los nitratos a nitritos (Erwing, 1985). Esta bacteria puede crecer a una temperatura (T) de 7 °C a 50 °C, con una óptima de 37 °C, a un pH mínimo de 4.4, y una actividad de agua (A_w) de 0.95, se destruye a una temperatura de 70 °C (OMS, 2011). En cuanto a la identificación se utilizan pruebas bioquímicas (Tabla 3) y actualmente análisis de biología molecular para determinar su presencia.

Tabla 3 Pruebas bioquímicas comúnmente utilizadas en los laboratorios para la identificación de *E. coli*

Prueba bioquímica	% de positividad
*Indol	98
*Rojo de metilo	99
Acido glucosa	100
Gas de glucosa	95
Movilidad a 35°C	95
Nitrato a nitrito	100
Fermentación de lactosa	95
*Citrato Simmons	1
*Vogues Proskauer	0
H ₂ S	1
KCN crecimiento	3

*pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de *E. coli*.

En una persona sana *E. coli* representa el 1% de la población intestinal. Es importante señalar que aunque el género y la especie *E. coli* es considerada no patógena, algunas cepas han desarrollado mecanismos de patogenicidad y adquirido genes de virulencia.

Así, actualmente se reconocen en general 6 grupos patógenos de *E. coli* los cuales se clasifican de acuerdo a la enfermedad, tipo y síntomas que le producen al humano (FAO, 2011).

Los grupos patógenos de *E. coli* causan enfermedades entéricas a través del agua y alimentos que se contaminan con materia fecal de una persona infectada (Nataro Y Kaper, 1998).

El grupo de *E. coli* que produce toxina shiga causa el síndrome urémico hemolítico (SHU) y cuadros de disentería (Rodríguez, 2002).

Grupos patógenos de *Escherichia coli*.

También conocidos como grupos diarreogénicos los cuales causan diarrea y la diferencia entre uno y otro son sus características es decir los síntomas, tratamiento, epidemiología y patologías asociadas (Rodríguez, 2002).

- *E. coli* enteropatogénica (EPEC)
- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* adherencia difusa (DAEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

***E. coli* enteropatogénica EPEC**

Presentan la capacidad de adherirse a células, destruye las vellosidades intestinales y se adhiere de mejor forma a los receptores de la pared epitelial. Los genes de virulencia que presentan son *eaeA*, en cuanto a la transmisión, se da de forma fecal oral o por alimentos contaminados (FAO, 2011).

Entre los síntomas destacan diarrea, anorexia y si no se atiende puede ser letal, suelen afectar a los menores de 2 años. En México el porcentaje de detección es del 30 a 40% en los casos de esa edad (Molina *et al.* 2010).

***E. coli* enteroinvasiva EIEC**

Estas cepas se internalizan, adhieren y reproducen dentro del citoplasma de las células de la persona infectada para posteriormente entrar por endocitosis a las células epiteliales a las que destruyen, este tipo de cepas se parecen bioquímicamente al género *Shigella* (Nataro *et al.* 1998, Rodríguez, 2002).

También producen un cuadro de disentería, provoca diarrea, dolor abdominal y fiebre. En México pocas veces se ha aislado este grupo, aunque se ha aislado en niños menores de 1 año (Molina *et al.* 2010).

E. coli enterohemorrágica EHEC

Se relaciona con brotes causados por alimentos en su mayoría por la ingesta de carne mal cocida o cruda, en países desarrollados tiene un alto índice de mortalidad y detección (FAO, 2011).

Causa diarrea con sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SHU) y los genes que produce son las verotoxinas (VT) y shigatoxinas (STX), el periodo de incubación va de 1 a 8 días (Molina *et al.* 2010).

Las enfermedad se complica debido a la combinación entre los genes de virulencia *Stx1* y *Stx2* y el gen *eaeA*, este tipo de cepas dan lugar a cuadros clínicos más complejos y un mayor riesgo de salud en la persona enferma (Luedtke *et al.* 2014, Nyholm,2015).

E. coli enteroagregativa EAEC

El grupo EAEC tiene la capacidad de incrementar la mucosa intestinal del huésped, así las bacterias se caracterizan por la adherencia y la formación de agregados bacterianos y este tipo de lesiones las produce tanto las cepas patógenas como no patógenas. Esta bacteria causa brotes o casos aislados de diarrea persistente (Rodríguez, 2002).

E. coli adherencia difusa DAEC

Estas no forman micro colonias o agregados cuando se adhieren a las células se sabe poco del mecanismo de patogenicidad, su adherencia se asocia a una proteína de membrana externa. Presenta los genes *afa/dr*, los cuales son responsables de su adhesión, se han aislado de niños, como parte normal de su flora intestinal. El cuadro de síntomas presenta diarrea acuosa, sin sangre y sin leucocitos (Molina, 2010, Rodríguez, 2002, FAO, 2011).

E. coli enterotoxigénica ETEC

Coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pili o fimbrias produce toxinas denominadas termolábil (TL) y termoestable (ST).

Hay dos tipos de factores de virulencia el primero es por medio de las toxinas ST y VT y el segundo es por medio de su pili el cual le permite al bacilo adherirse a la pared epitelial para causar la infección.

El cuadro clínico comprende diarrea aguda, vómito y fiebre, la dosis infectante se de 10^8 UFC/g (Rodríguez, 2002).

Este grupo se ha aislado de niños que presentan diarrea en un 10 a 30% de casos, el tiempo de incubación es de aproximadamente 14 a 20 h, también es una de las principales causas de diarrea del viajero (Molina *et al.* 2010).

Brotos asociados a grupos patógenos de *Escherichia coli*

Los cambios en la producción, distribución, almacenamiento y mercadeo de los productos alimenticios han producido un incremento en los brotes causados por alimentos. En Estados Unidos se llevó un registro desde 1973 a 2010, el promedio por año fue de alrededor de 27775 sin embargo de 1973 – 1980 se prestaba un aumento anual 2.5 brotes, mientras para el periodo de 2001 – 2010 se presentó un aumento de 13.5 brotes anuales. También encontraron que los causantes de estos brotes eran en primer lugar *Salmonella* 47% y *Escherichia coli* 26%, los alimentos mayormente implicados fueron la carne de res 22%, frutas 13% y verduras 13% (Nguyen *et al.* 2015).

En Japón en el año de 1996 se registraron una serie de brotes, con alrededor de 7,500 casos, los reportes han crecido a razón de 3,000 casos por año a partir del año 1996, sin embargo todos son relacionados con grupos patógenos de *E. coli* como EHEC (Terajima *et al.* 2014).

El 30 de mayo del 2000 se reportó un brote de *E. coli* en Canadá el cual dejó 5 personas muertas y 27 hospitalizadas, el serotipo implicado fue O157:H7 y el vehículo de contaminación fue el agua contaminada (OMS, 2000, Thomas, 2015)

En el periodo comprendido del 22 al 31 de mayo de 2011 se registró un brote en Alemania provocado por *E. coli* productora de toxina shiga, las toxinas VT y ST fueron las causantes; el brote dejó 15 fallecidos (9 por SHU y 6 por infección de EHEC) y 1534 casos de enfermedad (470 pacientes con SHU y 1064 por EHEC). El brote resultó inusual debido a que la población afectada en su mayoría fue de adultos con 86% y sobre todo mujeres con un 67% el serogrupo relacionado con este brote fue el O104 y la causa fueron germinados contaminados con la bacteria (Frank *et al.* 2011).

Cabe señalar que en toda Europa se registraron 1614 pacientes (Tabla 4), de los cuales 499 presentaban síntomas de SHU y 1115 de infección por EHEC.

Tabla 4 Brote y casos de síndrome urémico hemolítico (SHU) e infecciones por EHEC ocurridos en Alemania y el resto de la Unión Europea en Mayo de 2011

País	SHU	EHEC
Alemania	470	1064
Austria	0	2
Dinamarca	7	7
España	1	0
Francia	0	6
Noruega	0	1
Holanda	4	4
Reino unido	2	1
Suecia	15	28
Suiza	0	1

En Inglaterra durante el periodo comprendido de 2009 a 2012 se presentaron 3717 casos asociados a toxinas Shiga producidos por *Escherichia coli*, los resultados del estudio arrojaron que los niños de 1 a 4 años eran los más afectados y las mujeres tuvieron más incidencia que en varones, además de que las personas de tez blanca fueron más propensos a la infección por las bacterias que las personas

de tez oscura, se registraron más casos en las poblaciones rurales que en las zonas urbanas (Byrne *et al.* 2015).

En la unión europea de 2007 a 2010 se llevó un registro de casos producidos por la VT producida por *Escherichia coli*, se confirmaron 13545 casos de los cuales 777 se complicaron hasta el SHU, estos pacientes presentaron genes de virulencia como la verotoxina, también se encontraron genes de eaeA producida por la *E. coli* enteroagregativa y *aggR*, se presentó en el 85% de los casos (Messens *et al.* 2015).

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se descubrió en 1983 por Kary Mullis la cual permite copiar un fragmento específico de DNA millones de veces. Esta técnica es muy sensible y específica. La técnica se basa en delimitar la cadena de DNA mediante iniciadores y se utiliza una enzima extraída de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, para posteriormente copiarlo de forma exponencial a través de ciclos repetidos y diferentes periodos de temperatura. Consta de tres etapas desnaturalización, alineamiento y extensión. Ha encontrado aplicaciones en genética, biología molecular, biotecnología, microbiología, medicina e incluso en trabajo con fósiles (Aydin, 2014).

La técnica de PCR se emplea en microbiología para, entre otras cosas, la identificación de genes de patogenicidad o virulencia en las bacterias patógenas. Para el caso de los grupos patógenos de *E. coli*, los genes de virulencia de la bacteria *E. coli* son detectables por medio de PCR (Rodríguez y Barrera, 2004).

Carne de res

Carne de res en México

En México la mayoría de los animales que proveen la carne de res para el país se produce en ganaderías de los estados del sureste del país como Veracruz, Tabasco y Chiapas. Una vez que los animales alcanzan un peso de 500 kg aproximadamente, se les lleva a las plantas de faenado; éstas en México se dividen en dos (Lozano *et al.* 2012):

Antecedentes

- Rastro municipal.
- Rastro tipo inspección federal (TIF).

El faenado de los animales se lleva a cabo de la siguiente forma: en el rastro municipal se produce el 52% del total de carne, mientras que en el TIF es de 48%, la carne producida en el rastro TIF es más higiénica debido a un mayor número de controles sanitarios y se mantiene la cadena de frío, la cual se destina a tiendas de autoservicio, supermercados y carnicerías selectas, mientras que la carne que produce el rastro se distribuye en carnicerías locales, mercados y comercios ambulantes donde la cadena de frío rara vez se sigue. Sin embargo no hay que olvidar la carne que se comercializa sin utilizar estos tipos de plantas de sacrificio el denominado sacrificio traspatio, esta carne se comercializa sin refrigeración lo que reduce la inocuidad del producto, desafortunadamente en México tanto el comercio traspatio como los rastros municipales comercializan la carne en caliente quizá por tradición, ignorancia o por falta de recursos para poder llevar a cabo la cadena de frío, lo que se traduce en un riesgo para el consumidor, el único estado que prohíbe esta práctica es Nuevo León (Lozano *et al.* 2012). En la Tabla 5 se observa la producción de carne de bovino en México según la SAGARPA.

Tabla 5 Producción de carne en canal de res producida en todo México

Año	Toneladas
1990	1,030,314
2005	1,654,533

De 1990 a 2005 el consumo de carne aumento 60.58%, el aumento es por las nuevas formas de producción, la creciente demanda de alimentos y las nuevas técnicas de comercialización, lo cual la hace estar al alcance de más clases sociales en el país (SAGARPA, 2014).

Microbiología de la carne

Los rumiantes son reservorios naturales de los grupos patógenos de *E. coli* como ETEC, EHEC y EPEC, es por eso que es indispensable tener medidas y controles higiénicos adecuados durante el sacrificio y faenado de la carne (Friesema et al, 2015).

