



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Identificación de Enterobacterias, en Carne de Ovino
Fresca y Procesada con Empleo de Biosensores y Cultivo
Bacteriano.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
ETNI SAID PEÑA HURTADO

ASESORES:

M. en C. POMPOSO FERNÁNDEZ ROSAS
Dr. HUMBERTO GUSTAVO MONROY SALAZAR
Dr. en C. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ

REVISORES:

Dra. ADRIANA DEL CARMEN GUTIERREZ CASTILLO
M.V.Z. SALVADOR LAGUNAS BERNABÉ

Toluca de Lerdo, México, marzo de 2018



Agradecimientos

Al proyecto de investigación y por la beca que otorgó la SlyEA UAEMéx.

A la Universidad Autónoma del Estado de México.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal.

Dedicatorias

Principalmente a DIOS por su amor para conmigo, las bendiciones y oportunidades que me da.

A mis padres por siempre creer en mí, por sus consejos, amor incondicional, apoyo, por darme las herramientas necesarias y hacerme la persona que soy ahora. Sin ellos no estaría aquí ya que pude culminar gracias a sus desvelos, su dedicación para conmigo y su paciencia.

A Elenita por su apoyo, amor, por alentarme a ser una mejor persona y por enseñarme que por más fuerte que sea la prueba se puede superar.

A mis seres amados que me apoyan y aún están a mi lado, a mi abuelo Jafet y mi abuelita lucha que no están con nosotros físicamente pero que sé que para ellos esto significaría mucho.

A quienes brindaron de si para ayudarme a sacar el proyecto de tesis, Jorge Antonio Varela Guerrero y Vladimir Morales Erasto.

Fuente de financiamiento

El presente trabajo de tesis, se realizó con el auspicio de la Universidad Autónoma del Estado de México, Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, y el Cuerpo Académico de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria.

En el proyecto de investigación 4038/2016A.

“Evaluación de calidad de la carne de ovino fresca y procesada, con empleo de biosensores y cultivo bacteriano”.

Título

“Identificación de enterobacterias en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano”

Resumen

Una de las principales preocupaciones en salud pública es la inocuidad alimentaria, ya que el consumo de carne contaminada, es causa de una amplia gama de enfermedades que afectan al hombre, dentro de las cuales podemos encontrar a las enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Enterobacter* entre otras; debido a su alto potencial de causar enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), esto generalmente ocurre por malas prácticas higiénico-sanitarias tanto en el proceso de sacrificio como en la comercialización de los productos. Para evaluar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos se han creado diferentes técnicas y sistemas, es necesaria la implementación de métodos rápidos y confiables para el diagnóstico de bacterias relacionadas con las ETA's. En el presente trabajo se realizó una comparación entre la eficiencia diagnóstica de un método utilizado recientemente (Sistema MicroSnap^{MT}), y el método tradicional de cultivo bacteriano para la identificación de Enterobacterias. Se analizaron 99 muestras de canal caliente y 99 muestras de carne procesada (Barbacoa), todas se sometieron a la prueba del sistema MicroSnap^{MT} y al aislamiento bacteriológico tradicional. La prevalencia de enterobacterias encontrada fue de 87.88% para el caso de canales y 9% en carne procesada. El índice de concordancia Kappa es pobre entre ambas técnicas por lo cual el sistema MicroSnap^{MT} no es tan confiable. En cuanto a la especificidad fue de 58.33% y sensibilidad fue de 62.07% para el caso de canales calientes y para el caso de carne procesada la sensibilidad fue de 27.27% y especificidad fue de 90.91%, lo cual indica que el sistema tradicional identifica 3 veces más Enterobacterias que el sistema MicroSnap^{MT}. Por lo que se infiere que el método convencional de identificación de Enterobacterias es mejor que el sistema de identificación rápida MicroSnap^{MT}, además de que con el sistema MicroSnap^{MT} no se puede identificar el género bacteriano.

Palabras clave. enterobacterias, Detección, Sistemas Rápidos.

Abstract

One of the main concerns in public health is food safety, since the consumption of non-harmless meat is the cause of a wide range of diseases that affect man, among which we can find Enterobacteria such as *Salmonella*, *Shigella*, *E coli*, Enterobacter among others; Due to its high potential to cause foodborne diseases (ETA's), this generally occurs due to poor hygienic-sanitary practices both in the slaughter process and in the commercialization of the products. To evaluate the presence of pathogenic microorganisms in food, different techniques and systems have been created, requiring the implementation of fast and reliable methods for the diagnosis of bacteria related to ETA's. In the present work, a comparison was made between the diagnostic efficiency of a recently used method (MicroSnap^{MT} System), and the traditional method of bacterial culture for the identification of Enterobacteria. 99 hot-channel samples and 99 samples of processed meat (Barbecue) were analyzed, all were subjected to the MicroSnap^{MT} system test and traditional bacteriological isolation. The prevalence of Enterobacteria found was 87.88% for the case of carcasses and 9%, the Kappa concordance index is poor between both techniques, which is why the MicroSnap^{MT} system is not so reliable, in terms of specificity it was 58.33% and sensitivity was 62.07% for the case of hot channels and for the case of processed meat the sensitivity was 27.27% and specificity was 90.91% which indicates that the traditional system identifies 3 times more Enterobacteria than the MicroSnap^{MT} system, so which we can infer that the conventional method of identification of Enterobacteria continues to be better than the rapid identification system MicroSnap^{MT}, in addition to the MicroSnap^{MT} system can not identify the bacterial genus.

Keywords. Enterobacteria, Detection, Rapid Systems

Índice

Agradecimientos.....	ii
Dedicatorias	iii
Fuente de financiamiento.....	iv
Título.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Índice.....	viii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. Antecedentes.....	3
1. Producción de carne ovina en el Estado de México.	3
1.1 Manejo sanitario en la industrialización de carne en México.	4
2. Enterobacterias relacionadas a las ETA'S.	4
2.1 Inocuidad de los alimentos	4
2.2 Enfermedades transmitidas por los alimentos	5
2.3 Enterobacterias	6
2.3.1. Descripción de la familia	7
2.3.2. Anatomía celular y composición	7
2.3.3. Hábitat natural	7
2.3.4. Significado clínico	8
2.4 Escherichia	8
2.4.1 Características generales	9
2.4.2 Clasificación de Escherichia	9
2.5 Enterobacter	11
2.5.1 Características generales	11
2.5.2 Clasificación de Enterobacter	11
2.6 Salmonella	13
2.6.1 Características generales	13

2.6.2 Clasificación de Salmonella	14
2.7. Shigella	16
2.7.1 Características generales	16
2.7.2 Clasificación de Shigella	16
2.8 Citrobacter	17
2.8.1. Características generales	17
2.8.2. Clasificación de Citrobacter	18
2.9. Métodos de detección y aislamiento de enterobacterias encontradas comúnmente en ovinos.	19
2.9.1. Salmonella	19
2.9.2. E. coli	20
2.9.3. Enterobacter	20
2.9.4. Citrobacter	20
2.9.5 Shigella	20
2.10. Conteos de coliformes (E. coli spp., Enterobacter spp., Shigella spp., Citrobacter spp. de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994).	21
2.11 Epidemiología de la familia Enterobacteriaceae	22
2.11.1. Epidemiología en ovinos	22
2.11.2. Epidemiología en humanos	23
2.11.2.1. Salmonelosis	24
2.11.2.2. Shigelosis	24
2.11.2.3. E. coli	25
2.12. Biosensores:	26
2.12.1. Tipos de biosensores	27
III. Justificación	33
IV. Hipótesis	35
V. Objetivos	36
Objetivo general	36
Objetivos Específicos	36
VI. Material y Método	37
VII. Límite de Espacio.....	46
VIII. Límite de Tiempo.....	48

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

IX. Resultados.....	50
X. Discusión	56
XI. Conclusiones.....	61
XII. Literatura citada.....	62
XIII. Anexos	69

Índice de tablas

1. Equivalencias entre Unidades Relativas de Luz (URL) y Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml)	40
2. Interpretación de las pruebas bioquímicas	42
3. Cálculo de indicadores para evaluar la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar para identificar y cuantificar cepas de enterobacterias (UFC) en canales y carne procesada de ovino	43
4. Tabla de contingencia 2x2 para evaluar el sistema MicroSnap ^{MT} frente a la técnica estándar (Cultivo en Placa) según Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994).	44
5. Equivalencia entre valor de kappa con su fuerza de concordancia	45
6. Identificación de enterobacterias en muestras de canales calientes y carne procesada de ovino, comparando el sistema MicroSnap ^{MT} frente al Método Estándar “cultivo en Placa”	50
7. Evaluación de la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de enterobacterias en Canales calientes de ovinos.	52
8. Evaluación de la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap ^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de enterobacterias en carne procesada de ovino.	53
9. Valor de concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap ^{MT} y el Método Estándar (Cultivo en Placa) para identificar cepas de enterobacterias en muestra de canales y carne procesada de ovino.	55

Índice de figuras

1. Lugar de donde se obtuvo la muestra en canal	38
2. Procedimiento para la toma de muestra biológica, enriquecimiento, detección y conteo de Cepas de enterobacterias por medio de la técnica de Luminiscencia (MicroSnap ^{MT}).	40
3. Ubicación de rastro de Capulhuac, Estado de México	46
4. Ubicación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). Toluca, Estado de México	47

I. INTRODUCCIÓN

La carne (principalmente cruda) además de ser altamente susceptible a deterioro, también puede constituir un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (Bhandare *et al.*, 2007; Podpečan *et al.*, 2007). Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea interna o externa al animal. En animales vivos, las superficies en contacto con el medio ambiente albergan una variedad de microorganismos, por lo que en muchas ocasiones los contaminantes se derivan de la piel del animal, o bien, de aquellos presentes en heces. Sin embargo, se ha determinado que las carnes procesadas son más susceptibles a contaminarse con microorganismos patógenos durante las diferentes etapas de su procesamiento (Datta *et al.*, 2012). La presencia de patógenos en la cadena de producción de un alimento, aún en bajos números, es indeseable y se considera como la mayor causa de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo (McDonald y Sun, 1999).

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrados de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. Adicionalmente, algunas enterobacterias de los géneros: *Salmonella*, *Shigella* y serotipos de *Escherichia coli*, son microorganismos patógenos para el humano y los animales por lo que su identificación en alimentos es de suma importancia.

En la actualidad, las infecciones intestinales por enterobacterias son uno de los problemas más comunes en todo el mundo. En México este tipo de infecciones se han notificado de manera ocasional, aunque se sospecha que la frecuencia puede ser mayor, debido al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos.

El diagnóstico de enterobacterias se basa en el aislamiento del microorganismo a partir de tejidos recogidos asépticamente en necropsias o de las heces, de frotis rectales o muestras ambientales, de productos alimenticios o de pienso.

El método tradicional de aislamiento e identificación bacteriana consiste en proporcionar a las bacterias condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada, este procedimiento lleva un periodo de tiempo mínimo de 24 horas. Adicionalmente, existen varios métodos para la identificación de enterobacterias, uno de ellos es el empleo de un biosensor, que es una prueba que utiliza una reacción bioluminogénica que genera luz cuando las enzimas que son características de las enterobacterias reaccionan con sustratos especializados para producir luz. El tiempo aproximado de la obtención de resultados es de 8 horas por lo que podría ser un método atractivo para la identificación de enterobacterias en un menor tiempo. Por lo tanto, en el presente trabajo se identificaron y compararon las técnicas de cultivo bacteriano y la utilización de biosensores para la identificación de enterobacterias en canales y carne procesada de ovinos.