La carne puede sufrir contaminación endógena al no ser procesada de manera correcta, de esta manera la microbiota residente intestinal del animal es diseminada en el resto del organismo. El músculo del animal es estéril, pero algunas bacterias pueden llegar al músculo y colonizarlo. Aunque también puede haber contaminación exógena, la cual se da cuando no se tiene cuidado en el sacrificio y faenado del animal, ya que si los instrumentos con los cuales se sacrifica están contaminados con bacterias, estas entran en el flujo sanguíneo y llegan directamente al músculo. Además después del faenado el tiempo que la carne tiene expuesto al aire produce un mayor riesgo de contaminación, el agua con la que se lava al animal debe ser potable de lo contrario contaminara el producto (Molina *et al.* 2001).

Debido a la gran diversidad de las fuentes de contaminación con microorganismos estos pueden ser muy variados.

La carne molida presenta las características adecuadas para el crecimiento microbiano, lo que hace al producto susceptible a microorganismos deterioradores y patógenos; en si el músculo es estéril, pero después del sacrificio está expuesto a las condiciones ambientales, lo que influye en su contaminación y si no se tiene un programa de HACCP o buenas prácticas de higiene, el nivel de contaminación incrementa.

Los principales factores que influyen en el desarrollo microbiano en la carne molida de res son:

- Actividad de agua (A_w)
- Potencial oxido reducción (Eh)
- pH

Antecedentes

- Temperatura
- Requerimientos nutricionales

Actividad de agua (A_w)

Actividad de agua en carne fresca tiene valores de 0.98 a 0.99 cifra adecuada para casi cualquier microorganismo (Price *et al.* 1976).

Potencial oxido reducción (Eh)

Después de la muerte del animal todavía hay O_2 en el musculo lo que hace que el potencial sea positivo y elevado, lo que favorece el desarrollo de aerobios, después de que se consume el O_2 , el potencial se hace negativo y favorece el desarrollo de anaerobios, aunque también desarrollan los anaerobios facultativos, algunos ejemplos de este tipo de bacterias son (Sofos, 1994):

- Aerobios: *Pseudomonas* y *Micrococcus*
- Anaerobios: *Clostridium spp.*
- Anaerobios facultativos: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y Coliformes.

PH

En el músculo vivo el pH está cercano a la neutralidad y después del sacrificio el pH disminuye hasta valores de 5.4 y 5.8, la mayoría de las bacterias desarrollan a valores de pH de 5 y 8 (Price *et al.* 1976).

Nutrición microbiana

El músculo aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de casi cualquier bacteria, requerimientos tan simples como los que necesita *E. coli* y tan exigentes como *Neisseiras* (Price *et al.* 1976).

Temperatura

La temperatura del músculo inmediatamente después del sacrificio es de 37°C ideal para el desarrollo microbiano, una vez terminado el faenado se debe esperar a que pase el rigor mortis para después refrigerar, el desarrollo dependerá del tiempo que se tarde en refrigerar, aunque si en algún momento durante el

mercadeo se pierde la cadena de frío, las bacterias que se encuentren en latencia desarrollarán.

Algunos de los contaminantes comunes en las canales son (Sofos, 1994):

- Deterioradores: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*.
- Patógenos: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, grupos patógenos de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, entre algunos otros que provienen de la microflora intestinal y del medio ambiente.

La contaminación de la carne inmediatamente posterior al sacrificio podría ser de entre $10^1 - 10^5$ UFC/g de mesófilos aerobios y para las enterobacterias de $10^1 - 10^2$ UFC/g. Estos contaminantes comunes generalmente provienen de la microbiota intestinal propia del animal o del medio ambiente (Norjke *et al.* 1990, Fukushima, 1991).

Nuevas técnicas de preservación de carne.

Los consumidores basan su compra en parámetros sensoriales como el color y aroma, lo que no permite detectar un peligro a la salud, es decir el hecho de que el aspecto de la carne sea bueno no significa que no haya presencia de patógenos en el producto; sin embargo los encargados de comercializar la carne deben de asegurar que el producto llegue en óptimas condiciones al consumidor. Rossvoll *et al.* (2014), observaron el comportamiento de los consumidores, cuando les presentaron dos productos carne de hamburguesa almacenada en 75% O₂ y otra almacenada a vacío tanto cruda como cocinada los consumidores eligieron la carne que estaba en oxígeno ya que percibieron un color más agradable.

En consecuencia, para asegurar la calidad alimentaria, se necesitan aparte de los métodos convencionales, nuevas tecnologías de conservación que permitan mantener el alimento en óptimas condiciones, con lo cual su vida de anaquel y el riesgo al consumidor sean menores.

Se están utilizando envasado a vacío, atmósferas modificadas, además de la recomendación de mantener a la carne a temperatura de refrigeración (4-8 °C) y cocinarla hasta los 65-69 °C (Ulbin, 2015).

Corliss *et al.* (2015) inocularon 7 serotipos (O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145) de la bacteria *E. coli* (10^6 UFC/g) en filetes de res y los cocinaron a diferentes temperaturas 50, 60, 71 y 85 °C, sin embargo las cepas O103, O111, O145 y O157 sobrevivieron en la carne cocinada hasta los 71 °C.

Swart *et al.* (2015), inocularon 6.6 UFC/g de los serotipos O26, O45, O103, O104, O111, O121 y O145 de *E. coli*, en filetes congelados que pesaban 64g, los cocinaron durante 3.5 min en 30 ml de aceite de oliva a una temperatura de 191.5 °C, colocando uno doble y uno normal, las temperaturas internas fueron para el normal de 59.8 a 94.7 °C y para el doble de 40.3 a 82.2 °C con lo que se logró la reducción de 5 UFC/g y colocaron también un filete envuelto en aluminio en la misma plancha, el cual mostró una reducción de los serotipos total.

Las altas presiones (HPP) se utilizan como método de conservación. Hsu *et al.* (2015), lo utilizaron en carne de res a la cual le habían inoculado los siguientes serotipos de *E. coli*, O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145, la temperatura la mantuvieron de 4 a 7 °C temperatura de refrigeración, las conclusiones obtenidas por ello fueron que a una presión de 300 MPa durante 30 min, inactiva más de 3 log UFC/g, y el serogrupo más difícil de erradicar fue el O157.

Los gases nobles como el argón y el helio también se están utilizando como métodos de conservación ya que hacen disminuir la presión interna de la célula y producen lisis siempre y cuando le pasen cierta corriente eléctrica así lo describe Ulbin *et al.*, 2015, el cual vio reducción 2 UFC/g de *E. coli*, tratándola con helio por 5 minutos (Ulbin *et al.* 2015).

Brotos de *E. coli* producidos por la ingesta de carne de res

Las toxinas producidas por la bacteria *E. coli* O157:H7 causan enfermedades en humanos, mientras que en el ganado son parte de la flora normal de su tracto intestinal, es decir es un reservorio natural de algunos grupos patógenos de *E. coli*. En ocasiones las personas que están en contacto con ganado llegan a enfermar porque se exponen al patógeno y la bacteria sobrevive en ese ambiente, para este efecto se recurre a vacunas que disminuyen el riesgo de enfermedad pero no la eliminan (Smith, 2014).

Antecedentes

En abril de 2011 se presentó un brote en Japón el cual dejó a 86 personas enfermas el 47% experimentó síntomas de SHU, el 24% de encefalopatía y el 6% murió, el producto implicado fue carne cruda de res, donde el serotipo identificado fue O111, los casos de encefalopatía se dieron en niños de 5 a 9 años (Yahata *et al.* 2015).

En Holanda se recopilaron datos de 2008 a 2012, se presentaron 130 casos de síntomas de SHU y los productos implicados fueron salchichas, carne de res y el contacto con ganado bovino (Friesema, 2015).

En 2013 se registró un brote de *E. coli* O157:H7 en Quebec Canadá, en el cual hubo 7 enfermos, 2 necesitaron hospitalización, no hubo víctimas y el responsable del brote fueron tartas de carne de res y ternera (Gaulin, 2015).

El 18 de Octubre de 2013 se registró un brote de enfermedad en Estados Unidos, se confirmaron 14 casos y 10 más probables de infección por *E. coli*, el serotipo implicado fue el O157:H7 y el producto implicado fue carne de hamburguesa (Torso *et al.* 2015).

Las cepas identificadas de *E.coli* en la carne de bovino han sido del grupo STEC las cuales producen malestares gastrointestinales y en casos severos el SHU, así lo explica Hussein, 2007, en donde la tasa de prevalencia de sus muestras osciló entre el 0.1 y el 54% para *E.coli*

Inocuidad alimentaria

La poca educación sobre el tema, la ignorancia y las ineficientes normas de higiene, aunados a que el propio ganado puede sufrir contaminación por sí mismo, supone un riesgo a la seguridad alimentaria, sin embargo con mejores técnicas en el sacrificio y faenado, y programas como el sistema de análisis de puntos críticos y de control (HACCP), se podría mejorar la calidad microbiológica de la carne en canal y la carne que se comercializa (Besser *et al.* 2014).

Los alimentos insalubres generan un ciclo que se repite y afecta principalmente a las personas más débiles inmunológicamente como son los lactantes, niños pequeños, mujeres embarazadas y ancianos. La contaminación se puede

presentar en cualquier parte de la cadena de distribución, sin embargo, la mayoría de contaminaciones ocurren en casa, productos empaquetados y lugares donde se venden productos preparados, los manipuladores no entienden la importancia de las normas de higiene y el daño que se ocasiona a los consumidores (OMS, 2014).

Bogard *et al.* (2013), realizó un estudio en restaurantes ya que estos lugares son donde más brotes se han dado. Se analizaron datos de 385 restaurantes donde el 53% de los restaurantes presentaron problemas en su manufactura por malas prácticas higiénicas. Sólo el 1% utilizaba carne irradiada y el 29% los restaurantes dijo no conocer la carne irradiada.

Por otro lado, es reconocido al lavado de manos como un paso crucial en la elaboración de cualquier alimento Jensen *et al*, 2013, en donde el lavado de manos por 20 s con jabón es más efectivo que el lavado de manos sin jabón, con un 1.1 log UFC/g de reducción, el uso de un desinfectante debe ser crucial para evitar riesgos alimentarios.

Las normas en nuestro país deben ser más estrictas al respecto, los rastros municipales deberían llevar un sistema de sacrificio y manejo de la carne en base a los programas que presentan los rastros TIF; en cuanto a la población y a la comercialización de carne traspatio, por lo menos deberían recibir información sobre el manejo de los alimentos.

Resistencia a antibióticos y su impacto en la salud humana

Antes del descubrimiento de los antibióticos las enfermedades infecciosas ocasionaban innumerables muertes en el mundo; con el descubrimiento de la penicilina en la década de 1940, este problema disminuyó, y generó una revolución en la medicina ayudando a salvar millones de vidas. Lo anterior contribuyó al desarrollo de técnicas tan complejas como los trasplantes de órganos, sin embargo, después de casi 80 años del descubrimiento de los antibióticos surge un problema, las bacterias han evolucionado y han generado resistencia a antibióticos. La resistencia a antibióticos se puede definir como la sobrevivencia de la bacteria a concentraciones de antibiótico que matan a

bacterias de su misma especie pero no a estas nuevas cepas. Como ejemplo, *E. coli* en la década de 1980 todas las cepas eran sensibles a las fluoroquinonas, sin embargo tras casi 4 décadas en estos momentos el 34% de las cepas son resistentes a estos antibióticos (Alos, 2015).

Consumo y uso de antibióticos

Los antibióticos se utilizan contra agentes infecciosos de origen bacteriano sin embargo, el consumo desmedido en la población humana y animal ha provocado que ahora las dosis sean cada vez mayores o se utilicen antibióticos más fuertes (Torres, 2012).