II. Antecedentes

1. Producción de carne ovina en el Estado de México.

En México el inventario ovino nacional contaba con una existencia ovina de 7,305,578 cabezas, de acuerdo a las cifras del INEGI 2007, y para el 2010 el SIAP reportó 8,105,562; sin embargo, la Unidad Nacional de Ovinocultores considera que en el periodo 2008 al 2010, se ha registrado un decremento estimado hasta en un 30% del inventario, derivado de reajustes en sistemas de producción al incrementarse el precio de los granos. Los Estados de la república con mayor número de cabezas son: Estado de México con 15.91%, Hidalgo 13.02%, Veracruz 8.02%, Oaxaca 7.04% y San Luis Potosí 5.56%; en su conjunto concentran el 49.55% del total de la existencia ganadera ovina nacional.

En materia de producción de carne de ovino en canal a nivel nacional fue de 54,996 toneladas (SIAP 2010) y los estados de la república con mayor producción: Estado de México con 15.09%, Hidalgo 12.20%, Veracruz 9.12%, Puebla 6.85%, Jalisco 6.56% y Zacatecas 5.84%; los que acumulan el 55.66% del total (SAGARPA, 2013). En Capulhuac, se lleva a cabo la mayor distribución de ovinos en el Estado de México, la producción de cárnicos es la actividad económica principal en este municipio; de acuerdo con autoridades en la localidad existen alrededor de 9 mil productores de este alimento y a la semana se matan unos 12 mil ovinos.

El consumo nacional aparente es de 71,871 toneladas, cantidad que no alcanza a cubrir los volúmenes requeridos para satisfacer la demanda nacional, por lo que se recurre a la importación de ganado en pie para abasto y carne congelada principalmente de países como: de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (SAGARPA, 2013).

1.1 Manejo sanitario en la industrialización de carne en México.

México tiene normativas que señalan los límites máximos permisibles de enterobacterias que deben cumplirse en los diferentes tipos de alimentos tanto crudos como procesados.

Aproximadamente el 15% de los bovinos, ovinos y caprinos, son faenados en establecimientos con alto o muy alto riesgo sanitario. México es un país en el que se consumen grandes cantidades de vísceras, entre las que se pueden mencionar el hígado, riñones, sesos, médula espinal, lengua, intestinos, panza y corazón. Se considera que anualmente se producen 23,521 toneladas de vísceras derivadas de bovinos, 4457 toneladas de cerdos, 253 toneladas de ovinos y caprinos y 1141 toneladas de aves, todas con niveles altos y muy altos de riesgo sanitario (Signorini *et al.*, 2006).

2. Enterobacterias relacionadas a las ETA'S

2.1 Inocuidad de los alimentos

La inocuidad se define como la “garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado e ingerido de acuerdo con el uso que debe dársele”, siempre con un nivel de riesgo aceptable. También puede entenderse como la implementación de medidas que protejan al consumidor, y reduzcan en los alimentos los contaminantes físicos, químicos y biológicos (Roberts y Orden, 1999; Codex Alimentarius, 2003; Martínez *et al.*, 2008).

A menudo se tiende a confundir la inocuidad con la calidad. El concepto de calidad abarca una compleja gama de atributos que influyen en su valor o la aceptación del consumidor. Estas características incluyen el valor nutricional; propiedades sensoriales, como apariencia, color, aroma, textura y gusto; así como los métodos de elaboración y propiedades funcionales (Arispe y Tapia., 2007).

Se necesita identificar los principales factores que intervienen como causas de infecciones e intoxicaciones alimentarias, para de esta manera determinar las medidas de control y prevención (Kopper y Calderón, 2009).

Los factores de riesgo implicados en la contaminación de las canales comienzan con la matanza. Aún en rastros higiénicos es posible que ocurra contaminación cruzada con las manos y cuchillos contaminados con heces. Después del sacrificio, el proceso de faenado teóricamente es un proceso estéril; pero al desarrollarse en un ambiente altamente nutritivo con disponibilidad de agua y pH cercano a la neutralidad se favorece la replicación de un gran número de microorganismos algunos de ellos patógenos (Hurtado, 2010).

La distribución de las canales debe realizarse en condiciones que aseguren la higiene y el mantenimiento de la temperatura de refrigeración, asimismo, en el punto de venta es indispensable que sean descargadas de manera pronta y expedita y se almacenen en condiciones adecuadas, en caso contrario la carne del mejor animal sacrificado de la manera más higiénica puede ser un riesgo biológico para el consumidor (Hurtado, 2010).

Un alimento se considera inocuo cuando carece de cualquier contaminante o está en una cantidad tan baja que no hay efectos adversos significativos a la salud en el corto o largo plazo (Essers, 2005; Arispe y Tapia, 2007).

El incremento del comercio mundial aumenta los riesgos del consumo de alimentos no inocuos. Para minimizar tales riesgos, es necesario que la producción, abastecimiento, comercialización, manipulación y consumo de alimentos se realicen en condiciones higiénicas adecuadas. Identificar los peligros y su probabilidad de ocurrencia, desde que los alimentos se producen hasta que llegan a la mesa del consumidor. El planteamiento preventivo promueve la implementación de buenas prácticas agrícolas (BPA), y buenas prácticas de manufactura (BPM) (FAO, 2002; Avendaño *et al.*, 2006; Henríquez y Lizano, 2008).

2.2 Enfermedades transmitidas por los alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) se definen como un conjunto de enfermedades causadas por microorganismos o sustancias tóxicas que se ingieren por el consumo de agua o alimentos contaminados, en cantidades tales

que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica (Barreto, 2010; USDA, 2011). Representan un problema de salud pública, se estima que más de tres millones de personas mueren al año en países desarrollados a causa de las ETAS. Por eso es necesario promover la inocuidad de alimentos, los países adoptan las normas del CODEX ALIMENTARIUS con el propósito de asegurar la producción, almacenamiento y expendio de productos alimenticios inocuos (Codex Alimentarius, 2003).

Las enfermedades gastrointestinales son el principal problema de salud pública, anualmente se enferman millones de personas a causa de alimentos contaminados. Según la OMS (2012), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son la segunda causa de defunción en niños menores de 5 años a nivel mundial. Uno de los principales agentes patógenos causantes de diarrea aguda es *Salmonella* spp. (Marcos y DuPont, 2007).

La calidad microbiológica de la carne de ovino se evalúa con la determinación de coliformes totales, coliformes fecales y la evaluación de éstas es posible basándose en lo que especifican las normas que se encuentran vigentes. La presencia de *Salmonella* spp. y sus serovariedades patógenas se consideran como indicador de alimentos inocuos (Hurtado, 2010)

La inocuidad de los alimentos está asociada a todos los riesgos que puedan afectar la salud del consumidor, ocasionados por la presencia de patógenos microbianos, toxinas y contaminantes químicos o físicos. Debido a esto, la obtención y garantía de la inocuidad debe ser un objetivo no negociable (Arispe y Tapia, 2007).

2.3 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, además de

formar parte de la flora intestinal normal de muchos animales y el hombre (Stanchi y Martino, 2007).

2.3.1. Descripción de la familia

Los representantes de esta familia son parecidos en cuanto a morfología y caracteres tintoriles, son bacilos pleomórficos, Gram negativos y asporógenos, catalasa positivos y oxidasa negativos de un tamaño de 2-3 μm por 0,4-0,6 μm . Son móviles por flagelos peritricos o no móviles. Crecen en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, fermentan la D-glucosa a menudo con producción de gas, reducen los nitratos a nitritos y poseen un contenido de ADN del 39 al 59% de guanina más citosina (G+C). Algunos poseen cápsula (Stanchi y Martino, 2007).

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque se desarrollan entre 20 y 40 °C. El tiempo de división varía entre 20 y 40 minutos (Koneman *et al.*, 1999).

2.3.2. Anatomía celular y composición

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos y como tales poseen una pared típica de las bacterias Gram negativas. Dicha pared está constituida desde el exterior al interior: de una membrana externa, de una capa delgada de peptidoglucano que constituye una capa rígida compuesta por cadenas lineales de poliosidos unidas entre sí por péptidos que brinda protección frente a las sales biliares y fermentos digestivos. Además de un espacio periplásmico que recubre la membrana citoplasmática en la cual se acumulan enzimas que degradan las sustancias necesarias para el metabolismo bacteriano (Stanchi y Martino, 2007).

2.3.3. Hábitat natural

Están ampliamente distribuidas en plantas, suelo, agua y en el intestino del hombre y animales. De la presencia de enterobacterias depende la calidad sanitaria del agua o de un producto alimenticio; la ausencia de estas bacterias garantiza la ausencia de patógenos (Giono, 2009).

2.3.4. Significado clínico

Las lesiones causadas por cepas de la familia *Enterobacteriaceae* se asocian a abscesos, neumonía, meningitis, septicemia, y en infecciones de heridas, tracto urinario e intestino, en este último como productores de diarrea. También están implicadas en procesos infecciosos de plantas e insectos (Stanchi y Martino, 2007). La carne roja de vacunos, búfalos, cerdos, ovejas, cabras, llamas y otras especies, es un medio de cultivo excepcional para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Tiene un alto contenido de proteínas, baja proporción de carbohidratos y sustancias solubles de menor peso molecular (Blackie Academic & Professional, 1998).

Todos los animales transportan grandes cantidades de microorganismos. Numerosas bacterias, además de mohos y levaduras, están presentes en el cuero, los pelos y las pezuñas, y son transmitidos a la carcasa luego del sacrificio. Los restos de estiércol en el pelambre suelen acceder al músculo, así como el contenido intestinal si la evisceración no se hace cuidadosamente. Por otra parte, las bacterias también pueden proceder de los pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena (Blackie Academic y Professional, 1998).

En la superficie de la carne bovina suelen encontrarse varios tipos de *Escherichia coli*, algunas especies de *Enterobacter* y *Serratia*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, bacterias lácticas, mohos y levaduras (Hayes *et al.*, 2003).

2.4 Escherichia

Es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos, cada grupo provoca enfermedad mediante un mecanismo diferente. Se sabe que sus

propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar las toxinas son mediadas por plásmidos o fagos (Stanchi y Martino, 2007).

2.4.1 Características generales

Se presenta como bacilos rectos, Gram negativos, que miden entre 1 y 1,5 μm x 2 y 6 μm . Entre los elementos constitutivos de su estructura, pared bacteriana, pili o fibras, la cápsula, flagelos peritricos y la membrana externa. Algunas cepas presentan cápsula, existen algunas cepas sin movimiento por lo cual no presentan flagelos (Quinn *et al.*, 2008).

2.4.2 Clasificación de *Escherichia*

Escherichia coli diarreogénica ha sido clasificada con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en 6 grupos bien definidos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroadherente difusa (DAEC). Existen otras cepas que no han sido perfectamente caracterizadas; de las cepas anteriores, las 4 primeras están implicadas en intoxicaciones causadas por alimentos contaminados y por el consumo de agua (Fukushima *et al.*, 2002).

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC): Es reconocida como el agente causal de la diarrea del viajero, la cual se caracteriza por diarreas acuosas con o sin fiebre. Este tipo de infecciones es muy frecuente en países subdesarrollados y afecta principalmente a los niños (Michanie, 2003).