Desde 1950 los antibióticos como la tetraciclina se ha utilizado como un promotor del crecimiento en animales de granja para el consumo humano, a pesar de las implicaciones que tiene el uso de antibióticos se siguen utilizando tanto como factores de crecimiento como en piensos para engorda, la Unión Europea prohibió esta práctica desde 2006 pero en países como Estados Unidos y todo centro y sur América se siguen ocupando estas malas prácticas que afectan a la salud humana (Torres, 2012).

La resistencia a antibióticos es un proceso irreversible, en el cual una vez que la bacteria ha desarrollado mecanismos de adaptación ya no es posible regresar al estado original, esto aunado a que en el mundo el desarrollo de nuevos fármacos es caro y el desarrollo de la investigación es lento se espera que en aproximadamente 10 años enfermedades por bacterias controladas vuelvan a retomar la importancia de décadas pasadas (OMS, 2002).

En los animales para consumo humano se debería tener un régimen más estricto en cuanto a la salud del animal y los aditivos o vacunas suministradas para su correcto desarrollo de lo contrario el problema de la resistencia a antibióticos tendrá efecto en los consumidores finales e impactara en la salud ocasionando enfermedad (OMS, 2002).

Objetivos

Objetivos

Objetivo general

- Determinar la presencia de microorganismos indicadores y grupos patógenos de *Escherichia coli* multi-resistentes a antibióticos en carne cruda de res obtenidas en carnicerías del estado de Hidalgo.

Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de coliformes fecales y *E. coli* genérica en carne molida de res obtenida de diferentes establecimientos.
- Determinar la presencia los grupos patógenos de *E. coli* en carne molida de res obtenida de diferentes establecimientos.
- Determinar la resistencia a antibióticos de los grupos patógenos de *E. coli* aislados e identificados.

Materiales y equipos

Materiales

Equipos

- ✓ Autoclave (Yamato sm 200)
- ✓ Balanza analítica (Mettler 2000)
- ✓ Cámara de electroforesis (pharma biotech)
- ✓ Campana de flujo laminar (Labconco class II)
- ✓ Equipos
- ✓ Fuente de electroforesis (amesher biosciencias)
- ✓ Incubadora bacteriológica (M Blue)
- ✓ Parrilla de calentamiento (Thermolyne)
- ✓ Refrigerador (Lab line)
- ✓ Termociclador (Techne)
- ✓ Transiluminador (UVP)
- ✓ Vortex genie 2

Material de laboratorio

- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Bolsas estériles
- ✓ Cajas petri gradillas
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Matraces Erlenmeyer

Materiales y equipos

- ✓ Mechero
- ✓ Micro pipetas
- ✓ Papel parafin
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Puntas estériles
- ✓ Termómetro
- ✓ Tubos de ensayo de 12x75
- ✓ Tubos de ensayo de 16x150
- ✓ Tubos eppendorf 1 ml
- ✓ Tubos eppendorf 50 ml

Reactivos

- ✓ Ácido nalidíxico
- ✓ Agar citrato Simmons (ACS)
- ✓ Agar eosina azul de metileno (AEB)
- ✓ Agar MacConkey (AMC)
- ✓ Agar métodos estándar (AMS)
- ✓ Agarosa grado biología molecular
- ✓ Amikacina
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Caldo lactosado (CL)
- ✓ Caldo verde brillante (CVB)
- ✓ Cloranfenicol
- ✓ Diluyente de peptona (DP)
- ✓ Enzima taq polimerasa
- ✓ Eritromicina
- ✓ Estreptomicina
- ✓ Iniciadores
- ✓ Kanamicina
- ✓ Medio Vogues Proskauer (VP)
- ✓ Reactivo de Kovac

Materiales y equipos

- ✓ Regulador de carga
- ✓ Regulador tris boratos
- ✓ Rojo de metilo (RM)
- ✓ Tetraciclina

Metodología experimental

Obtención de las muestras de carne molida

Se recolectaron 100 muestras de 300g cada una procedente de distintos establecimientos que comercializan carne en el estado de Hidalgo. Las muestras se recolectaron en bolsas estériles, se transportaron al laboratorio en hielera y se analizaron dentro de las dos primeras horas posterior a su obtención.

Preparación de la muestra

Se pesan 100g de muestra en condiciones asépticas, y posteriormente se le adicionan 500 ml de caldo lactosado (CL) y se homogenizó por 2 min manualmente.

Determinación de coliformes fecales

Después de la homogenización, a partir de cada muestra (bolsa) se realizaron diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}); 1 ml de cada dilución se inoculó por triplicado en tubos conteniendo 9 ml de CL conteniendo campanas de Durham y se incubaron por 24 h a 37 °C. Los tubos que mostraron turbidez y presencia de gas en la campana Durham se sembraron (una asada) en tubos conteniendo 3 ml de caldo bilis verde brillante (CVB) con campana de Durham y se incubaron por 24-48 h a 44.5 °C. Los tubos con desarrollo y producción de gas en la campana, se toman como positivos para coliformes fecales. La concentración de coliformes fecales que se encontró por muestra se reportó como el número más probable (NMP) por g (US-FDA, 2013).

Identificación de *Escherichia coli*

Para la identificación de *E. coli*, a partir de cada uno de los tubos positivos a coliformes fecales, se sembraron cajas de petri conteniendo agar, eosina, azul de metileno (EMB) y se incubaron a 35 °C por 24 h. A partir de cada caja de EMB, se tomaron entre 2 a 3 colonias típicas de *E. coli* y se sometieron a las pruebas bioquímicas IMVIC (Tabla 6) (US-FDA, 2013).

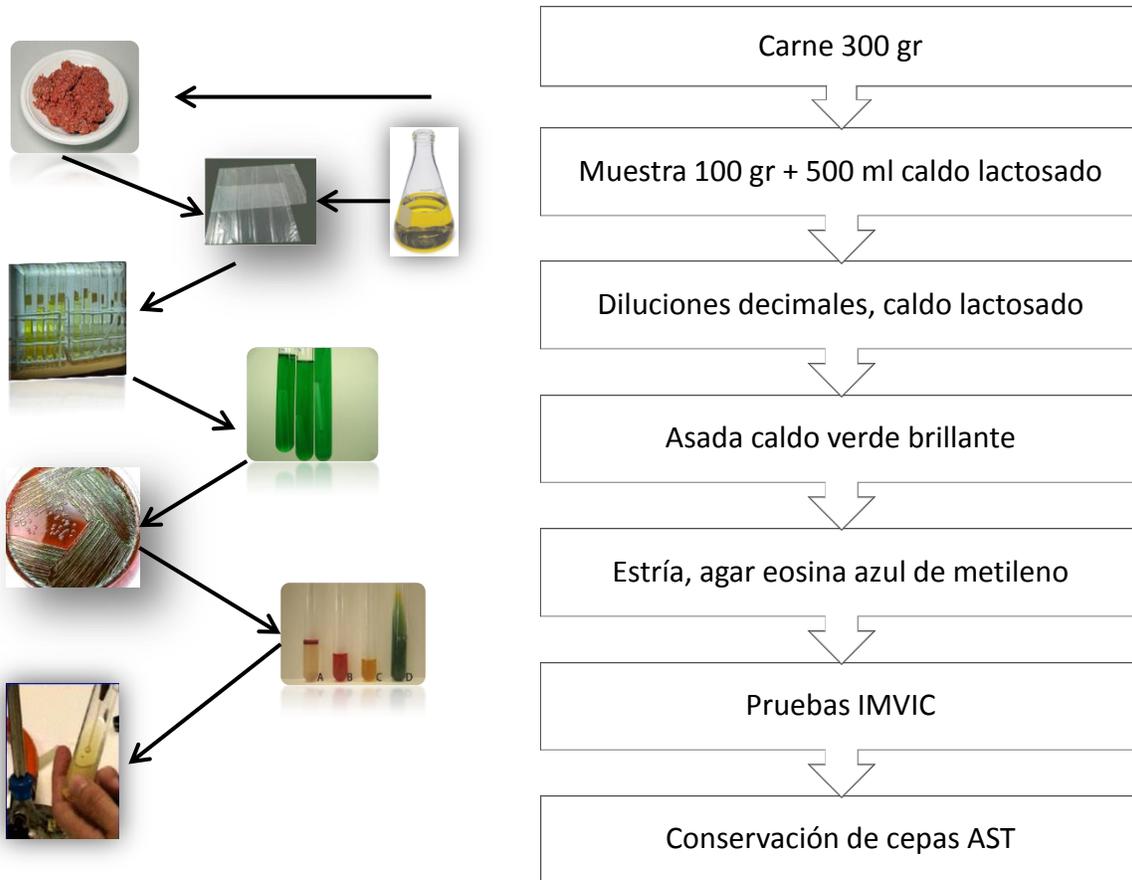
Tabla 6 Pruebas bioquímicas para la confirmación de cepas de *E. coli* en las muestras de carne analizadas.

Prueba	Perfil bioquímico	Confirmación de la prueba
IMVIC Indol	+	Formación de anillo rojo en la superficie, posterior a la adición del reactivo de Kovac
Rojo de metilo	+	El tubo de ensayo se torna rojo, al adicionar rojo de metilo
Citrato Simmons	-	El medio debe permanecer en verde, si se torna azul es una prueba positiva
Vogues Proskauer	-	No debe ocurrir ningún cambio de color tras la adición de NaOH.

La concentración de *E. coli* que se encontró por muestra se reportó como el número más probable (NMP) por g (US-FDA, 2013).

Las cepas confirmadas como *E. coli* se sembraron en tubos conteniendo agar soya tripticaseína (AST) inclinado y se incubaron a 35 °C por 24 h. Los tubos se guardaron en refrigeración hasta su uso para la determinación de genes de patogenicidad. A estas cepas se les determinó la presencia de genes de patogenicidad en la ilustración 2 se puede ver el esquema de la marcha para la obtención de las cepas de *E.coli*.

Imágenes 1 proceso de obtención de cepas confirmadas de E. coli a partir de carne molida



Identificación de grupos patógenos de *Escherichia coli* mediante PCR multiplex (López-Saucedo *et al.* 2003)

Obtención de DNA de las cepas de *E. coli*

Para identificar las cepas patógenas mediante la PCR multiplex se extrajo el DNA, de cada cepa bacteriana mediante el siguiente procedimiento:

- Las cepas que se encontraban en AST se resembraron en Agar Mac Conkey (AMC) mediante la técnica de estría y se incubaron a 37°C/24 h.
- Después de la incubación se tomó una colonia completa con un asa y se depositó en tubos eppendorf conteniendo medio mililitro de agua,
- El tubo se agitó en vórtex por 20 s y se coloca en baño maría con agua hirviendo durante 2 minutos
- Finalmente los tubos se colocaron en recipiente con hielo y se dejan en congelación hasta su uso.

Obtención de DNA de los controles positivos Cepas de referencia

La mezcla de referencia se realizó, empleando cepas ya confirmadas de grupos patógenos de *E. coli* (López - Saucedo *et al.* 2003):

- ETEC H10407 (078:H11)
- EPEC E2348-69 (0127:H6)
- EHEC/STEC EDL933 (0157:H7)
- EIEC E11 (0124NM)

Controles positivos en el análisis por PCRm, basado en López *et al* 2003

Obtención de la mezcla de iniciadores

Los iniciadores utilizados se seleccionaron de acuerdo a lo que establecieron López – Saucedo *et al.* (2003) y así poder diferenciarlos en base a tamaño, se necesita una amplificación específica para poder determinar los genes de

patogenia, la secuencia a amplificar de cada grupo patógeno de *E. coli* se muestra en la Tabla 7.

Preparación de los iniciadores para la reacción PCR multiplex

Cada iniciador se debe suspender a una concentración “stock” de 100µM, considerando que el fabricante reporta en nmol, se debe ajustar la concentración con la formula siguiente: $V0 * C0 = V1 * C1$

Preparación de la mezcla de reacción

Se mezclan 100 µL de los iniciadores forward y reverse con 900µL de agua estéril en una dilución 1-10, enseguida en un micro tubo estéril se adicionan 100µL de la solución forward y reverse y a continuación se le añaden 800 µL de agua estéril, de esta se toma el volumen de 3.5µL para la mezcla de reacción en el PCR.