Patogénesis: El microorganismo es capaz de producir dos tipos de toxina. Una toxina termolábil de aproximadamente 89 kDa cuya secuencia, antigenicidad y función es similar a la toxina del cólera, la otra toxina que produce es termoestable y es de bajo peso molecular (4 kDa) y es capaz de resistir temperaturas de ebullición hasta por 30 minutos (Quinn *et al.*, 2008).

La infección puede ser adquirida por el consumo de alimentos tales como vegetales frescos (lechuga en ensaladas) y agua. La dosis infectiva para adultos ha sido

calculada en aproximadamente 10^8 bacterias, por otra parte, en jóvenes y ancianos la dosis infectiva puede ser más baja (Quinn *et al.*, 2008).

Escherichia coli enteropatógena (ECEP): Es causa importante de diarrea en los lactantes particularmente en los países en vías de desarrollo. La ECEP se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Sus factores de virulencia favorecen la adhesión y en ocasiones penetra a las células mucosas. La infección por ECEP provoca diarrea acuosa generalmente autolimitada, aunque en ocasiones puede ser crónica.

Patogénesis: El microorganismo produce dos proteínas: la intimina que es codificada por el gen *eae* y un factor de adherencia que es codificado por un plásmido, ambas proteínas permiten su unión a los enterocitos y la destrucción de las microvellosidades intestinales.

Las epidemias causadas por este microorganismo se deben al consumo de agua contaminada y productos cárnicos. En estudios con voluntarios se encontró que la dosis infectiva es de 10^6 microorganismos. La diarrea por ECEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de *E. coli* los cuales pueden ser identificados mediante la tipificación del antígeno O (somático) y en ocasiones del antígeno H (flagelar) (Quinn *et al.*, 2008).

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC): Este microorganismo se encuentra estrechamente relacionado con el género *Shigella*, produce una enfermedad similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta comúnmente en niños de países subdesarrollados y en personas que viajan a dichos lugares. La EIEC provoca la enfermedad (diarrea disentérica invasiva) al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal.

A pesar de que la dosis infectiva para *Shigella* es de 10 a 100 microorganismos, en el caso de EIEC la dosis infectiva es de aproximadamente 10^6 bacterias. Algunas características importantes de este microorganismo que permiten diferenciarlo de la cepa típica de *E. coli* son: No utiliza la lactosa como fuente de carbono, no descarboxilan la lisina, es inmóvil y anaerogénicas. La patogenicidad de este

organismo se debe a su capacidad para invadir y destruir el epitelio del colon debido a que es capaz de evadir la lisis en los fagolisosomas (Stanchi y Martino, 2007).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC): Produce verotoxina, denominada así por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales de mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina. La ECEH se ha asociado con colitis hemorrágica, una variedad grave de diarrea; y con el síndrome urémico hemolítico, enfermedad capaz de producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. La verotoxina tiene propiedades similares a la toxina shiga producida por algunas cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1. De los serotipos de *E. coli* que producen la verotoxina el más común y el único que puede identificarse en muestras clínicas es el O157:H7. La *E. coli* O157:H7 no emplea sorbitol y es negativa a la prueba de MUG (Quinn *et al.*, 2008).

La causa más común de esta infección es el consumo de carne sin cocinar o poco cocinada, particularmente carne picada procesada en grandes cantidades. Los casos de colitis hemorrágica y sus complicaciones asociadas pueden prevenirse mediante la cocción completa de la carne (Quinn *et al.*, 2008).

2.5 Enterobacter

Este género de bacterias viven en el ser humano y animales como parte de una población microbiana normal, algunas causan principalmente infección en el tracto urinario y respiratorio.

2.5.1 Características generales

En cuanto a sus características morfológicas se trata de bastones Gram negativos, móviles en su mayoría, son anaerobios facultativos

2.5.2 Clasificación de Enterobacter

Está integrado por las siguientes especies: *E. aerogenes*, complejo *E. agglomerans*, *E. amnigenus* (biogrupos 1 y 2) *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. nimipresurais*, *E. pyrinus* y *E. sakazakii* (Stanchi y Martino, 2007).

En cuanto a su poder patógeno:

E. aerogenes: es de aislamiento clínico común.

Complejo *E. agglomerans*: se trata de un grupo heterogéneo de microorganismos que representan a más de 13 grupos de hibridación de ADN.

E. amnigenus biogrupos 1 y 2: estos microorganismos han sido aislados de muestras humanas, aunque no existen evidencias de que puedan provocar infecciones en el hombre.

E. asburiae: ha sido recuperado de muestras clínicas humanas de diversos orígenes, como sangre, orina, heces, tracto respiratorio y heridas.

E. cancerogenus: esta especie ha sido aislada de variadas muestras de origen clínico, incluso sangre y LCR.

E. cloacae (y especies anónimas 1, 2 y 3)

E. dissolvens: no ha sido recuperado de muestras clínicas humanas.

E. gergoviae: ha sido hallada en muestras clínicas humanas de tracto respiratorio y urinario.

E. hormaechei: se ha recuperado a partir de esputo, sangre, y heridas contaminadas.

E. intermedius: no ha sido aislado de muestras clínicas humanas, pero sí de agua y suelo.

E. nimipresuralis: no ha sido aislada de muestras clínicas humanas.

E. pyrinus: es patógeno vegetal exclusivo.

E. sakazakii: en neonatos puede provocar bacteriemia, meningitis, y abscesos cerebrales.

En cuanto a su patogenicidad *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae* son las especies halladas más frecuentemente a nivel clínico humano. Ambas especies están ampliamente distribuidas en agua, suelo, vegetales y medio ambiente, además de integrar la flora entérica normal, también se les relaciona con infecciones que incluyen las de los tractos respiratorio y urinario, además de heridas y esporádicamente cuadros meníngeos y septicémicos (Stanchi y Martino, 2007).

E. gergoviae provoca infecciones urinarias.

En medicina humana, *E. asburiae* ha sido aislada de muestras tales como sangre, orina, materia fecal, tracto respiratorio y heridas, por su parte *E. hormaechei* ha sido recuperado de heridas, sangre, esputo, heces, vesícula biliar y oído, se le ha responsabilizado de picos septicémicos neonatales en internados de terapia intensiva.

2.6 Salmonella

El género *Salmonella* causa la salmonelosis, enfermedad de distribución mundial que afecta a humanos y animales de sangre caliente y fría. La epidemiología de *Salmonella* es muy compleja debido a su distribución ubicua, su crecimiento numeroso de serovares, su amplio rango de hospedadores y su compleja patogénesis. Habita el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados, y su excreción da como resultado la contaminación del agua, los alimentos y el medio ambiente.

2.6.1 Características generales

En cuanto a sus características morfológicas, se trata de bastones Gram negativos, de 0,7 a 1,5 μm de ancho y 2,0 a 5 μm de largo, móviles por flagelos distribuidos en forma peritrica (únicamente dos especies son inmóviles *S. Gallinarum* y *Pullorum*). Son anaerobios facultativos y no formadores de esporas (Figuroa y Verdugo, 2005; Caffer *et al.*, 2008).

Es una de las principales bacterias patógenas que contaminan la carne de ovino, pueden infectar al humano con un bajo número de células 14^4 UFC/g. de alimento. Algunas serovariedades de *Salmonella* spp. producen principalmente fiebre tifoidea y paratifoidea (OMS, 2012).

El tracto intestinal del ganado ovino puede ser reservorio de este patógeno por lo que la carne y leche, así como sus derivados son vehículos de transmisión (Todd, 2000; FDA, 1999).

2.6.2 Clasificación de Salmonella

La clasificación del género *Salmonella* es muy compleja, su nomenclatura y taxonomía se ha modificado en varias ocasiones, aunque aún se usa la filogenia descritos por Kauffmann-White (1966) (Tindall *et al.*, 2005).

Minor y Popoff propusieron que el género *Salmonella* estaba únicamente representado por la especie *Salmonella* Entérica. Calva (2007) coincide e indica que *S. Bongori* se ubica dentro de las subespecies de *S. Entérica* (Tindall *et al.*, 2005). Tindall *et al.* (2005) refutan lo indicado por Minor y Popoff proponiendo que el género *Salmonella* está constituido por tres especies: *Salmonella* Entérica, *Salmonella* Bongori y *Salmonella* Choleraesuis. Donde *Salmonella* Enterica está dividida por seis subespecies: Enterica, Salamae, Arizonae, Diarizonae, Houtenae e Indica (Fukushima *et al.*, 2002; Tindall *et al.*, 2005; Caffer *et al.*, 2008).

A su vez las subespecies se dividen en más de 2400 serovariedades, organizadas de acuerdo al esquema de Kauffmann-White (1966) y se definen en función de las asociaciones de los factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie Entérica (subespecie I) (Calva, 2007).

Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana, por ejemplo, *Salmonella* Entérica subespecie Entérica serovariedad Typhimurium para términos prácticos pasa a simplemente *Salmonella* Typhimurium sin utilizar letra cursiva (Caffer *et al.*, 2008).

Los miembros del género se pueden clasificar en tres grupos:

- Los que infectan sólo al hombre: *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A y *S. Paratyphi* C.
- Los que infectan a un hospedero animal: *S. Abortusovis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves.

- Los que no tienen preferencia por algún hospedero. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.

La enfermedad generada por algunas especies de *Salmonella* es conocida como Salmonelosis, es una de las enfermedades alimentarias más comunes causada por el consumo de alimentos y agua contaminada. Se le considera una zoonosis de distribución mundial. La morbilidad de la salmonelosis es elevada, aunque la mortalidad es baja. Tiene un período de incubación de 6 a 72 h, generalmente entre 12 a 36 h y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 h. La dosis infectiva es de 144 a 10⁶ UFC/g (Vargas *et al.*, 2004).

Las causas más frecuentes de infección son los alimentos contaminados de origen o por manipulación de un portador, también de persona a persona (Calva, 2007).

La infección por alimentos contaminados incluye el huevo y sus productos; carne y sus derivados; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral y frutas, jugos y hortalizas. Otra fuente de contaminación son las mascotas (reptiles y aves) y los productos farmacéuticos de origen animal no esterilizados (polvo de tiroideos, hormonas pancreáticas, sustancias corticoadrenales, etc.). La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y menores de cinco años (Caffer y Terragno, 2001; Calva, 2007).

La salmonelosis humana puede dividirse en dos síndromes:

1) La gastroenteritis o envenenamiento por alimentos o salmonelosis no tifoideica. No es acompañada de una infección sistémica. Las cepas más comunes son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*.

2) La fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea. Implica una infección sistémica, debido a la invasión de la bacteria. Es causada por *S. Typhi* y *S. Paratyphi A, B o C*.

Las salmonelosis típicamente producen manifestaciones clínicas como gastroenteritis aguda (que va desde diarrea leve a diarrea fulminante, náuseas y vómitos), bacteriemia o septicemia (accesos de fiebre alta con hemocultivos

positivos), fiebre tifoidea o paratifoidea (fiebre continua con o sin diarrea) y la condición de portadoras de personas infectadas anteriormente (Caffer *et al.*, 2008). Puede también ocurrir una invasión sistémica sin gastroenteritis, principalmente en individuos inmunocomprometidos, como en el caso de las infecciones intrahospitalarias. La fiebre tifoidea, puede establecer la condición de portador asintomático (Caffer y Terragno, 2001; Calva 2007).

Las infecciones por serotipos no tifoideos se asocian principalmente con el contacto entre personas, el consumo de diversos alimentos contaminados y la exposición a animales. La infección por especies tifoideas se asocia con el consumo de agua o alimentos contaminados, es poco frecuente la transmisión directa entre personas (Parra *et al.*, 2002; Calva, 2007; Caffer *et al.*, 2008).