Tabla 7 Secuencia a amplificar para cada grupo patógeno de *E. coli*

Cepas de referencia <i>E. coli</i>	Gen	Secuencia de oligonucleótidos de iniciadores	Pares de bases (Pb)
ETEC	Lt	F: 5´-GGCGACAGATTATACCGTGC-3´ R: 5´ CGGTCTCTATATTCCCTGTT 3´	450
ETEC	St	F: 5´ ATTTTCTTTCTGTATTGTCTT 3´ R: 5´CACCCGGTACAAGCAGGATT 3´	190
EIEC	lal	F: 5´ GGTATGATGATGATGAGTCCA 3´ R: 5´GGAGGCCAACAAATTATTTCC 3´	650
EPEC	bfpA	F: 5´ AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC 3´ R: 5´ GCCGCTTTATCCAACCTGGTA 3´	324
EPEC/STEC	eaeA	F: 5´ GACCCGGCACAAGCATAAGC 3´ R: 5´CCACCTGCAGCAACAAGAGG 3´	384
STEC	Stx1	F: 5´CTGGATTTAATGTTCGCATAGTG 3´ R: 5´AGAACGCCCACTGAGATCATC 3´	150
STEC	Stx2	F: 5´GGCACTGTCTGAAACTGCTCC 3´ R: 5´TCGCCAGTTATCTGACATTCTG 3´	255

Se mezclaron distintos volúmenes de iniciadores a continuación se explica:

- 100 micro litros (µL) de iniciadores Forward (F) y Reverse (R) con 900µL de agua estéril dilución (1:10) en un micro tubo.
- Se tomaron 100µL del iniciador R y se le adicionaron 800µL de agua estéril.
- Se tomaron 100µL del iniciador L y se le adicionaron 800µL de agua estéril.

Lo anterior se realizó a cada uno de los iniciadores.

Para finalizar en un microtubo se mezclaron diferentes volúmenes de los iniciadores, de la mezcla final se tomaron 3.5µL para la realización de la PCR multiplex.

En la Tabla 8 se muestra la relación volumen/concentración de los 7 pares de iniciadores, para la realización del PCR multiplex

Tabla 8 Relación entre volúmenes y concentraciones de los iniciadores para cada gen de virulencia

Gen virulencia	Iniciadores diluidos (mM)	Volumen (µL)	Concentración final (27µL)
<i>lal</i>	lal F-R	296	2.96µM
<i>Lt</i>	Lt F –R	148	1.48µM
<i>eaeA</i>	eaeA F-R	111	1.11µM
<i>bfpA</i>	bfpA F-R	74	0.74µM
<i>Stx2</i>	Stx2 F – R	111	1.11µM
<i>Stx1</i>	Stx1 F – R	74	0.74µM
<i>St</i>	St F – R	185	1.85µM

Preparación de dNTP´s

La suspensión de dNTP´s se prepara a una concentración de 200 µM de cada nucleótido: dATP, dCTP, dGTP y dTTP, de la suspensión se toman 2 µL para la reacción de PCRm.

Se colocan en un tubo 900 µL de agua estéril más 25 µL de cada iniciador la concentración final es de 2.5 Mm y cada uno de los dNTP´s queda diluido 40 veces.

La mezcla de reacción o mezcla maestra se describe en la tabla 9 aclarando que todos los reactivos se deben adicionar de acuerdo al orden de la tabla.

Tabla 9 Mezcla de reacción utilizada para correr en el termociclador

Reactivo	Volumen (μL)
Agua estéril	14 μL
Regulador 10x	2.5 μL
MgCl	1.0 μL
dNTPs	2.0 μL
Mezcla de iniciadores seleccionados	3.5 μL
Enzima Taq polimerasa	0.2 μL
DNA muestras	2.0 μL

*El DNA de las muestras se coloca al final de la lista de reactivos para obtener un volumen de 25 μL .

Reacción de PCR multiplex

La reacción de PCR multiplex se llevó a cabo en microtubos estériles de 0.2 ml, se colocaron 23 μL de la mezcla de reacción anteriormente descrita y se adicionó 2 μL de DNA procedente de las muestras, el volumen final es de 25 μL , esto se realizó para cada una de las muestras analizadas, para el control positivo se adicionaron 4 μL de DNA de las cepas patógenas confirmadas y para el control negativo se adicionaron 2 μL de agua estéril, los tubos se colocaron en el Termociclador que corrió de acuerdo a las condiciones del programa descrito (tabla 10) por López – Saucedo *et al.* (2003).

Tabla 10 Ciclos del termociclador para la obtención de la ampliación del segmento de DNA a analizar

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Precalentamiento	50	2	1
Desnaturalización de DNA	95	5	1
Alineamiento de primers y síntesis de DNA	95	45	40
	50	45	
	72	45	
DNA terminación	72	10	1

Electroforesis en gel de agarosa

Preparación de la agarosa para el gel

El gel se preparó con agarosa grado biología molecular al 2.5%, para ello:

En un matraz se adicionaron 40 ml de regulador tris boratos EDTA (TBE) al 5x.

1. Se adicionó 1g de agarosa
2. El matraz se colocó en una parrilla de calentamiento, hasta que la agarosa se disolviera en el TBE, cuidando que no se sobrecalentara.
3. Se retiró de la parrilla y se verificó que el matraz no contuviera burbujas, se procedió a adicionar 2.4µL de bromuro de etidio.
4. Finalmente el contenido del matraz se vertió en la cámara de electroforesis con 18 pozos, el gel se dejó solidificar por 10 minutos.

Electroforesis

Para el análisis, el gel se colocó en la cámara de electroforesis, y se adicionó regulador TBE 0.5x hasta cubrir la superficie del gel.

Con la micropipeta se llenaron los pozos; en el primer pozo se colocó 6µl del marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en el segundo se colocó el control negativo con 6µL, en el tercero el control positivo con 6µL y en los pozos subsecuentes se colocaron las muestras a analizar, con el mismo volumen.

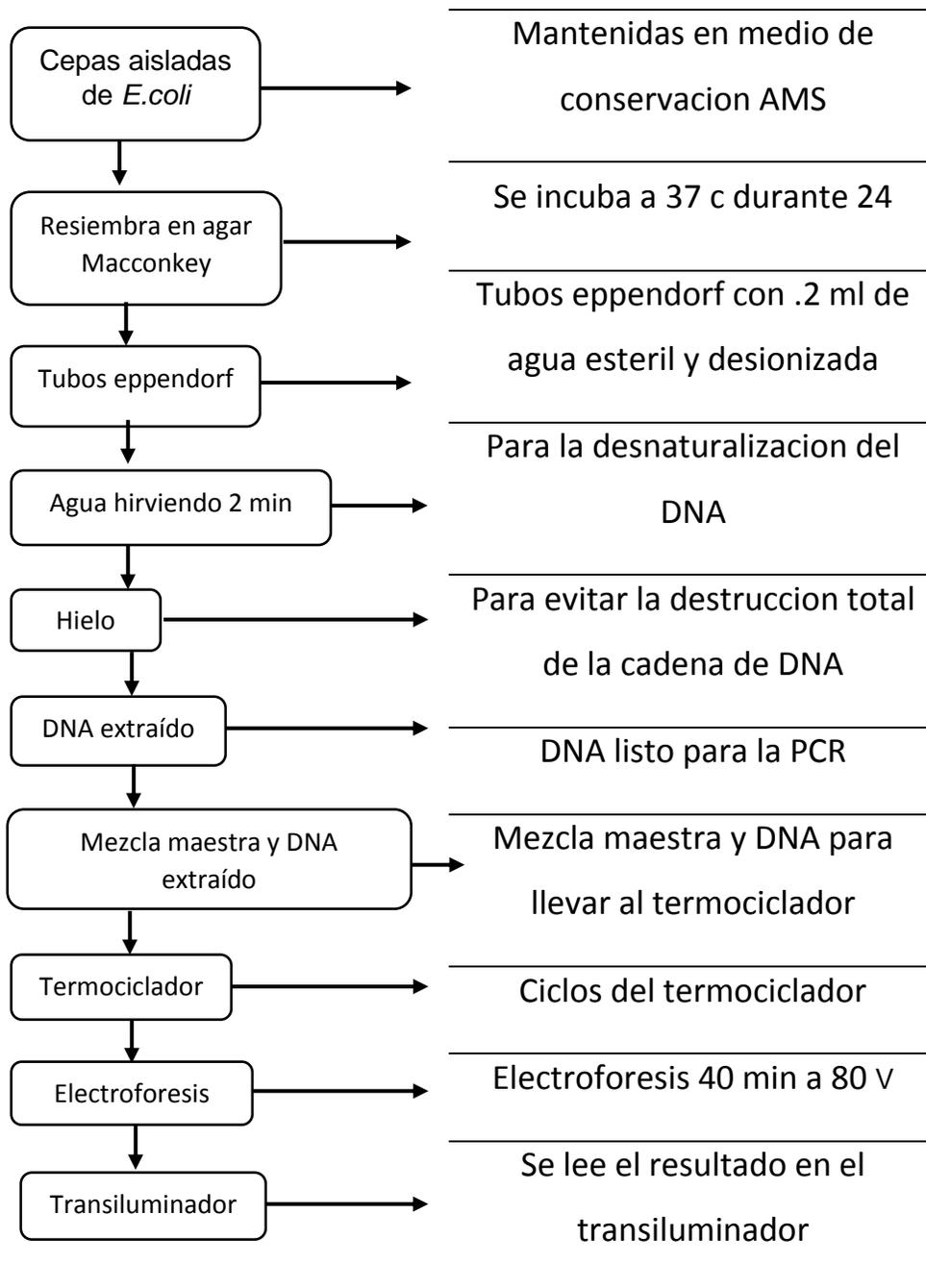
Metodología experimental

Nota: para las muestras y controles se colocó 1µL de buffer de carga y 5µL de muestra, todo se realiza con guantes para evitar la contaminación de las muestras.

Al terminar de llenar los pozos del gel se conectaron los electrodos a la fuente y se programó a 80 mA a 100 V por 40 min.

Transcurrido el tiempo los geles se colocaron en el Transiluminador para comparar las bandas formadas y así identificar a los grupos patógenos de *E. coli*.

En el siguiente esquema se observa la marcha para la identificación de los grupos patógenos de *E. coli*.



Imágenes 2 metodología utilizada para el grupo patógeno

Prueba de resistencia a antibióticos, por la técnica de difusión en disco de papel.

Para llevar a cabo la prueba de resistencia a antibióticos se usaron los antibióticos que se citan en la Tabla 11. La preparación de las soluciones / concentraciones se realizó para un volumen final de 10 mL para cada una. Las soluciones preparadas se conservaron en refrigeración y protegidos a la exposición de la luz.

Las cepas de los grupos patógenos de *E. coli* aisladas de las muestras de carne se cultivaron en caldo soya tripticaseína (CST) a 35 °C por 24 h. Cada cultivo de las cepas patógenas de *E. coli* en CST se diluyó 1 vez de manera decimal en tubos conteniendo 9 mL de diluyente de peptona, de estos tubos se tomó 0.1 mL y se extendió con varilla en la superficie de agar Muller-Hinton previamente solidificado. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro con 5 mm de diámetro. Sobre cada disco se colocaron 10 µL de cada uno de los antibióticos. Las cajas se incubaron a 35 °C por 24 h. Después de la incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición formados de acuerdo a las especificaciones establecidas por el “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” (CLSI, 2012).

Tabla 11 Antibióticos utilizados en la prueba de resistencia a antibióticos por difusión en disco de papel

Antibiótico	Solvente	Concentración (µg/mL)
Ácido nalidíxico	½ Agua destilada estéril + NaOH 1 mol/L	30
Amikacina	Agua destilada estéril	30
Cloranfenicol	Etanol 95%	30
Eritromicina	Agua destilada estéril	15
Estreptomicina	Agua destilada estéril	10
Kanamicina	Agua destilada estéril	30
Tetraciclina	Agua destilada estéril	30

Resultados

Coliformes fecales

Se muestran en principio los resultados de los conteos de coliformes fecales (Tabla12).