2.7. Shigella

Este género está considerado como el principal responsable de la disenteria bacteriana, enfermedad que en el ser humano provoca enteritis graves con eliminación de heces diarreicas que contienen mucus, sangre y/o pus. El contagio se hace por contacto directo o por alimentos. Puede llegar a producir brotes epidémicos por su enorme transmisibilidad (Stanchi y Martino, 2007).

2.7.1 Características generales

Son Gram negativos, aerobios, anaerobios facultativos. Citocromo-oxidasa negativos. Fermentan la glucosa sin producción de gas; no obstante, debido a su afinidad con *E. coli*, se han encontrado biotipos que producen gas de la glucosa. No decarboxilan la lisina. No fermentan la lactosa.

2.7.2 Clasificación de Shigella

En cuanto a su clasificación: todos los miembros integrantes de este género son bastones Gram negativos sin organización definida, que miden de 0.7 μm x 3 μm , no esporulados, sin cápsula aparente, inmóviles, su cultivo *in vitro* no es exigente, oxidasa negativa y fermentadores de glucosa, con producción de ácido o ácido y gas, y su tipo respiratorio es anaerogénico excepto los biotipos de *Shigella flexneri* 6.

Hay cuatro especies de shigellas que constituyen el género, las cuales son *Shigella dysenteriae* (grupo A), *Shigella flexneri* (grupo B), *Shigella boydii* (grupo C) y *Shigella sonnei* (grupo D). En algunas oportunidades las shigellas del grupo C pueden formar colonias mucoides.

Poder patógeno:

Se trata de un grupo bacteriano con marcada actividad patógena ya que con tan solo 2×10^2 UFC/mL o gramo de muestra para provocar enfermedad, es decir que con tan solo 200 microorganismos viables se puede padecer un proceso infeccioso grave.

En cuadros de shigelosis, el hombre es el hospedador natural y la contaminación se realiza por vía fecal-oral, a partir de una persona enferma, de un portador, o bien de agua, leche y alimentos contaminados con materia fecal. Los síntomas varían de graves a leves dependiendo la especie de *Shigella* pudiendo encontrar pacientes asintomáticos.

La patogenicidad de *Shigella* está asociada a su habilidad de invadir y colonizar el epitelio intestinal humano mediante factores de virulencia. Forma poros a través de la membrana de las células del epitelio intestinal, permitiendo la penetración de la bacteria al citoplasma del enterocito. Luego se multiplican e infectan células adyacentes a través de protrusiones, sin tomar contacto con el medio extracelular, destruyendo las células del hospedero (Stanchi y Martino, 2007).

2.8 Citrobacter

Es uno de los patógenos más importantes en unidades de cuidados neonatales hospitalarios. En los seres humanos producen, por ejemplo, infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales. Destruyendo las microvellosidades del intestino, formando lesiones muy características denominadas de adherencia y eliminación (Quinn *et al.*, 2008).

2.8.1. Características generales

El género *Citrobacter* es un grupo de bacilos Gram negativos aerobios encontrados con mucha frecuencia en el agua, el suelo, la comida y como flora saprófita en el

tracto intestinal de animales y humanos; son microorganismos ubicuos que son causa frecuente de infecciones importantes, especialmente en hospederos inmunodeprimidos (Quinn *et al.*, 2008).

2.8.2. Clasificación de *Citrobacter*

Citrobacter freundii: es un tipo de bacteria que puede hallarse en el agua, las heces y los intestinos. Cumple un rol importante en la digestión y rara vez produce enfermedad, es desactivada a temperaturas mayores a 70°C. A nivel digestivo, estas bacterias pueden ser recolectadas a partir de productos lácteos, mariscos y vegetales crudos. *Citrobacter freundii* invade y se replica en las células cerebrales humanas endoteliales microvasculares, provocando daño a nivel cerebral (Quinn *et al.*, 2008).

Su porción relativa de cepas patógenas y no patógenas es desconocida. Puede poseer el gen AmpC de resistencia, siendo capaz de resistir a antibióticos β -Lactámicos como las cefalosporinas de primera a la tercera generación.

Diarrea, fiebre, convulsiones, decaimiento, ictericia, distensión abdominal son los síntomas más frecuentes en los pacientes con infección de *Citrobacter freundii* a nivel gastrointestinal. Los síntomas a nivel intrauterino incluyen sensación de ardor al orinar, aumento de la necesidad de orinar e incluso es posible que sólo se pueda eliminar una pequeña cantidad de orina cada vez. En algunos casos, la orina puede contener sangre o puede ser más oscura o con un olor más fuerte que lo normal. También puedes experimentar ardor o dolor en la parte baja de la espalda o la pelvis (Quinn *et al.*, 2008).

En el caso de pacientes neonatales se presentan también síntomas como insuficiencia respiratoria, pérdida de consciencia y visceromegalia.

2.9. Métodos de detección y aislamiento de enterobacterias encontradas comúnmente en ovinos.

La detección de microorganismos en alimentos se debe realizar con la metodología adecuada de acuerdo con el tipo de microorganismo y las características del alimento.

2.9.1. *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo, tanto por parte de las autoridades sanitarias, como en las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección (Stanchi y Martino, 2007).

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos.

Existen diferentes protocolos para el aislamiento de *Salmonella*, todos ellos son esencialmente similares en principio y emplean siguientes etapas:

Preenriquecimiento: en donde se emplea medios como el Agua de peptona tamponada, caldo lactosado.

Enriquecimiento selectivo: los medios que se ocupan para esta etapa son el Caldo selenito-cistina, caldo tetrionato, Vassiliadis-Rappaport, caldo de soya tripticasa, leche descremada reconstituida, caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.

Aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales: Agar verde brillante (VB), Agar con sulfito de bismuto, Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS), Agar entérico Hektoen.

Identificación bioquímica: Agar de tres azúcares y hierro (TSI), Agar de hierro y lisina (LIA), Agar nutritivo, Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad), Agar citrato de Simmons, Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer), Caldo manitol, Caldo malonato, Caldo urea, Caldo de urea rápido, Caldo infusión cerebro corazón (Diario Oficial de la Federación, 1994).

2.9.2. *E. coli*

Los medios de cultivo selectivo para *E. coli* son:

Agar MacConkey: es apropiado para el aislamiento de enterobacterias a partir de materias fecales, orina, alimentos, aguas residuales, etc.

Agar EMB (eosina-azul de metileno). Es un medio selectivo para demostrar la presencia de enterobacterias patógenas y propiciar su aislamiento. No es confirmativo y solo sirve de orientación (Stanchi y Martino, 2007).

Los medios de cultivo para identificación.

Caldo MR-VP (Caldo Rojo de metilo según Voges y Proskauer). Este medio de cultivo se emplea para efectuar el ensayo del “Rojo de metilo”, y la reacción de “Voges y Proskauer”, para procurar la caracterización de enterobacterias.

Agua de triptona (o caldo triptonado). Se emplea para demostrar la producción microbiana de indol a partir de triptófano.

Agar citrato de Simmons. Permite identificar microorganismos, especialmente enterobacterias, que pueden desarrollarse empleando como única fuente de carbono al citrato.

2.9.3. *Enterobacter*

Comparte con las especies de *Klebsiella* muchas pruebas bioquímicas, pero las que pueden diferenciar a ambos géneros son la decarboxilación de la lisina y la movilidad pues en ambos casos *Enterobacter* es positivo.

2.9.4. *Citrobacter*

Medios de cultivo como Agar CIN (cefsulodina, irgasán, novobiocina), contiene manitol y rojo neutro como indicador, presentan un borde transparente con un amplio centro rojo muy intenso.

2.9.5 *Shigella*

Medios selectivos como *Salmonella-Shigella*.

Pruebas bioquímicas: Agar Hierro Tres Azúcares (TSI) y Agar Kligler. Las pruebas citrato de Christensen, acetato de sodio y mucato de sodio son de valor en la diferenciación de los miembros del género *Shigella* y *Escherichia*, particularmente

de biotipos anaerogénicos, no móviles, porque los aislamientos que fermentan mucato o son alcalinos en agar acetato o citrato de Christensen es muy probable que sean *E. coli* (Stanchi y Martino, 2007).

2.10. Conteos de coliformes (*E. coli* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp. de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994).

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.

La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.

Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.

La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.

La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

Soluciones diluyentes:

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada): Agua peptonada

Medio de cultivo: Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

2.11 Epidemiología de la familia Enterobacteriaceae

2.11.1. Epidemiología en ovinos

Se han encontrado diversas enterobacterias en los ovinos, sin embargo, *Salmonella* y *E. coli* son las que se reportan con mayor frecuencia. La salmonelosis produce de forma esporádica, enteritis y muerte de corderos. Los casos individuales suelen ser muy graves cursando con fiebre, abortos, diarrea y alta mortalidad en las ovejas y de los rebaños (Calva, 2007).

Los principales serovares que se encuentran relacionados con la presencia de *Salmonella* en ovinos son *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Dublin. En los casos de *S. Typhimurium* es difícil identificar la fuente primaria de la infección debido a que este serotipo puede ser patógeno para una amplia gama de especies animales (salmonelosis inespecíficas). Por otro lado las ovejas pueden ser portadoras asintomáticas. (Gonzales, 2000).

Las heces de animales con septicemia pueden contener organismos y algunas ovejas excretan la bacteria en el calostro o la leche. Es posible que las secreciones respiratorias sean infecciosas en corderos jóvenes (Gonzales, 2000).

Con respecto a *Escherichia coli* es un colonizador habitual del intestino delgado y grueso los ovinos. Se excreta por las heces y puede sobrevivir en los excrementos y medio ambiente durante meses.

La estructura antigénica de *Escherichia coli* es compleja. Existen cuatro antígenos: el antígeno H (flagelar), el antígeno K (capsular), el antígeno O (somático) y el antígeno F (fimbrias/pili); de los que existen 75, 102, 167 y 12 variantes, respectivamente.

La mayoría de las cepas aisladas a partir de ovinos pertenecen al grupo de *E. coli* enterotoxigénicos (ECET), los cuales expresan como factores de patogenicidad fundamentalmente las adhesinas (k99, k88 y F41) y las enterotoxinas, y son los

responsables de los casos de enteritis con más regularidad en neonatos ovinos (Méndez, *et al.*, 2016).

Por otro lado la *E. coli* (enteropatógenos) también son causantes de diarreas en ovinos. Recientemente se han detectado en la flora intestinal de ganado ovino cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli*, por lo cual se considera a los ovinos como reservorios de dicho patógeno (Mendez, *et al.*, 2016).

2.11.2. Epidemiología en humanos

En los últimos años se ha producido un incremento de las infecciones por enterobacterias en los hospitales favorecido por el uso cada vez mayor de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, el empleo de potentes inmunosupresores y las estancias hospitalarias prolongadas, entre otros factores (OMS, 2012).

El espectro de enfermedades infecciosas está cambiando en conjunto, y se observan variaciones dramáticas en la sociedad y medio ambiente. En los últimos 20 años se han logrado varios avances en el conocimiento de las infecciones gastrointestinales. Entre las enfermedades del tracto gastrointestinal más frecuentes se encuentran las diarreas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año tienen lugar 1,500 millones episodios en países en vías de desarrollo, resultando de éstos en 1,5 millones de muertes. En México, un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4 556 decesos causados por infecciones intestinales. En 2001, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos en el nivel nacional, y que los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla, y el Distrito Federal. Tan solo en 2008, el Seguro Social brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, y los Estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus

representan un severo problema de salud pública para México (Paniagua *et al.*, 2007).

2.11.2.1. Salmonelosis

Las salmonelosis constituyen una de las causas más comunes de gastroenteritis en bebés y niños. Tienen una mayor incidencia en los meses de calor y pueden existir, además, portadores asintomáticos. Se estima que se presentan más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año, con aproximadamente 6 millones de decesos y 1 300 millones de casos de gastroenteritis con una mortalidad de 3 millones.

Con respecto a la morbilidad en 2003, la paratifoidea y otras salmonelosis ocuparon el vigésimo cuarto lugar dentro de todas las causas de enfermedad, con 103 815 casos y una incidencia de 99.62. En 2008, ocupó el décimo noveno lugar, con 122 422 casos y una incidencia de 114.75. Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz. Las entidades federativas con menos reportes fueron Durango, Hidalgo, México, San Luís Potosí, y Tlaxcala. Con respecto al sexo, en 2008, el mayor porcentaje de casos correspondió a mujeres, con 67% (Giono, 2009).

2.11.2.2. Shigelosis

También conocida como disentería bacilar, es endémica en países en desarrollo con medidas sanitarias pobres. Se considera un problema de salud pública mundial. Según datos de la OMS, se ha estimado que 1 millón de millones de episodios de diarrea ocurren anualmente en todo el mundo en niños menores de 5 años, con 5 millones de casos fatales. Otros informes mencionan que, en todo el mundo, 164.7 millones de casos de diarrea son causados anualmente por *Shigella*, de los cuales 163.2 millones (99.9%) tienen lugar en países en vías de desarrollo. De esos 163.2 millones de casos, 1.1 millones culminan en decesos (OMS, 2012).

La shigelosis es endémica en los climas tropicales y templados. En México y en otros países en vías de desarrollo, la más frecuente es *Shigella flexneri*, con 60% de aislamientos con serotipo 2^a; mientras que *Shigella sonnei* es la especie más común en los países industrializados (77%). En nuestro país causa 11% de

frecuencia en enteropatías. En un estudio realizado de 1999 a 2000 con muestras diarreicas de infantes y preescolares, se halló una prevalencia del 4.3% de *Shigella* spp. Paniagua y colaboradores encontraron una prevalencia de 2.6%, correspondiendo 1.6% a *Sh. flexneri* y 1% a *Sh. sonnei*. La shigelosis es importante porque su principal complicación es el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), entidad clínica que representa una de las causas más frecuentes de falla renal en niños menores de 10 años (Hernández *et al.*, 2011).

2.11.2.3. *E. coli*

E. coli agrupa diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales, y otras que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico. La frecuencia de cepas de *E. coli* patogénicas—grupos enterotoxigénicos (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteropatogénico (EPEC), y enterohemorrágico (EHEC)— y no patogénicas ha mostrado una proporción heterogénea bajo condiciones endémicas; mientras que en los brotes se ha encontrado un patrón homogéneo debido a la extensión de las aguas residuales en comunidades cercanas a la ciudad de México (Giono, 2009).

El ETEC se presenta principalmente en niños menores de dos años y, particularmente, durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de esta bacteria es de 10-30%. La infección en los niños en edad escolar y en adultos puede cursar de manera asintomática y poco frecuente, así como producir la diarrea del viajero. En algunos estudios realizados por el InDRE (Instituto de Referencia Epidemiológica) se encontró que el grupo más frecuente es el de ETEC (48%), seguido del EIEC (9%), el EPEC (4%), y el EHEC (1%), aislando cepas de *E. coli* no O157:H7. También se determinó que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos, y que afecta a menores de cinco años. Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud de México, se ha reportado que el EPEC se presenta de manera endémica hasta en 6% de la población, cifra muy parecida a la que presentan países industrializados como Alemania y Australia (Hernández, *et al.* 2011).

Uno de los estudios más importantes, realizados en nuestro país, reporta 21% de cepas de EPEC atípicas, aisladas de 62 niños menores de cinco años, internados por diarrea aguda en hospitales de las ciudades de México y Villa Hermosa (Tabasco). Con los datos epidemiológicos obtenidos, se advirtió que el EPEC puede causar de 17% a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país. Esto indica que, en México, uno de cada cinco niños que enferma de diarrea puede estar infectado por este grupo de *E. coli* (Giono, 2009).

2.12. Biosensores:

Los métodos tradicionales de laboratorio, para detección de agentes patógenos, no son lo suficientemente sensibles, principalmente por el gran número de microorganismos saprofitos que contiene el alimento, la población del patógeno es baja o se distribuyen heterogéneamente en el alimento por lo cual se han desarrollado técnicas para realizar un diagnóstico más rápido y certero como los biosensores.

El desarrollo de biosensores no es ninguna novedad, el primer biosensor fue un analizador de glucosa creado en 1962 por Clark y Lyons, sin embargo, el desarrollo de esta tecnología se ha enfocado a las áreas clínicas y fue hasta hace pocos años que ha ocurrido un incremento en el desarrollo de biosensores aplicables a otras áreas. (Nakamura y Karube 2003).

Un biosensor se define como un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, receptor, anticuerpo, tejido, célula) o biomédico-Polímeros de impresión molecular (PIMs) aptámeros-cadena de oligonucleóticos de cadena sencilla sintetizada artificialmente, Ácidos Nucleídos Peptídicos (PNAs), asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito. (Nakamura y Karube 2003).

2.12.1. Tipos de biosensores

Se clasifican de acuerdo con la heterogeneidad de materiales, las variables de sus componentes estructurales, los mecanismos químicos, físicos o fisiológicos de su funcionalidad, y también de acuerdo a los mecanismos de detección de la señal. Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a las siguientes variables:

- Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.
- Método de detección: directo o indirecto.
- Elemento de reconocimiento: célula, organela, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular (PIM), ácido nucleico peptídico (PNA) u optómero (Mello, 2002).
- Sistema de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico u óptico.

Sensores de interacción biocatalítica y sus principales sistemas de reconocimiento.

Son sistemas *in-situ*, constituidos por organelas, células, tejidos, sistemas enzimáticos o multienzimáticos de origen animal o vegetal, utilizados para la detección de sustratos mediante el comportamiento estequiométrico de productos o reactivos, o mecanismos de inhibición enzimática que intervienen en el proceso, caracterizados por su capacidad regenerativa que no condiciona la dependencia del proceso de la cantidad del mismo.

Entre los elementos de reconocimiento típicos de este tipo de interacciones, se destacan las enzimas, son moléculas inmovilizadas de naturaleza proteica o ribozimica, altamente específicas, eficientes y regulables, acoplables a transductores de tipo calorimétrico, potenciométrico, amperométrico, piezoeléctrico u optoeléctrico (Halamek, 2005); células completas o sometidas a procesos metabólicos que permiten monitorear metabolitos primarios o secundarios, aunque no de forma muy específica y con limitaciones de permeabilidad (Sippy, 2003); organelas encargadas de la producción energética e implicadas en el metabolismo de xenobióticos

específicos, convirtiéndose en indicadores ambientales de contaminación por agentes como pesticidas y contaminantes industriales (Da Silva, 1998), y elementos de reconocimiento como tejidos para control de calidad mediante la determinación de productos de descomposición (Mei, 2007), entre otros.

Sensores de bioafinidad y sus principales sistemas de reconocimiento

Presentan una gran ventaja en cuanto a sus aplicaciones para la detección de residuos de pesticidas, agentes microbianos y alérgenos en alimentos. Se caracterizan por su capacidad para formar complejos entre el analito de interés y el receptor, sin llevar a transformaciones químicas, pero generando excelentes mecanismos de respuesta, aunque con grandes exigencias analíticas para determinar su magnitud (Wang, 2005). Dichas interacciones generan respuestas que demandan sistemas de alta sensibilidad y precisión, cuantificándose a través del seguimiento cinético del proceso en presencia de inhibidores competitivos, marcaje isotópico, comportamiento óptico del proceso o variaciones gravimétricas. Entre los receptores de bioafinidad se destacan las lectinas, las cuales son proteínas de reconocimiento del glucocálix, que exhiben efectos tóxicos para la salud (Ramos, 2001), y polímeros de impresión molecular MIPs, los cuales son moléculas de síntesis con propiedades biomiméticas sobre mecanismos de señalización celular asociados a mecanismos competitivos (Bossi, 2007).

A los anteriores sistemas se suman los anticuerpos, moléculas de naturaleza proteica selectiva, cuyo mecanismo se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo, aplicable a la determinación de enterotoxinas; secuencias monocatenarias de ácido nucleico similares a las abzima, de alta afinidad e incorporables a cromatografía; proteínas periféricas e integrales que generan canales, activación enzimática, gradientes eléctricos que permiten el flujo de moléculas y la intervención de mensajeros celulares, herramienta importante en la detección de residuos de antibióticos β -lactámicos en productos lácteos; sondas de ácidos nucleicos utilizadas en procesos de hibridación *in-situ* acoplados a

transductores ópticos, gravimétricos o electroquímicos para la detección de organismos genéticamente modificados en alimentos; células completas como esporas cuya viabilidad puede ser vulnerada ante metabolitos secundarios, xenobióticos o condiciones de proceso y los ácidos nucleicos peptídicos-PNAs, los cuales son moléculas sintéticas, sin pentosa, sin grupo fosfato y en su reemplazo hay una molécula de N-2-aminoetilglicina, permitiendo mimetizar los ácidos nucleicos, de importancia en citogenética (Mairal, 2008).

Sistema de transducción

La naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito constituye el factor determinante para la selección del sistema de transducción, sin el cual no es posible obtener, amplificar, registrar, sistematizar, almacenar e interpretar las señales producto de la interacción entre estos. En tres los sistemas de transducción más referenciados están los siguientes:

Transductores ópticos

Entre estos se destacan los sensores de fibra óptica u optodo, caracterizados por tener inmovilizado en sus extremos el elemento de reconocimiento y el elemento de detección, así mismo la presencia de marcadores que permitan detectar cambios entre el analito y el elemento de reconocimiento y difundirlos a través de la fibra. Un caso particular lo constituye su uso para la determinación del tiempo de corte del coágulo de la leche en la fabricación de queso de cabra. Al igual que los transductores de fibra óptica, los de onda evanescente-EW requieren marcaje y se fundamentan en la reflexión interna total de fluorescencia por la absorción y emisión de fotones. La concentración del analito de interés se relaciona con los cambios en las características de luz propagada a través de la guía de ondas, que ha podido usarse para sensibilizar la concentración de micotoxinas en cereales (Ngundi *et al.*, 2006). Los interferómetros Mach-Zender fundamentados en los anteriores y en cuyo caso la concentración del analito depende del cambio del campo evanescente

producido por la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, han tenido poca aplicación en el sector agroalimentario. Los transductores de resonancia de plasmones superficiales-SPR, en los cuales los electrones de conducción de un metal oscilan simultáneamente; los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal (oro o plata) ante la exposición a un haz de luz polarizada y la medición del ángulo de resonancia, el cual da información acerca de la concentración real del analito. Contrario a los interferómetros los SPR son de gran utilidad en investigación de productos y procesos alimentarios. Un caso particular lo constituye la investigación de pesticidas organofosforados en matrices líquidas con patrón inverso en el comportamiento de la longitud de onda SPR y la sensibilidad con respecto a la concentración del pesticida estudiado (Rajan y Gupta 2007).