Tabla 12Conteo de coliformes fecales en las muestras analizadas

Microorganismos identificados	Mínimo	Media	Máximo	% de muestras positivas
Coliformes fecales (NMP/gr)	≤3	219.35	≥1100	87(100)

El análisis de los coliformes fecales (CF) arroja datos variados, desde muestras que presentaron el máximo valor con >1100 UFC/gr de carne analizada hasta muestras que presentaron el valor de <3 UFC/gr de carne analizada.

Análisis de *Escherichia coli*

Mientras para el análisis de *E. coli* su frecuencia en todas las muestras analizadas fue también del 87%, este porcentaje, con un valor de media menor (tabla 13). Los contaminantes microbianos anteriores pueden llegar a la carne en diferentes puntos, desde el sacrificio, durante el procesamiento de la carne y/o durante la venta, hasta llegar al consumidor final, los resultados de conteos totales para todo el muestreo realizado se observan en la tabla 14.

Tabla 13 resultados totales de muestreos por comercio, conteo de coliformes fecales, *E. coli* y *E. coli* patógena con sus respectiva mediana, máximo y mínimo

Establecimiento	Numero de muestras	Microorganismo o indicador	Min (UFC/gr)	Mediana (UFC/gr)	Máximo (UFC/gr)	*%Frecuencia
A	15	Coliformes fecales	27	107	300	93.7
		<i>E. coli</i>	1.4	9.2	38	86.7
		<i>E. coli</i> patógena	4.05	15.5	42	26.7
B	9	Coliformes fecales	8.85	39	137	100
		<i>E. coli</i>	4.6	23	94	100
		<i>E. coli</i> patógena	1.35	8.2	28	66.7
C	14	Coliformes fecales	13.5	43	300	100
		<i>E. coli</i>	8.7	31.5	94	100
		<i>E. coli</i> patógena	5.05	18.7	66	42.8
D	11	Coliformes fecales	8.7	28.5	94	90.9
		<i>E. coli</i>	1.3	7.4	20	63.6
		<i>E. coli</i> patógena	1.4	6.2	9.5	27.2
E	15	Coliformes fecales	8.7	38	110	100
		<i>E. coli</i>	1.25	6.7	18	93.3
		<i>E. coli</i> , patógena	1.4	9.2	38	33.3
F	11	Coliformes fecales	18	93	420	100
		<i>E. coli</i>	1.2	6.2	18	100
		<i>E. coli</i> patógena	3.6	9.4	38	45.4
G	15	Coliformes fecales	37	120	420	100
		<i>E. coli</i>	4.6	23	94	93.3
		<i>E. coli</i> patógena	0.17	3.6	18	53.3
H	10	Coliformes fecales	4.6	23	42	70
		<i>E. coli</i>	1.4	9.2	38	60
		<i>E. coli</i> patógena	1.4	9.2	38	30

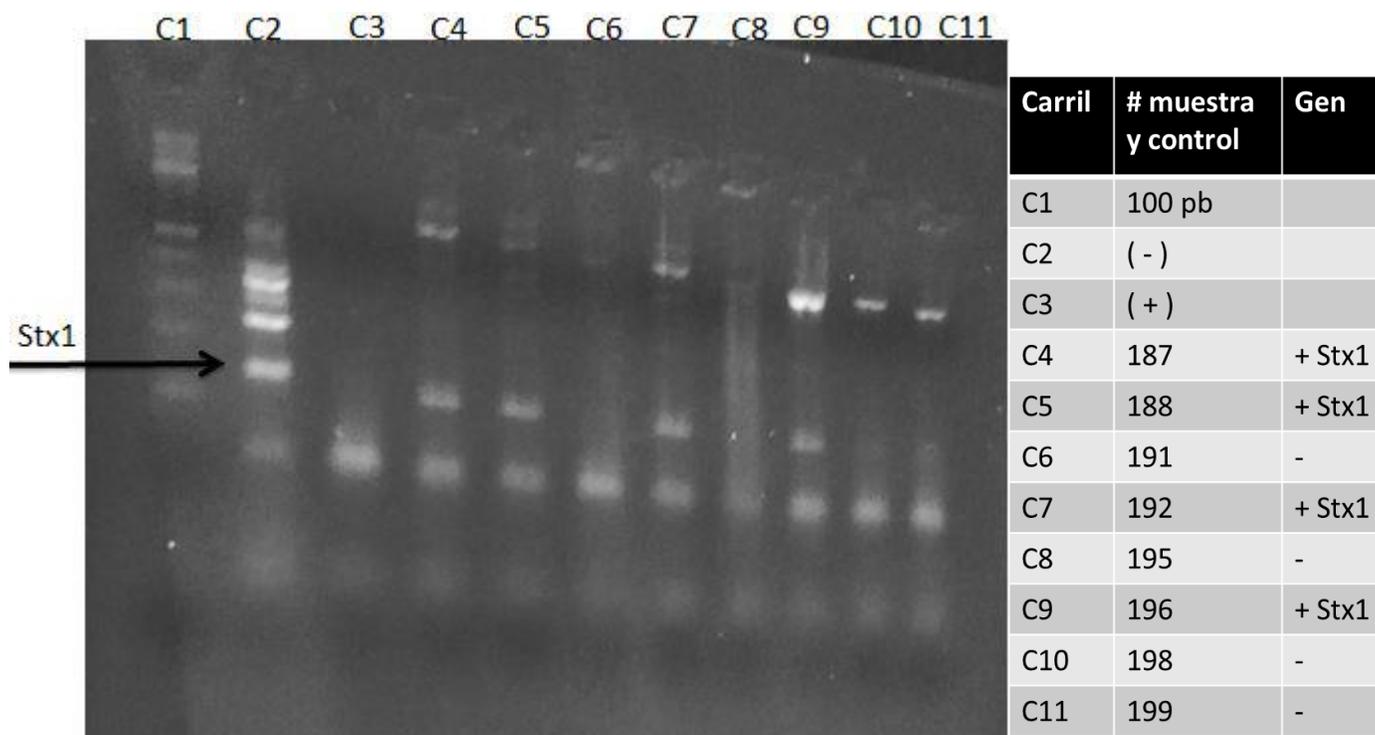
*Frecuencia positiva con respecto a las muestras analizadas.

Tabla 14 Valores de UFC/gr para todo el muestreo

Microorganismo o indicador	Mínimo (UFC/gr)	Media (UFC/gr)	Máximo (UFC/gr)	Frecuencia (%)
Coliformes fecales	55.18	227	677	95
<i>Escherichia coli</i>	13.01	51.8	163	88
<i>Escherichia coli</i> patógena	5.9	21.6	55	40

Identificación de *Escherichia coli*

De las 100 muestras de carne analizadas, se aislaron 298 cepas de *E. coli* para la posterior identificación de GPE. Para su identificación se utilizó la técnica de PCR multiplex, lo primero que se realizó fue el barrido de las 298 cepas aisladas, posteriormente se descartan las cepas que no mostraron bandas y las cepas que mostraron grupos patógenos se vuelven a analizar en un último barrido para poder identificar correctamente al gen de virulencia y así conocer el grupo patógeno al que pertenecen. En la siguiente ilustración 4 se muestra el gel número 4 de los 16 que se corrieron así como los carriles y las cepas que resultaron positivas para los genes de virulencia los resultados entre las cepas aisladas y las cepas patógenas se muestra en la tabla 15.



Imágenes 3Gel #4 de 16 en el barrido general a las cepas positivas de *E. coli* a algún gen patógeno

Resultados de cepas de *E. coli* identificadas mediante PCR

Tabla 15 Cepas de *E. coli* aisladas, positivas a algún grupo patógeno y porcentaje por lugar de muestreo

Comercio	# muestras	Cepas aisladas	Cepas patógenas	(%)
A	15	43	13	30.23
B	9	33	14	42.42
C	14	71	25	35.11
D	11	22	6	27.27
E	15	35	12	40
F	11	31	18	58.06
G	15	54	27	50
H	10	11	6	54.54

En la tabla 16 se muestra el lugar de procedencia, el número de cepas positivas, los genes identificados y el grupo patógeno al que pertenecen.

Tabla 16 Número de cepas positivas gen y grupo identificado

Comercio	Cepas +	Gen identificado	Grupo patógeno
A	13	<i>stx1, stx2</i>	STEC
B	14	<i>stx1</i>	STEC
C	25	<i>stx1, tx2</i>	STEC
D	6	<i>stx2</i>	STEC
E	12	<i>st, stx1, stx2 y eaeA</i>	ETEC, STEC, EPEC
F	18	<i>stx1</i>	STEC
G	27	<i>st, stx1</i>	ETEC, STEC
H	6	<i>stx1, stx2</i>	STEC

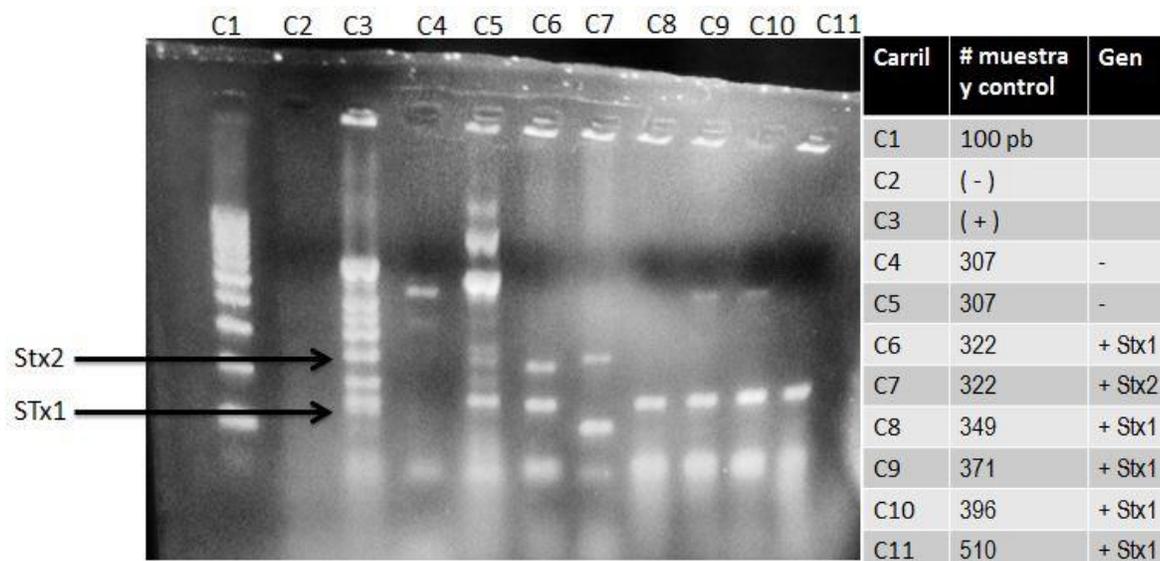
En total se aislaron 298 cepas de *E. coli*, de las cuales 121 fueron positivas para algún grupo patógeno, es decir el 40.6%. En la tabla 17 se muestran los GPE frente al porcentaje del gen patógeno, del total de cepas identificadas.

Tabla 17 porcentaje de gen de virulencia

GPE	% gen patógeno
<i>stx1</i>	77.31
<i>stx2</i>	29.41
<i>st</i>	8.40
<i>eaeA</i>	1.68

El porcentaje varía debido a las cepas con dos genes de virulencia.

Finalmente en la siguiente imagen se muestra uno de los últimos tres geles, los cuales se corrieron con un control positivo el cual nos permitió conocer si realmente era positivo o no.



Imágenes 4 Gel específico después del barrido general, para determinar a qué gen y grupo corresponden.