Transductores electroquímicos

Caracterizados por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, son utilizados en sistemas de reconocimiento biocatalíticos. Los biosensores más comúnmente utilizados son los de tipo impedimétrico, conductimétrico, potenciométrico y amperométrico. Entre las aplicaciones más recientes se destacan la utilización de los biosensores amperométricos para el monitoreo de la fermentación maloláctica, determinante de las características de acidez en vinos y monitoreo de concentraciones de glucosa y etanol en procesos de fermentación; monitoreo mediante biosensores impedimétricos de concentraciones de α -solanina y α -chaconina, presentes en papa y tomate; detección de carbofuran y carbaril en aguas utilizando biosensores conductimétricos e inmovilización enzimática en sílica gel, y biosensores potenciométricos para la determinación de butiricolinesterasa, como sensor para glicósidos, organofosforados, carbamatos y metales pesados en papa (Korpan *et al.*, 2006).

Transductores potenciométricos de luz direccionada-LAPS

Son producto de la combinación entre sistemas de transducción óptico y electroquímico. Son sensores químicos constituidos por un electrolito, un aislante y un semiconductor de silicio, sensibles a cambios de pH y multianálisis. Estos sistemas tienen gran aplicación en estudios de genotoxicidad y recientemente se ha publicado una aplicación sobre un sensor artificial de olor y sabor (Wang *et al.*, 2007).

Transductores nanomecánicos

Son de gran impacto y proyección en estudios de genotoxicidad. Constituidos por una microplaca de silicio donde se inmoviliza el elemento de reconocimiento biológico (anticuerpos): la determinación se efectúa por medio del cambio en la tensión superficial entre los dos componentes. Uno de los trabajos de mayor impacto en esta tecnología fue el desarrollado para la determinación del pesticida DDT a concentraciones inferiores a las nanomolares (Álvarez *et al.*, 2003).

Trasductores piezoeléctricos

Conocidos también con el nombre de sistemas de transducción másicos, gravimétricos o acústicos, constituyen un material piezoeléctrico (cristales), caracterizado por entrar en resonancia ante la exposición a un campo electromagnético y soportar el elemento de reconocimiento (proteínas), son versátiles y su uso en el sector alimenticio ha permitido hacer seguimiento de propiedades reológicas como la textura mediante la detección de vibraciones por fractura de las muestras de interés. Su funcionamiento se rige por la detección de cambios másicos del complejo antígeno-anticuerpo, con frecuencias de oscilación de tipo: paquete de onda acústica-BAW, en los cuales la resonancia cubre toda la masa del cristal y de onda acústica de superficie-SAW, donde la resonancia solo ocupa la superficie del cristal (Chang *et al.*, 2000).

Trasductores termométricos

De gran robustez en reacciones enzimáticas y proceso exotérmicos, en las cuales la transferencia de calor se puede relacionar con la concentración del analito de interés, ha permitido determinar valores p_k para sustancias a muy baja concentración (Najib *et al.*, 2007).

MicroSnap^{MT}:

Es un método de prueba bioluminogénico rápido para la detección y enumeración de bacterias, dando resultados de prueba accionables en menos de 8 horas. La plataforma de prueba MicroSnap^{MT} consiste en un dispositivo de enriquecimiento que contiene un medio de crecimiento específico y un dispositivo de detección que contiene un sustrato bioluminogénico (que produce luz). Cuando MicroSnap^{MT} detecta el microorganismo específico, la luz se emite y se mide con el luminómetro EnSURE de Hygiena. Los resultados se almacenan y se rastrean con el software SureTrend gratuito de Hygiena para análisis de datos y tendencias (Meighan, 2014). MicroSnap^{MT} EB es una prueba rápida para la detección y enumeración de bacterias *Enterobacteriaceae* (EB). La prueba utiliza una reacción de prueba bioluminogénica novedosa que genera luz cuando las enzimas que son características de las bacterias EB reaccionan con sustratos especializados para producir luz. La señal de generación de luz se cuantifica entonces en el luminómetro EnSURETM. Los resultados están disponibles en 6 a 8 horas, lo que permite a MicroSnap^{MT} dar resultados en el mismo día de trabajo o turno.

MicroSnap^{MT} ofrece mejoras significativas sobre los métodos tradicionales y otros reduciendo el tiempo, los costos y mejorando la empleabilidad. Las pruebas detectan un mayor rango dinámico que las pruebas tradicionales, lo que lo hace flexible para una variedad de las solicitudes. Con MicroSnap^{MT}, las empresas reciben resultados antes, son más eficientes, y lo más importante, mejoran la inocuidad de los alimentos (Meighan, 2014).

III. Justificación

Los ovinos son importantes reservorios y transmisores de algunas enfermedades que causadas por la Familia *Enterobacteriaceae*, dentro de las que se pueden mencionar a *Salmonella* y *E. coli* las cuales son las de mayor importancia en la producción Ovina.

Con relación a al género *Salmonella* encontramos diversos serovares que afectan a los ovino y a los humanos, el más común es el serovar *S. Typhimurium*, este serovar ocasiona gastroenteritis tanto en ovinos como en humanos.

Para el caso de *E. coli* esta bacteria es un habitante normal de la flora intestinal de los ovinos dentro de este género se encuentran las *E. coli* enterohemorrágicas y productoras de toxina Siga I y II, estas bacterias no afectan a los ovinos por lo que son considerados como un reservorio importante de estos patógenos y puede ser un foco de infección para los seres humanos.

En la actualidad las gastroenteritis asociadas a las ETAS son un problema de salud pública ya que aproximadamente 1,500 millones de casos son reportados anualmente por la OMS 2012 de los cuales 1,5 millones son defunciones, estas infecciones están relacionadas a la contaminación de los alimentos debido a las malas técnicas de sacrificio, el poco control en rastros, el mal manejo que se le da a la canal, el mal procesamiento de la carne, la poca higiene que tienen los despachadores y los expendios.

La principal familia asociada con las ETA's es la familia *Enterobacteriaceae* en donde se puede encontrar a *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* entre otras, las cuales producen cuadros gastroentéricos graves, debido a esto surge la necesidad de analizar los alimentos para prevenir la transmisión de estas enfermedades. La carga microbiológica también es un factor importante ya que de acuerdo a las normas mexicanas hay límites establecidos para que un alimento no sea de riesgo al consumirlo el ser humano.

Para facilitar la identificación de los agentes posibles en las enfermedades transmitidas por los alimentos, estos síntomas se clasifican según el período de incubación y el tipo de síntoma.

La determinación de la presencia o ausencia de esta familia bacteriana se realiza con métodos convencionales descritos en las NOM-112-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994, sin embargo, estas técnicas tradicionales llevan un periodo prolongado para llegar a la identificación del agente infeccioso y regularmente retrasan el tratamiento y control de las enfermedades transmitidas por los alimentos, por lo tanto, surge la necesidad de identificar la presencia de enterobacterias tanto en carne cruda como en productos procesados que son destinados al consumo humano de una manera más rápida y confiable.

Una de las técnicas innovadoras y rápidas para la identificación de enterobacterias y otras familias bacterianas son los biosensores en los cuales dependiendo de su factor de luminiscencia podría dar buenos resultados y superar a los métodos tradicionales como lo son los métodos de cultivo usados por los laboratorios.

Por lo mencionado anteriormente el propósito del proyecto es analizar la calidad microbiológica de la carne de ovino fresca y procesada, con la evaluación de la presencia de enterobacterias mediante el empleo de biosensores y los métodos de cultivos tradicionales, a partir de muestras de carne fresca y carne para consumo humano en distintos expendios de carne.

IV. Hipótesis

El método de cultivo tradicional bacteriano en canales calientes y carne procesada de ovinos es más específico y sensible que el uso de biosensores para la identificación de enterobacterias.

V. Objetivos

Objetivo general

Identificar la presencia de enterobacterias, en la carne de ovino fresca y procesada a través del uso de biosensores y cultivo bacteriano.

Objetivos Específicos

Identificar la presencia de enterobacterias en carne de ovino fresca y procesada en rastro mediante el uso de biosensor.

Identificar la presencia de enterobacterias en carne de ovino fresca y procesada en rastro mediante cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas.

Evaluar la especificidad y sensibilidad al identificar enterobacterias con el empleo de biosensor y cultivo bacteriológico.

VI. Material y Método

Para probar el valor diagnóstico del sistema MicroSnap^{MT} (Método Bioluminógeno) como herramienta diagnóstica para emplearse en los procesos de monitoreo higiénico-sanitario de los productos cárnicos en establecimientos de sacrificio y puntos de venta de carne de ovino; se llevó a cabo un estudio de campo intencionado (Método de encuestas), tomando muestras biológicas (Hisopados) a partir de canales de ovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Capulhuac, Estado de México, y en muestras de carne procesada (Barbacoa) expandidas en diferentes puntos de venta en la periferia de la Ciudad de Toluca, México.

1. Determinación de tamaño de muestra.

El tamaño de muestra se realizó con el procedimiento estándar para determinar un tamaño de muestra, con el uso del método de proporciones, del que se obtiene como resultado 99 muestras de canal ovino y 99 muestras para carne de ovino procesada.

El estadístico de prueba utilizado fue:

$$n = \frac{(z^2)(p * q)}{E^2}$$

n=Tamaño de muestra

$z^2 = 1.96$ Valor z del intervalo de confianza (I.C.=95%)

$p = 0.07$ Estimador de frecuencia

$q = 0.93$ (1-p)

$E = 0.05$ Error esperado

2. Tipo de muestreo.

Es un estudio observacional y transversal. El tipo de muestreo es aleatorio simple, sin remplazo.

3. Obtención de la muestra

3.1. Muestras de canales de ovinos.

El muestreo de campo se llevó a cabo en el Rastro municipal de Capulhuac, Estado de México, se obtuvieron 99 muestras de canales de ovino en el área de inspección y sellado, las muestras se recopilaron en el periodo de enero a julio del año 2015.

Para obtener las muestras se utilizaron hisopos comerciales MicroSnap^{MT} para Enterobacterias, marca Higiene, con número de catálogo 064547. El Paso 1 o “enriquecimiento” específico para detección de enterobacterias: se identificó el costillar izquierdo de la canal de ovino y en una superficie aproximada de 30 cm² el hisopo se frotó en zigzag de acuerdo a lo señalado por el fabricante. El hisopo se regresó a su empaque original y se inició con el proceso. El tubo se guardó y se transportó a temperatura de refrigeración. Las muestras fueron tomadas de esta zona ya que Bravo (2006) menciona en el Manual de procedimientos para el muestreo microbiológico oficial en carnes faenadas en mataderos de exportación que esta es una de las zonas con mayor probabilidad de contaminación.

Figura 1. Lugar de donde se obtuvo la muestra en canal.



Fuente: <https://www.higiene.com/microsnap-eb-enterobacteriaceae-food-and-beverage.html>

3.2. Muestras de carne procesada (barbacoa).

Las muestras de carne procesada de ovino (Barbacoa) se obtuvieron a partir de 99 establecimientos diferentes. La recolección de la muestra se realizó en un horario entre las 9 y 10 de la mañana de los días domingos, durante octubre del 2015 a enero del 2016. La cantidad recolectada de cada muestra fue aproximadamente 50g. La muestra se guardó bajo condiciones de refrigeración para transportarse al laboratorio del Centro de Investigación y Estudios avanzados en Salud Animal. FMVZ UAEM.

4. Identificación de la familia *Enterobacteriaceae* utilizando la técnica de biosensor

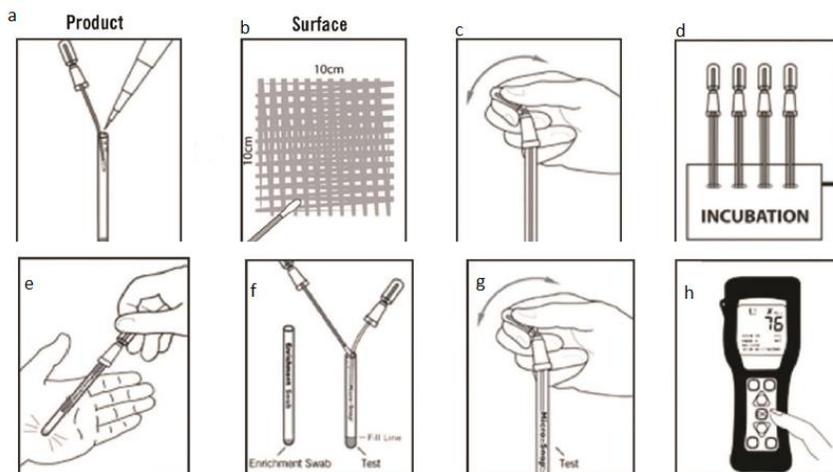
En el laboratorio, se continuaron con los pasos establecidos por el fabricante para la identificación y conteo de enterobacterias (Figura 2. Pasos del a al c).

Paso 1. Enriquecimiento. En la figura 2 paso c se muestra la introducción y agitación del hisopo al tubo con medio de enriquecimiento específicos para enterobacterias. Este procedimiento tarda 8 horas en incubación a 37°C (d).

Paso 2. Detección. En la figura 2 pasos e, f y g, se muestra el procedimiento para la detección de enterobacterias. Después del periodo de incubación se vierte la muestra en un tubo con medios específicos para detectar enterobacterias. La muestra se incuba nuevamente por un lapso de 10 minutos.

Paso 3. Lectura. En la figura 2 paso h, muestra el procedimiento para hacer la lectura utilizando el biosensor. El hisopo es introducido al luminómetro y si hay presencia de enterobacterias, el luminómetro emite una lectura expresada en Unidades Relativas de Luz (URL), cuyas equivalencias se muestran en la Tabla 1.

Figura 2. Procedimiento para la toma de muestra biológica, enriquecimiento, detección y conteo de Cepas de enterobacterias por medio de la técnica de Luminiscencia (MicroSnap^{MT}).



Fuente: <https://www.higienda.com/microsnap-eb-enterobacteriaceae-food-and-beverage.html>

Se realizó la lectura de ellos con el luminómetro (biosensor), que es un sistema rápido de monitoreo de microorganismos patógenos usado en la industria alimentaria. Los resultados fueron capturados en un software Sure Trend versión 3.01.

Tabla 1. Equivalencias entre Unidades Relativas de Luz (URL) y Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).

Enterobacteriaceae	UFC/ml o hisopo
URL	
NA	<10
NA	<20
<10	<50
<20	<100
<40	<200
<100	<500

<200	<1000
<1000	<5000
TNTC	<10000

NA (no aplica), TNTC (aerobios con un número incontable de colonias).

Fuente: Modificado de: <http://www.higienda.com/microsnap-e-coli-food-and-beverage.html>

4.1. Interpretación de la lectura en el Biosensor

La lectura de URL fue interpretada según el tipo de Muestra:

La muestra de canal así como la muestra de carne procesada se consideró positiva a enterobacterias cuando la lectura reveló resultados >40 URL (Unidades Relativas de Luz).

5. Cultivo bacteriológico

Después de observar el resultado obtenido mediante el luminómetro, se realizó el aislamiento e identificación de las bacterias mediante el cultivo tradicional. Primeramente, se tomó el hisopo y se sembró en agar verde brillante y agar MacConkey, las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C; posteriormente se observó el crecimiento, las colonias sospechosas a enterobacterias se sembraron en agar verde brillante a 37°C durante 24 horas, acto seguido se realizaron las pruebas bioquímicas TSI, Citrato, MIO, SIM y Urea, las cuales se inocularon a 37°C por 24hrs y se realizó la interpretación de la siguiente manera (Stanchi y Martino, 2007).

Tabla 2. Interpretación de las pruebas bioquímicas

	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
TSI	K/A	A/A	A/A	K/A	K/A	A/A	A/A	K/A
Citrato	+	-	+	+	-	+	+	-
MIO	+/-/+	+/+/+	+/-/+	+N/V	-N/+	-/-/-	+/+/+	-/-/+
SIM	+/-/+	-/+/+	-/-/+	VN/+	-N/-	-/-/-	-/+/+	-/-/-
Urea	-	-	V	V	V	V	-	-

K/A (base sobre ácido), A/A (ácido sobre ácido), V (variable). (Koneman *et al.*, 1999).

6. Análisis estadístico.

6.1. Estimación de la prevalencia.

En Estimación de la Prevalencia de muestras contaminadas con enterobacterias en canales calientes y carne procesada de ovino se utilizaron como criterio los resultados del método estándar o prueba de oro (Cultivo en Placa). Se obtuvo la prevalencia con un intervalo de confianza del 95%.

6.2. Evaluación diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar *Enterobacterias* en canales calientes y carne procesada de ovino

- a. Prevalencia de muestras contaminadas *con enterobacterias* (%)
- b. Muestras correctamente diagnosticadas (%)
- c. Sensibilidad (%)
- d. Especificidad (%)
- e. Valor predictivo positivo (%)
- f. Valor predictivo negativo (%)
- g. Cociente de probabilidades positivo
- h. Cociente de probabilidades negativo

Tabla 3. Cálculo de indicadores para evaluar la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para identificar y cuantificar cepas de enterobacterias (UFC) en canales y carne procesada de ovino.

Indicador	Ecuación
Prevalencia	$\frac{C}{N}$ c= muestras positivas n=total de muestras
Sensibilidad	Se = $\frac{a}{a+c}$ a= Verdaderos Positivos c= Falsos Negativos
Especificidad	Es = $\frac{d}{b+d}$ b= Falsos Positivos d= Verdaderos Negativos
Valor Predictivo de los positivos	VPp = $\frac{a}{a+b}$
Valor predictivo de los negativos	VPn = $\frac{d}{c+d}$
Cociente de probabilidades positivo	CP+= $\frac{Sen}{1-Esp}$
Cociente de probabilidades negativo	CP-= $\frac{1-Sen}{Esp}$

6.3. Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar enterobacterias en canales y carne procesada de ovino.

Para poder realizar el cálculo del índice de kappa es necesario ordenar los resultados en una tabla de contingencia de 2x2 como la que se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Tabla de contingencia 2x2 para evaluar el sistema MicroSnap^{MT} frente a la técnica estándar (Cultivo en Placa) según Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994).

		Prueba Estándar	
		+	-
MicroSnap ^{MT}	+	A Verdaderos Positivos	b Falsos Positivos
	-	C Falsos Negativos	d Verdaderos Negativos

El índice de kappa es una medida que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada para elementos cualitativos. Se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$K = \frac{P_o - P_c}{1 - P_c}$$

$$P_o = \frac{a + d}{N}$$

$$P_c = \frac{(f_1 * g_1) + (f_2 * g_2)}{n^2}$$

Dónde:

P_0 = Es la proporción de acuerdos observados

P_c = Es la proporción de acuerdos esperados por casualidad

a = Verdaderos positivos

d = Verdaderos negativos

n = Total de muestras

$f_1 = a + c$

$f_2 = b + d$

$g_1 = a + b$

$g_2 = c + d$

Para saber que índice de concordancia tienen ambas pruebas se emplean los valores descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Equivalencia entre valor de kappa con su fuerza de concordancia

Valor de kappa	Fuerza de concordancia
<0	Pobre
0 a 0.20	Leve
0.21 a 0.40	Mediana
0.41 a 0.60	Moderada
0.61 a 0.80	Sustancial
0.81 a 1.0	Casi perfecta

VII. Límite de Espacio

El muestreo se llevó a cabo en el Rastro Municipal de Capulhuac, ubicado en la calle de Ignacio Allende S/N, Capulhuac de Mirafuentes CP: 52700. Capulhuac, Estado de México. Coordenadas 19°11'10.70'', Latitud Norte y 99°28'9.73'' Longitud Oeste.

Figura 3. Ubicación de rastro de Capulhuac, Estado de México



Fuente: INEGI México 2018

Capulhuac es un Municipio del Estado de México. Se encuentra localizado en la zona centro del Estado de México, colinda con los municipios de Xalatlaco, Lerma, Santiago Tianguistenco y Ocoyoacac, presentando una altitud promedio de 2,800 msnm.

VIII. Límite de Tiempo

Actividad	Periodo de tiempo
Muestreo de carne de ovino fresca	Del mes de Enero al mes de Julio 2015
Lectura de patógenos mediante biosensores	Del mes de Enero al mes de Julio 2015
Muestreo de carne de ovino procesada	Del mes de Agosto al mes de Octubre 2015
Registro de Protocolo de Tesis	Octubre del 2015
Localización de muestreo de barbacoa	Se llevo a cabo en los municipios de Atlacomulco, Zinacantepec, Metepec, Capulhuac y Toluca
Lectura de patógenos mediante biosensores	Del mes de Agosto al mes de Octubre 2015
Cultivo bacteriano para carne fresca y procesada	Del mes de Enero del 2015 al mes de enero 2016
Pruebas bioquímicas	Del mes de Enero del 2015 al mes de Enero del 2016
Análisis de resultados	Noviembre del 2015 a Enero del 2016
Aprobación de Protocolo de Tesis	30 de Mayo del 2016

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

Registro de Tesis Concluida	23 de Marzo del 2018
Aprobación de Tesis Concluida	Abril del 2018

IX. Resultados

1. Prevalencia de canales y carne procesada de ovinos contaminadas con enterobacterias.

El análisis de la eficiencia diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT}, para identificar *enterobacterias* en canales calientes y carne procesada de ovinos, durante el proceso de la inspección higiénico-sanitaria de la carne en establecimientos de sacrificio y puntos de venta, y su comparación frente al método Estándar, arrojó los siguientes resultados (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación de enterobacterias en muestras de canales calientes y carne procesada de ovino, comparando el sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar “cultivo en Placa”

Tipo de muestra		Método	
		Cultivo en Placa	Sistema MicroSnap ^{MT}
Canales calientes	Positivas	87	43
	Negativas	12	56
	Prevalencia	87.87	43.43
Carne procesada	Positivas	33	14
	Negativas	66	84
	Prevalencia	33.33	14.14

(p<0.05).

En muestras de canales calientes de ovinos se estima una prevalencia de 87.87%(87/99), la presencia de enterobacterias por medio de la técnica de cultivo

en placa; mientras que con el sistema MicroSnap^{MT}, sólo el 43.43%(43/99), teniendo una diferencia de 44 muestras, lo que representa una amplia discrepancia entre los dos métodos (P<0.05).

En muestras de carne procesada la prevalencia fue de 33.33% por el método estándar y del 14.14%, la diferencia entre ambos métodos fue estadísticamente diferente (P<0.05).

2. Evaluación diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar enterobacterias en canales calientes y carne procesada de ovino.