Resultados resistencia a antibióticos

Posterior a la identificación de los grupos patógenos de *E. coli* se procedió a realizar la prueba de resistencia a antibióticos. En esta prueba se evaluó a los siguientes antibióticos: kanamicina, ácido nalidíxico, estreptomina, cloranfenicol, eritromicina, amikacina y tetraciclina resultados completos en la tabla 18.

De acuerdo con lo obtenido el antibiótico que presentó mayor efectividad fue la kanamicina (8.3%), seguido por cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina (2.7%) y por ultimo ácido nalidíxico, estreptomina y amikacina (0%), cabe destacar que pocas cepas resultaron susceptibles o inhibidas por los antibióticos donde la mayoría de cepas resultaron ser resistentes a estas cepas en la tabla 18 se observan los resultados extendidos de las pruebas.

Tabla 18 Número de cepas de *E. coli* patógenas resistentes o sensibles a los antibióticos

Muestra	# cepas	Ka	Ac Na	Estrep	Clor	Eri	Ami	Tetra	%
2	2	R	R	R	R	R	R	R	100
3	5	R	R	R	R	R	R	R	100
7	3	R	R	R	R	R	R	R	100
15	5	R	R	R	R	R	R	R	100
16	4	R	R	R	R	R	R	R	100
18	1	R	R	R	R	R	R	R	100
19	4	R	R	R	R	R	R	R	100
21	2	R	R	R	R	R	R	R	100
24	5	R	R	R	R	R	R	R	100
30	3	R	R	R	R	SI	R	R	85.7
31	5	R	R	R	R	R	R	R	100
41	1	R	R	R	R	R	R	R	100
42	1	R	R	R	R	R	R	R	100
43	3	R	R	R	R	R	R	R	100
45	2	R	R	R	R	R	R	R	100
48	2	R	R	R	R	R	R	R	100
50	7	R	R	R	R	R	R	R	100
51	3	R	R	R	R	R	R	R	100
53	3	R	R	R	SI	R	R	R	85.7
54	2	R	R	R	R	R	R	R	100
55	1	R	R	R	R	R	R	R	100
61	2	R	R	R	R	R	R	R	100
63	5	R	R	R	R	R	R	R	100
65	5	R	R	R	R	R	R	R	100
66	3	R	R	R	R	R	R	R	100
71	5	R	R	R	R	R	R	R	100
72	2	R	R	R	R	R	R	R	100
78	2	SI	R	R	R	R	R	R	85.7
79	4	R	R	R	R	R	R	R	100
80	1	R	R	R	R	R	R	R	100
81	3	R	R	R	R	R	R	R	100
82	3	R	R	R	R	R	R	R	100
83	2	R	R	R	R	R	R	R	100
84	3	R	R	R	R	R	R	SI	85.7
91	4	R	R	R	R	R	R	R	100
92	3	R	R	R	R	R	R	R	100
94	1	NR	R	R	R	R	R	R	85.7
97	1	R	R	R	R	R	R	R	100
98	1	SI	R	R	R	R	R	R	85.7
99	5	R	R	R	R	R	R	R	100
Efectividad %		8.3	0	0	2.7	2.7	0	2.7	

Tabla de derecha a izquierda: muestra, numero de cepas por muestra, Kanamicina (Ka), ácido nalidixico (Ac Na), estreptomycin (Estrep), cloranfenicol (Clor), Eritromicina (Eri), Amikacina (Ami), tetraciclina (tetra), porcentaje de resistencia por muestra, última fila porcentaje de efectividad por cada uno de los antibióticos utilizados. R= resistencia, NR= No resistente, SI= Sensibilidad intermedia.

Discusión

Según la norma 194 de la secretaria de salud el límite máximo permitido de *E. coli* en carne molida de res es de 5000 UFC/gr, por lo cual todas las muestras entran dentro del parámetro, sin embargo el problema en este caso es que las muestras presentan genes patógenos, que producen enfermedades a humanos y además las cepas identificadas también poseen resistencia a antibióticos.

Jiménez *et al.* (2012), investigó la calidad microbiológica de la carne de res comercializada en un mercado de Culiacán Sinaloa, su estudio arrojó los siguientes resultados: de 108 muestras analizadas de carne de res, 34 fueron positivas para *E. coli* (31.5%), mientras que en 13 de 18 comercios es decir el 72.2%, se identificó por lo menos una ocasión al microorganismo, sus niveles de contaminación oscilaron entre 100 y 700 UFC/g de carne de res, comparando con nuestros resultados de 100 muestras analizadas de carne de res el 87% fueron positivas para *E. coli*, con lo cual se puede considerar que las condiciones de los establecimientos de una localidad a otra es muy diversa y se nota que existe menos cuidado en el manejo de la carne en nuestro lugar de estudio.

Es importante destacar que el grupo patógeno que predominó entre las cepas aisladas de la carne fue STEC. Este grupo ETEC se caracteriza por producir diversas toxinas, algunas de ellas conocidas como “*toxinas semejantes a las que produce Shigella*” del cual proviene el nombre del grupo en idioma inglés: “*Shiga-like-toxin-producing*” Las toxinas *Shiga* son responsables de un amplio espectro de enfermedades, algunas asintomáticas y otras que se complican como el síndrome urémico hemolítico (SHU); para evitar las complicaciones es necesario un diagnóstico rápido e iniciar el tratamiento con antibióticos y agentes anti-hemolíticos (Davis *et al.* 2014).

Este tipo de toxinas están presente en el grupo patógeno STEC. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógenos está directamente relacionada con la interacción del patógeno con los reservorios naturales y aspectos biológicos y culturales del huésped.

En años recientes la exposición e interacción del humano con éste grupo patógeno ha cambiado, entre otras cosas, debido al incremento en el consumo de vegetales crudos, trabajar en áreas rurales, visitas a granjas y el contacto persona a persona. Esto hace que la bacteria se propague; aunado a la intensificación de la venta de carne en canal, incremento de producción distribución y el comercio entre países, hacen que este tipo de enfermedades producidas por este grupo sea cada vez más difícil de controlar y se necesitan métodos de detección más rápidos para su oportuno tratamiento (Rivas *et al.* 2014).

El grupo STEC abarca un gran número de serotipos, algunos causan enfermedad y otros son asintomáticos los genes de virulencia son: *stx*, *stx1* y *stx2*, en combinación con el gen *eaeA* provoca casos graves de SHU (Feng, 2014).

En la región francesa de Normandía de 1992 a 2012 Brandal *et al.* (2015), dieron seguimiento a los casos asociados con el grupo patógeno STEC, en su mayoría domésticos, encontró que el serogrupo más frecuente fue el O157, mientras que los genes de virulencia asociados fueron el *stx2*, *eaeA* y *ehxA*, esto en pacientes con SUH.

En nuestro estudio el grupo patógeno mayormente encontrado fue el STEC y se encontraron genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*, esto quiere decir que estas cepas son capaces de enfermar a la población que consuma los productos.

Palmer *et al.* (2015) reporto sus resultados, después de analizar muestras ambientales en granjas y de carne molida que las cepas identificadas mediante PCR de *E. coli* contenían los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*, al respecto se identificaron los mismos genes patógenos con lo cual se puede considerar que son los genes de virulencia que prevalecen en la carne de bovino.

Mekata *et al.* (2014), reportaron que de 274 cepas de *E. coli* aisladas de carne cruda 176 cepas (64.2%) fueron positivas para al menos un gen de virulencia *stx1* o *stx2*. En nuestro estudio, el porcentaje global obtenido fue de 39.93% un valor menor; sin embargo, se puede corroborar que los genes detectados tanto en ese

estudio como en el nuestro son el *stx1* y *stx2*, sin embargo, también se detectaron genes de virulencia *eaeA*.

De igual manera Blanco *et al.* (2004), Identificaron 153 cepas STEC de *E. coli*, procedentes de ganado bovino de las cuales el 14% (22 cepas) dieron positivo para el gen *stx1*, 74% (113 cepas) para *stx2*, 12% (18 cepas) fueron positivas simultáneamente para los dos genes tanto *stx1* y *stx2*, mientras que el gen *eaeA* se detectó en el 24% (36 cepas), de igual manera, como se observa, los genes de mayor incidencia fueron *stx1* y *stx2*. Sin embargo, comparado con lo que se obtuvo en nuestro estudio se puede decir que la diferencia más significativa fue en el gen de virulencia *eaeA* el que solo detectamos en el 1.68% (2 cepas).

Después de analizar los diferentes estudios, y comparándolos con los resultados obtenidos, a pesar de que hay variabilidad en cuanto al porcentaje de identificación se puede apreciar que la tendencia es que los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, son los que se identifican mayoritariamente en la carne de bovino.

Para el análisis de antibióticos se realizó una comparación con diferentes estudios alrededor del mundo la comparativa se presenta en la tabla 19.

Tabla 19 Comparativa de diferentes estudios acerca de resistencia antibióticos

Autor año	Muestra	Antibiótico	% Resistencia
<i>Baloch et al. 2017</i>	Carne	Tetraciclina	73.1
	Ensalada	Amikacina	5
	Fideos		
<i>Ranjbar et al. 2017</i>	Carne	Tetraciclina	87.5
		Amikacina	75
		Estreptomicina	18.75
		Cloranfenicol	18.75
<i>Mwansa et al. 2017</i>	Pescado crudo	Estreptomicina	88.1
		Tetraciclina	91
		Ácido nalidíxico	93
		Cloranfenicol	81
<i>Songe et al.2017</i>	Personas	Ampicilina	100
	Enzimas	Ciprofloxacino	95.2
		Estreptomicina	88.1
		Tetraciclina	91
		Ácido nalidíxico	93
		Cloranfenicol	81
<i>Regumisa et al. 2016</i>	Pollo	Tetraciclina	52.7
		Cloranfenicol	1.5
<i>Stosic et al. 2016</i>	Agua	Tetraciclina	37.83
	residual	Estreptomicina	24.32
	Industria	Ácido nalidíxico	16.22
	cárnica	Cloranfenicol	13.51
<i>Jongman y Korsten 2016</i>	Vegetales de hoja verde	Tetraciclina	70.7
<i>Boonyasiri et al. 2014</i>	Humanos trabajadores en granjas	Ácido nalidíxico	20
		Ceftriaxona	72
		Ciprofloxacino	10
		Gentamicina	48
		Amikacina	10

Después de analizar los resultados obtenidos en diversas partes del mundo, los resultados recolectados durante nuestro estudio tienen una diferencia significativa en cuanto a resistencia a antibióticos con un porcentaje mayor en casi todos los casos sin embargo, a pesar de que el porcentaje de resistencia a los antibióticos es muy variable de una zona a otra, en la mayoría de los casos se coincide en que la tetraciclina, ácido nalidíxico, estreptomina, cloranfenicol y eritromicina casi no tienen efecto en las cepas patógenas de *E. coli*, y aunque la kanamicina y amikacina presenta un mayor efecto, tampoco se puede decir que son antibióticos recomendables para el tratamiento de grupos patógenos de *E. coli*.

El abuso en el uso de antibióticos, tanto por humanos y el utilizado en piensos para comida animal han provocado la aparición de cepas multiresistentes a los antibióticos, las cuales son un problema para la salud de humanos y animales en todo el mundo.

Es importante que el tratamiento de enfermedades ocasionadas por grupos patógenos de *E. coli* cuente con un perfil de resistencia a antibióticos para conocer el antibiótico más efectivo. La presencia de altos perfiles de resistencia a los antibióticos sugiere que los tratamientos utilizados para contrarrestar o controlar las infecciones, puedan tener poca o nula efectividad a los antibióticos, por lo que es primordial encontrar antibióticos con mayor eficacia, o algunas otras alternativas que puedan asegurar la inactivación de los patógenos.

Finalmente, los resultados indican que la carne molida de res comercializada en las carnicerías del Estado de Hidalgo, representa un vehículo potencial de enfermedades para la población local y para los visitantes. Esto debido a que diferentes muestras de carne molida de res estuvieron contaminadas con grupos patógenos de *E. coli*. Los patotipos de *E. coli* que se identificaron en la carne tienen potencial patogénico.

La prevención o disminución de los riesgos asociados con la presencia de grupos patógenos de *E. coli* en la carne molida de res, requiere la incorporación y la aplicación correcta de las buenas prácticas de higiene durante la matanza y en todo el proceso de producción de la carne, desde el campo a la mesa.

Por último, aunque el número de las muestras de carne molida de res analizadas en el presente estudio puede considerarse pequeña, se obtuvo suficiente información para poder concluir cuales son los grupos patógenos de *E. coli* con mayor frecuencia en la carne molida de res, así como los antibióticos a los que estas cepas son resistentes todo esto sin el cuidado necesario puede representa un peligro potencial para la salud pública en el estado de Hidalgo.

Conclusiones

1. Las muestras analizadas estuvieron dentro de los límites microbiológicos establecidos por la normativa de la Secretaría de Salud de México.
2. El 41% de las muestras analizadas estuvieron contaminadas con algún grupo patógeno de *E. coli*.
3. Los genes de virulencia mayormente identificados fueron los STX1, STX2 y *eaeA* en la carne de res.
4. El grupo patógeno aislado más frecuente es el STEC (77.31%).
5. En todos los establecimientos por lo menos una muestra fue positiva a algún grupo patógeno de *E. coli*.
6. En dos establecimientos se encontraron grupos como STEC, ETEC y EPEC.
7. Se identificaron 119 cepas patógenas de *E. coli*, de las cuales 113 presentaron resistencia kanamicina, ácido nalidíxico, estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, amikacina y tetraciclina. Las otras 6 cepas presentaron resistencia variada, no obstante cada una fue resistente a 6 antibióticos.
8. La presencia de cepas patógenas de *E. coli* multiresistentes a antibióticos en la carne molida demanda mayor vigilancia durante la matanza de los animales, transporte y comercialización de la carne ya que la presencia de estas cepas representa un mayor riesgo para la población que las cepas no resistentes a antibióticos.

Recomendaciones

La carne es un alimento necesario para la alimentación humana por su valor nutritivo y por los productos de los que es materia prima, la mejor recomendación es mantener la carne en refrigeración y por supuesto cocinarla hasta que en el centro de la carne la temperatura alcance los 70 °C, evitando la formación de una corteza dura que pueda proteger a las bacterias patógenas.

Se deben realizar pláticas con los operarios que manipulan la carne y en definitiva con cualquiera que manipule alimentos, para que comprenda el alcance que tiene el hecho de no seguir las recomendaciones acerca de la higiene en la preparación y venta de alimentos.

Bibliografía

1. Alonso J, L., Soriano A., Carbajo O., Amoros I., y Garelick H. (1999) Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. Appl. Environmental microbiology 65, Pp 3746 - 3749 18 ed
2. Alos, J. I. (2015) Resistencia bacteriana a los antibióticos una crisis global. Servicio de microbiología, hospital universitario de Getafe, Getafe, España
3. Antikainen J., Kantele A., Pakkanen S, H., Laaveri T, Riutta J., Vaara M., Kirveskari J. (2013) A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. Helsinki University hospital Laboratory, Department of bacteriology. Helsinki, Finland.
4. Aydin M., Herzing G, P., Jeong K, C., Dunigan S., Shah P., Ahh S., (2014) rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and ground beef using magnetic bead based immunoassay coupled with tyramide signal amplification. Department of molecular biosciences, Arkansas State Univesity, Jonesboro, Arkansas USA.
5. Baloch, A, B. Yang, H. Feng, Y. Xi, M, Wu, Q. Yang, J. He, X. Xiao, Y. Xia, X. (2017) precense and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in ready to eat foods in shaanxi, China. College of food science and engineering northwest , University, Yangling Shaanxi 72100 peoples. Republic of China.
6. Besser T, E., Schmidt C, E., Shah D, H., Shringi S. (2014) Preharvest food safety for *Escherichia coli* O157 and other pathogenic shiga toxin producing strains.
7. Blanco M, L. (2004) virulence genes and intimin types of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolotes from cattle and beef products in argentina. Departamento de microbiologia y parasitologia. Facultad de veterinaria. Universidad de Santiago Compostela. España.
8. Bogard A, K., Fuller C, C., Radke V., Selman C, A., Smith K, E. (2013) Ground beef handling and cooking practices in restaurants in eight states. Environmental health division, Minesota department of health. Minesota USA.

9. Boonyasiri, A. Tangkoskul, T. Seenama, C. Saiyarin, J. Tiengrim, S. Thamlikitkul, V. 2014. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals and the environment in selected areas in Thailand. Division of clinical epidemiology, department of research and development, faculty of medicine siriraj hospital, Mahidol university, Bangkok, Thailandia.
10. Brandal L, T., Wester A, L., Lange H., Lobersli I., Lindstedt B, A., Vold L., Kapperud, G. (2015) Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992 – 2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. Department of foodborne infections, the Norwegian institute of public health. Oslo Norway.
11. Byrne L., Jenkins C., Launders N., Elson R., Adak G, K. (2015) The epidemiology, microbiology and clinical impact of shiga toxin producing *Escherichia coli* in England, 2009 – 2012. Public health England department of gastrointestinal, emerging and zoonotic infections, centre for infections disease surveillance and control, London, UK.
12. Cervantes L, T, A., Chalte V, A., Tapia C, K. (2008) Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), Secretaria de salud pública.
13. Corliss B., Brooks J, C., Martin J, N., Echeverry A., Parks A. R., Pokharel S., Brashears M, M. (2015) The influence of beef quality characteristics on the internalization and thermal susceptibility of shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in blade tenderized beef steaks. Texas tech University, department of animal and food sciences. Texas, USA.
14. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. 3(32). USA: CLSI.
15. Davis T, K., Van de kar N, C., Tarr P, I. (2014) Shiga toxin/ verotoxin producing *Escherichia coli* infections: practical clinical perspectives.
16. Dewsbury D, M., Renter D, G., Shridhar P, B., Noll L, W., Shi X., Nagaraja T, G., Cernicchiaro N. (2015) Summer and winter prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157 in feces of feedlot cattle. Department of diagnostic medicine and

- pathobiology, college of veterinary medicine Kansas state University, Manhattan, Kansas, USA.
17. Escartín, F.E. (2000). Microbiología e inocuidad de los Alimentos. Querétaro: Universidad de Querétaro
 18. Erwing W, H. (1985) identification of enterobacteriaceae, 4 ed, Elsevier.
 19. FAO. (2011) Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos. www.fao.org/foodchain/es.
 20. Feng P. (2014) Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh produce a food safety dilemma.
 21. Feyisa, B. A. Teklu, F. A. Tora, E. Tafese, A. Genu, T. Kaba, T. Jibat, B. T. Beyene, T. Geloye, K. M. Tadesse. F. De zutter, L. Goddeeris, B. M. Cox, E. 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 in beef at butcher shops and restaurants in central Ethiopia. College of veterinary medicine and agriculture, addis ababa University, Bishoftu, Ethiopia.
 22. Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., ... & Wadl, M. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*, 365(19), 1771-1780.
 23. Friesema I, H., Schotsborg M., Heck M, E., Van pelt W. (2015) Risk factors for sporadic Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 and no O157 illness in the Netherlands, 2008 – 2012, using periodically surveyed controls. Centre for infections disease control, National institute for public health and environment (RIVM), bilthoven, The Netherlands.
 24. Fukushima (1991). Contamination of pigs with *Yersenia* at the slaughterhouse. *En: Fleischwirtschaft International*.
 25. Gaulin C., Ramsay D., Catford A., Bekal S. (2013) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with the consumption of beef and veal tartares in the province of Quebec, Canada, in 2013. Ministère de la Santé et des Services Sociaux , Québec, Canada
 26. Hernández, C., Aguilera, M.G. & Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Infec Microbiol*. 31(4), 138.

27. Herrera T, M, C., Montoya N, Y, A. (2012) Perfil epidemiológico de las enfermedades infecciosas intestinales. SINAVE y secretaria de salud.
28. Hsu H., Sheen S., Sites J., Cassidy J., Scullen B., Sommers C. (2015) Effect of high pressure processing on the survival of shiga toxin producing *Escherichia coli* (big six vs O157:H7) in ground beef. National Taiwan university, Taipei, Taiwan.
29. Hussein H, S., (2007) Prevalence and pathogenicity of shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. Pp 63 – 72.
30. Jensen D, A., Danyluk M, D., Harris L, J., Schaffner D, W. (2014) Quantifying the effect of hand wash duration, soap use, ground beef debris, and drying methods on the removal of enterobacter aerogenes on hands. Department of food science, Rutgers University, 65 Dudley Road, New Brunswick, New Jersey. USA.
31. Jimenez E, M. Chaidez Q, C, León F, J. (2012). Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. Facultad de ciencias químico biológicas. UAS. Culiacán Sinaloa.
32. Jongman, M. Korsten, L. (2016) Genetic diversity and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from different leafy green productions systems. department of plant science, faculty of natural and agricultural sciences, University of Pretoria, South Africa. Songe, M, M. Hang'ombe, B, M. Knight, T, J, D. Grace, D. 2017. Antimicrobial resistant enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* In houseflies fish in food markets in Zambia. Food safety and zoonoses program, Zambia international livestock research institute. Lusaka, Zambia.
33. Kennedy, C, A. Fanning, S. Karczmarczyk, M. Byrne, B. Monaghan, A, Bolton, D. Sweeney, T. 2017. Characterizing the multidrug resistance of non O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates from cattle farms and abattoirs. Cell molecular biology laboratory, school of veterinary medicine, veterinary science centre, University college Dublin, Dublin , Ireland.
34. Lopez-Saucedo, C., Cerna, J.F. Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Y Tarr, P.I., Y Estrada-Garcia, T. (2003) Single

- multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, 9(1), 127-131
35. Lozano, R, S, M. Varela, B, D. Medina, M, D, R. Carne de res. 2012. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
36. Luedtke B, E., Bono J, L., Bosilevac J, M. (2014) Evaluation of real time PCR assays detection and enumeration of enterohemorrhagic *Escherichia coli* Directly from cattle feces. U.S. department of agriculture, agricultural research service, Roman L. Hruska U.S. Meat animal research center, clay center. NE 68933 – 0166, USA.
37. Lung B, M., (2015) Microbiological food safety for vulnerable people. Institute of food research, Norwich, UK.
38. Mekata H., Iguchi A., Kawano K., Kirino Y., Kobayashi I., Misawa N., (2014) Identification of serotypes, genotypes and virulotypes of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates, including non O157 from beef cattle in Japan. Project for zoonoses education and research, faculty of agriculture, University of Miyazaki. Japan.
39. Messens W., Bolton D., Frankel G., Liebana E., Mclauchlin J., Morabito S., Oswald E., Threlfall E, J., (2015) Defining pathogenic verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) from cases of human infection in the European union, 2007 – 2010. Unit biological hazards and contaminants (BIOCONTAM), European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italia.
40. Molina, R. A. D. Mejía, A. M. C, Campuzano, A. A. Digiammarco, A. R.(2001). Industrias de carnes. Medellín: Universidad Nacional de Colombia Editores.
41. Mwansa, M, S. Hangombe, M, B. Knight J, D, T. Grace, D. (2017). Antimicrobial resistant enteropathogenic *Escherichia coli* and salmonella spp. In houseflies infest fish in food markets in Zambia. Food safety and zoonoses program, international livestock research institute, Zambia.
42. Nataro J.P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 11(1).
43. Nguyen V, D., Bennett S, D., Mungai E., Gieraltowski L., Hise K., Gould L, H. (2015) Increase in multistate foodborne disease outbreaks united states, 1973

- 2010. Division of foodborne, waterborne, and environmental diseases, the centers for disease control and prevention, Atlanta, Georgia.
44. Norjke G, L. (1990) A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. *En: Journal Food Proteins*. No. 53; p.411.
45. Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
46. Nyholm O., Halkilahti J., Wiklund G., Okeke U., Paulin L., Auvinen P., Haukka K., Siitonen A. (2015) Comparative genomics and characterization of hybrid shigatoxigenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) strains. Bacterial infections unit department of infectious diseases, national institute for health and welfare. Helsinki, Finland.
47. OMS (2014) Inocuidad de los alimentos. Nota descriptiva #399, Noviembre de 2014
48. OMS. (2000) *E. coli* O157 en Canada. www.who.int/csr/don/2000_05_30/en/
49. OMS. (2002) Estrategias mundial de la OMS para contener la resistencia a antimicrobianos. Ginebra, Suiza
50. OMS. (2004) Brotes epidémicos y enfermedades relacionadas con el agua. www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr67/es/index1.html
51. OMS. (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) nota descriptiva #125, diciembre de 2011.
52. OMS. (2011) síndrome hemolítico urémico. www.who.int/csr/don/2011_05_27/es/
53. OMS. (2013). Enfermedades diarreicas. Nota descriptiva #330. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/
54. Palmer C, E., Bratcher C, L., Singh M., Wang L. (2015) Characterization and survival of environmental *Escherichia coli* O26 isolates in ground beef and environmental samples. Department of animal sciences, Auburn University Auburn, AL, USA.

55. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (1976) Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Zaragoza, España.
56. Ranjbar, R. Masoudimanesh, M. Safarpour, D, F. Jonadi, J. N. Rahimi, E. (2017). Shiga verotoxing producing *Escherichia coli* isolated from hospital foods; virulence factors, o serogroups and antimicrobial resistance properties. Molecular biology research center , baqiyatallah university of medical sciences. Tehran Iran.
57. Rivas M., Chinen I., Miliwebsky E., Masana M. (2014) Risk factors for shiga toxin producing *Escherichia coli* associated human diseases.
58. Rodríguez A, G., (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológica México, DF.
59. Rodríguez S, I, P. Barrera S, H, A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa. Unidad de laboratorios de ingeniería y expresiones genéticas, departamento de bioquímica, Facultad de medicina UANL. Nuevo León. México.
60. Rossvoll E., Sorheim O., Heir E., Moretro T., Olsen N, V., Langsrud S. (2014) Consumer preferences, internal color and reduction of shigatoxicogenic *Escherichia coli* in cooked hamburgers. Nofima, Norwegian institute of food, fisheries and aquaculture research. As Norway.
61. Rugumisa, B, T. Call, D, R. Mwanyika, G, O. Mrutu, R, I. Luanda, C, M. Lyimo, B, M. Subbiah, M. Buza, J, J. (2016). Prevalence of antibiotic resistant fecal *Escherichia coli* isolates from penned broiler and scavenging local chickens in arusha, Tanzania. Department of health and biomedical sciences, school of life science and bioengineering Nelson Mandela African institution of science and technology, P.O. box 447. Arusha, Tanzania.
62. SAGARPA (2014) Consumos nacionales aparentes de carne de bovino de 1990 a 2005.
63. Smith D, R. (2014) cattle production systems: Ecology of existing and emerging *Escherichia coli* types related to foodborne illness. Mississippi state University college of veterinary medicine. Mississipi, USA.

64. Sofos, J. N. (1994) Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. "Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products". Chap. 14. Great Britain, UK
65. Stosic, M. Cucak, D. Kovacevic, S. Perovic, M. Radonic, J. Sekulic, M, T. Miloradov, M, V. Radnovic, D. (2016). Meat industry wastewater microbiological quality and antimicrobial susceptibility of *e. coli* and *salmonella* sp. Isolates, case study in Vojvodina, Serbia. Faculty of technical sciences, University of novi sad. Trg dositeja obbradovica, Sad, Serbia.
66. Swartz R, S., Luchansky J, B., Kulas M., Shoyer B, A., Shane L, E., Strasser H., Munson M., Porto fett A, C., (2015) Thermal inactivation of shiga toxin producing *Escherichia coli* cells within cubed beef steaks following cooking on a griddle. Pennsylvania state university, 201 old main. Pennsylvania, USA.
67. Terajima J, Iyoda S., Ohnishi M., Watanabe H. (2014) Shiga toxin (verotoxin) producing *Escherichia coli* in Japan.
68. Thomas M, J. Murray R., Flockhart L., Pintar L., Fazil A., Nesbitt A., Marshall B., Tataryn J. Y Pollari F.(2015) Estimates of foodborne illness related hospitalizations and deaths in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents. centre for food borne, environmental, and zoonotic infeccion diseases. Ontario. Canada.
69. Thorsteinsdottir, TR. Haraldsson, G. fridriksdottir, V. kristinsson K.G. Gunnarsson, E. 2010. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. Institute for experimental pathology, University of Iceland, Keldur, Reykjavik, Iceland.
70. Torres. D. C. M. (2012). resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Colegio de farmacéuticos de Zaragoza, Zaragoza, España.
71. Torso L, M., Voorhees R, E., Forest S, A., Gordon A, Z., Silvestri S, A., Kissler B., Schlackman J., Sandt C, H., Toma P., Bachert J., Mertz K, J., Harrison L, H. (2015) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with restaurant beef

- grinding. Office of epidemiology and biostatistics, Allegheny country health department, 542 fourth avenue Pittsburgh. Pennsylvania. USA.
72. Ulbin N., Jarmoluk A., Marycz K. (2015) Antimicrobial activity of low pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. Department of Animal Products Technology and Quality Management, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, Poland.
73. Ulbin-Figlewicz N., Jarmoluk A., Marycz K. (2014) Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. Department of Animal Products Technology and Quality Management, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, Poland.
74. US-FDA (United States Food and Drug Administration). 2013. Bacteriological analytical manual. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> [Mayo 17, 2017]
75. Vasqu ez A, J. Y Cabral M, A. (2002) La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. Departamento de biología y socioecon mica. Universidad Autónoma Agraria, Unidad Laguna, Coahuila. México.
76. Yahata Y., Misaki T., Ishida Y., Nagira M., Watahiki M., Isobe J., Terajima J., Lyoda S., Mitobe J., Ohnishi M., Sata T., Taniguchi K., Tada Y., Okabe N. (2015) Epidemiological analysis of large enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111 outbreak in Japan associated with haemolytic uremic síndrome and acute encephalopathy. National institute of infectious diseases, Tokyo, Japan.

Anexo 1 tabla de resultados completa

Tabla 20 Resultados completos

Cepa	Muestra #	Comercio	Gen de virulencia	GPE
77	16	A	Stx1	STEC
78	16	A	Stx1	STEC
79	16	A	Stx1	STEC
80	16	A	Stx1	STEC
628	79	A	Stx2	STEC
631	79	A	Stx2	STEC
632	79	A	Stx2	STEC
634	79	A	Stx2	STEC
821	100	A	Stx1	STEC
187	30	B	Stx1	STEC
188	30	B	Stx1	STEC
191	30	B	Stx1	STEC
348	48	B	Stx1	STEC
349	48	B	Stx1	STEC
467	61	B	Stx1	STEC
473	61	B	Stx1	STEC
645	81	B	Stx1	STEC
653	81	B	Stx1	STEC
736	91	B	Stx1	STEC
738	91	B	Stx1	STEC
739	91	B	Stx1	STEC
742	91	B	Stx1	STEC
765	94	B	Stx1	STEC
1	1	C	stx2	STEC
2	1	C	stx2	STEC
3	1	C	stx2	STEC
4	1	C	stx2	STEC
5	1	C	stx2	STEC
6	1	C	stx2	STEC
7	1	C	stx2	STEC
8	1	C	stx2	STEC
9	1	C	stx2	STEC
216	33	C	stx1	STEC
321	45	C	stx1, stx2	STEC
322	45	C	Stx1, Stx2	STEC
556	71	C	Stx1, Stx2	STEC
557	71	C	Stx1, Stx2	STEC

Anexos

558	71	C	Stx1, Stx2	STEC
562	71	C	Stx1, Stx2	STEC
563	71	C	Stx1, Stx2	STEC
747	92	C	Stx1, Stx2	STEC
748	92	C	Stx1, Stx2	STEC
749	92	C	Stx1, Stx2	STEC
806	99	C	Stx1	STEC
807	99	C	Stx1	STEC
808	99	C	Stx1	STEC
811	99	C	Stx1	STEC
814	99	C	Stx1	STEC
380	51	D	Stx2	STEC
382	51	D	Stx2	STEC
383	51	D	Stx2	STEC
564	72	D	Stx2	STEC
565	72	D	Stx2	STEC
788	97	D	Stx1	STEC
18	3	E	Stx1, St	STEC, ETEC
19	3	E	Stx1, St	STEC, ETEC
21	3	E	Stx1, St	STEC, ETEC
22	3	E	Stx1, St	STEC, ETEC
23	3	E	Stx1, St	STEC, ETEC
40	7	E	Stx2	STEC
41	7	E	Stx2	STEC
42	7	E	Stx2	STEC
70	14	E	eaeA	EPEC
71	14	E	eaeA	EPEC
106	21	E	Stx1	STEC
107	21	E	Stx1	STEC
636	80	E	Stx2	STEC
805	98	E	Stx2	STEC
85	18	F	Stx1	STEC
133	24	F	Stx1	STEC
134	24	F	Stx1	STEC
135	24	F	Stx1	STEC
136	24	F	Stx1	STEC
137	24	F	Stx1	STEC
288	41	F	Stx1	STEC
298	42	F	Stx1	STEC

Anexos

366	50	F	Stx1	STEC
367	50	F	Stx1	STEC
368	50	F	Stx1	STEC
369	50	F	Stx1	STEC
370	50	F	Stx1	STEC
371	50	F	Stx1	STEC
375	50	F	Stx1	STEC
396	53	F	Stx1	STEC
397	53	F	Stx1	STEC
399	53	F	Stx1	STEC
10	2	G	Stx1	STEC
11	2	G	Stx1	STEC
72	15	G	Stx1, St	STEC, ETEC
73	15	G	Stx1, St	STEC, ETEC
74	15	G	Stx1, St	STEC, ETEC
75	15	G	Stx1, St	STEC, ETEC
76	15	G	Stx1, St	STEC, ETEC
88	19	G	Stx1, St	STEC, ETEC
90	19	G	Stx1	STEC
92	19	G	Stx1	STEC
94	19	G	Stx1	STEC
195	31	G	Stx1	STEC
196	31	G	Stx1	STEC
198	31	G	Stx1	STEC
199	31	G	Stx1	STEC
201	31	G	Stx1	STEC
303	43	G	Stx1	STEC
307	43	G	Stx1	STEC
310	43	G	Stx1	STEC
311	43	G	Stx1	STEC
413	55	G	Stx1	STEC
510	66	G	Stx1	STEC
511	66	G	Stx1	STEC
514	66	G	Stx1	STEC
673	84	G	Stx1	STEC
675	84	G	Stx1	STEC
680	84	G	Stx1	STEC
82	17	H	Stx1	STEC

84	17	H	Stx1	STEC
402	54	H	Stx1	STEC
403	54	H	Stx1	STEC
625	78	H	Stx2	STEC
626	78	H	Stx2	STEC

Anexo 2 Preparación de reactivos

Regulador de tris-boratos-EDTA (TBE), 20X. Disolver 54.45 gr de Tris-base en 150 mL de agua destilada, agregar 27.8 gr de ácido bórico y 25 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, aforar a 250 mL con agua destilada.

- Marcador de peso molecular. Escalera de 100pb. ($\Phi\lambda$ digerido con *BstEII* de New England Biolabs 500 $\mu\text{g/mL}$).
- Regulador de carga. Disolver 0.03 gr de azul de bromofenol en 10 mL de agua destilada estéril; agregar a 60mL de glicerol. Mezclar muy bien y ajustar el volumen a 100 mL con agua. Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C.
- Solución de bromuro de etidio (10mg/mL). Pesar 100 mg de colorante y disolver en 10 mL de agua bidestilada. Extremar precauciones durante su manejo.
- Agarosa 2.5%. Disolver 1 gr de agarosa grado biología molecular en 40 mL de agua destilada.