2.1. Canales calientes

La Tabla 7. Muestra el resumen del análisis de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al método estándar (Cultivo en Placa) para identificar Enterobacterias en muestras de canales calientes de ovinos. El Sistema MicroSnap^{MT} tuvo un índice de verosimilitud de 61.62% (VP+VN/N) frente al método estandarizado; su sensibilidad fue de 62.07% y la especificidad de 91.53%. Por cada muestra detectada con Enterobacterias por el sistema MicroSnap^{MT} se identifican 1.4 muestras por el método estándar. La prevalencia de muestras positivas a Enterobacterias por el sistema MicroSnap^{MT} fue del 87.88%, sin embargo, el 8.5% (5/59) de estas muestras fueron falsos positivos (FP). La mejor bondad que mostró el sistema MicroSnap^{MT} fue para estimar el valor predictivo de los positivos (91.53%).

Tabla 7. Evaluación de la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de enterobacterias en Canales calientes de ovinos.

		Cultivo en Placa		
		Verdadero diagnóstico (Criterio de referencia)		
		Positivo	Negativo	Total
Sistema MicroSnap^{MT}	Positivo	54	5	59
	Negativo	33	7	40
	Total	87	12	99

Parámetros	Valor Puntual	95% I.C.	
		LI	LS
Sensibilidad (%)	62.07	51.3	72.84
Especificidad (%)	58.33	26.27	90.39
Índice de validez (%)	61.62	51.53	71.7
Valor predictivo + (%)	91.53	83.57	99.48
Valor predictivo - (%)	17.5	4.47	30.53
Prevalencia (%)	87.88	80.94	94.81
Razón de verosimilitud +	1.49	0.75	2.97
Razón de verosimilitud -	0.65	0.38	1.13

Software: EPI DAT, v = 3.1

2.2. Carne procesada

En la Tabla 8. se muestra el resumen del análisis de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al método estándar para identificar cepas de

Enterobacterias en muestras de carne procesada (Barbacoa). El Sistema MicroSnap^{MT} obtuvo un índice de verosimilitud 69.70% (VP+VN/N) frente al método estandarizado; sin embargo, la sensibilidad fue de 27.27%, pero la especificidad de 90.91%. En las muestras de carne procesada, por cada muestra positiva a enterobacterias identificada por el sistema MicroSnap^{MT} había 3 que se detectaron por el método estándar.

La prevalencia de muestras positivas a Enterobacterias por el sistema MicroSnap^{MT} fue del 33.33%, sin embargo, el 66.67% (6/9) de estas muestras fueron falsos positivos (FP). La mejor cualidad de este método fue para detectar a los verdaderos negativos (Es=71.43).

Tabla 8. Evaluación de la capacidad diagnóstica del Sistema MicroSnap^{MT} frente al Cultivo bacteriológico tradicional para identificar la presencia de enterobacterias en carne procesada de ovino.

		Cultivo en Placa		
		Verdadero diagnóstico (Criterio de referencia)		
		Positivo	Negativo	Total
Sistema	Positivo	9	6	15
	Negativo	24	60	84
	Total	33	66	99
Parámetros		Valor Puntual	95% I.C.	
			LI	LS
Sensibilidad (%)		27.27	10.56	43.98
Especificidad (%)		90.91	83.22	98.6

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

Índice de validez (%)	69.7	60.14	79.25
Valor predictivo + (%)	60	31.87	88.13
Valor predictivo - (%)	71.43	61.17	81.68
Prevalencia (%)	33.33	23.54	43.12
Razón de verosimilitud +	3	1.17	7.72
Razón de verosimilitud -	0.8	0.64	1

Software: EPI DAT, v = 3.1

Con respecto a las 99 muestras tomadas en rastro se encontró que 43 fueron positivas con la lectura del biosensor de los cuales no se puede saber el género bacteriano ya que únicamente da el resultado de unidades formados de colonias (UFC) mediante la medición de las unidades relativas de luz (URL); y 56 fueron negativas véase el anexo 1.

Con relación al cultivo bacteriano tradicional se encontraron 12 negativos y 87 positivas a la familia *Enterobacteriaceae* se identificaron los géneros *E. coli* 72, *Enterobacter* 2 y *Citrobacter* 13, Los cuales fueron identificados mediante pruebas bioquímicas véase anexo 2.

Con respecto a las 99 muestras tomadas en expendios de barbacoa encontraron que 15 fueron positivas con la lectura del biosensor de las cuales no se puede saber el género bacteriano por la forma en que se expresa el resultado, y fueron 84 negativas véase anexo 3.

Con relación al cultivo bacteriano tradicional se obtuvieron 66 negativos y 33 positivas a la familia *Enterobacteriaceae* encontrando los siguientes géneros *E. coli* 22, *Enterobacter* 6 y *Citrobacter* 5, los cuales pudieron ser identificadas mediante pruebas bioquímicas véase anexo 4.

3. Índice de Concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} frente al Método Estándar para detectar cepas de enterobacterias en canales y carne procesada de ovino.

La tabla 9. Muestra el Índice Kappa (IK) para el nivel de concordancia entre el Sistema MicroSnap^{MT} y el método estándar para identificar Enterobacterias en canales y carne procesada de ovino. El índice Kappa muestra una fuerza de concordancia leve entre ambos procesos en las muestras de canales (IK=0.105) y una fuerza de concordancia mediana en las muestras de carne procesada (IK=0.210).

Tabla 9. Valor de concordancia (índice Kappa) entre el Sistema MicroSnap^{MT} y el Método Estándar (Cultivo en Placa) para identificar cepas de enterobacterias en muestra de canales y carne procesada de ovino.

Tipo de muestra	Índice Kappa
Canales	0.105
Carne procesada.	0.210

De acuerdo a la escala de interpretación del índice Kappa (Tabla 5), se puede observar que el índice de concordancia entre ambas técnicas (MicroSnap^{MT} y cultivo bacteriano tradicional) es pobre, lo que significa que la técnica con MicroSnap^{MT} no es tan confiable para detectar correctamente Enterobacterias; en comparación con el método estándar de cultivo bacteriano en placa.

X. Discusión

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la capacidad diagnóstica del sistema MicroSnap^{MT} frente al cultivo bacteriológico convencional como método de referencia para detectar la presencia de *Enterobacterias* en canales frescas y carne procesada de ovino, se obtuvo una baja capacidad para detectar a los verdaderos positivos 91.53% en canal y del 60% en barbacoa; así como, una baja capacidad para detectar a los verdaderos negativos en canal 17.5%; y un 71.43% en la carne procesada.

El uso de biosensores tiene ventajas las cuales fueron anteriormente descritas por Altamirano *et al*, (2004), la rapidez, repetibilidad, exactitud, análisis directo de las concentraciones sin pretratamiento de muestras o con un pretratamiento mínimo de las mismas, lo que posibilita la detección *in situ*, sin embargo, un aspecto que compromete su uso es la falta de diferenciación de los géneros bacterianos, tal es el caso del biosensor MicroSnap^{MT} para enterobacterias. Normalmente los biosensores presentan una limitada especificidad, debido a que se obtiene una señal global para un conjunto de bacterias que están presentes en la muestra y que eventualmente podrían estar afectando de forma sinérgica. Es decir, que la aplicación de estos biosensores con frecuencia trata de determinar “niveles de contaminación” en general, o contaminación de la carne en términos generales, sin poder especificar las bacterias que están presentes. Este dato puede resultar suficiente en algunos casos, pero conforme a la normatividad se hacen más restrictivas y exigentes, la determinación exacta de un determinado parámetro puede resultar una exigencia insoslayable. La especificidad en los biosensores puede conseguirse a través de un procedimiento de selección para la obtención de biosensores específicos. La aplicabilidad de los biosensores así obtenidos es potencialmente muy elevada, pues en principio sólo se vería restringido por los límites naturales de cada especie de bacterias (Altamirano *et al*, 2004).

La inocuidad alimentaria es tema de importancia en salud pública. En México la NOM-194-SSA1-2004 nos señala que en las canales calientes no se debe de

identificar la presencia de ningún agente bacteriano debido a que el consumo de carne contaminada o de mala calidad es causa de enfermedades en poblaciones humanas expuestas (Momtaz *et al.*, 2013). En la cadena de producción, transformación y comercialización de alimentos de origen animal, cada día se presentan nuevos y novedosos procedimientos automatizados para evaluar la calidad e inocuidad de los alimentos. La industria alimentaria día a día incorpora distintas técnicas que proporcionan información complementaria de forma más rápida y más precisa. En este escenario en las dos últimas décadas del Siglo pasado y la primera del presente Siglo, aparecieron nuevos sistemas de ultrasonido junto con otras técnicas como los biosensores, sensores ópticos e infrarrojos, con el objetivo de optimizar el proceso diagnóstico.

Los métodos microbiológicos estándares para identificar la presencia de Enterobacterias, señalan un aislamiento en placa o la dilución en tubo (NMP), utilizando un medio de cultivo como lo es el agar MacConkey, Agar Base Sangre Sales Bilis Verde Brillante los que permiten la recuperación de microorganismos dañados presentes en la muestra, de lo cual, este proceso lleva aproximadamente 8 días.

Las enterobacterias constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está conformado por 5 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Klebsiella* de los cuales en el presente trabajo solo se encontraron los 3 primeros géneros. Sin embargo, en la NOM-194-SSA1-2004 se menciona que no se debe de encontrar ninguna bacteria en las canales refrigeradas a excepción de *E. coli* la cual tiene como límite máximo de 1000 UFC/g, al encontrar en el presente estudio aislamientos de bacterias que podrían ser patógenos para el hombre, así como

arriba de 1000 UFC/g de *E. coli* se infiere que en los establecimientos estudiados no cumplen con esta norma, lo que podría representar un riesgo en salud pública. Como se observa el método estándar de cultivo bacteriológico para *Enterobacterias* permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de diversos factores por lo que es importante apearse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones (Swanson, KM *et al.*, 2001; FDA, 2003). Por su parte el sistema MicroSnap^{MT} es un método novedoso diseñado para identificar y cuantificar Enterobacterias, en una variedad de alimentos como carne fresca molida, pollo crudo fresco, pollo cocido, leche líquida, bacalao crudo fresco, y agua embotellada. La asociación científica internacional dedicada a la excelencia analítica (AOAC) demostró que el método tiene una buena correlación con el método oficial 966.24 (Meighan, 2014) de la AOAC y con los métodos de referencia para la enumeración y detección de coliformes y *E. coli* de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA). Sin embargo, en el presente estudio al obtener el índice Kappa reveló que el método MicroSnap^{MT} no es tan confiable en comparación con las pruebas bacteriológicas convencionales, debido a que se muestra un bajo índice de concordancia entre ambas pruebas, en canales calientes se obtuvo un índice de kappa de 0.105 menor al encontrado en carne procesada que fue de 0.210. Esto se puede relacionar a que en el proceso de elaboración de la barbacoa puede alcanzar temperaturas mayores a los 60°C temperatura a la que la mayoría de las enterobacterias no pueden sobrevivir según lo menciona Michanie, 2003.

Se menciona que las agencias reguladoras de la inocuidad alimentaria, los laboratorios de control de calidad y los propios consumidores, podrán disponer en un futuro de dispositivos biosensores capaces de realizar análisis de manera más rápida, descentralizada y económica en muestras alimentarias complejas, tanto en las unidades de producción, como en establecimientos de transformación y comercialización de alimentos (FDA, 1999).

La vigilancia epidemiológica se auxilia de herramientas específicas y sensibles para evaluar la calidad sanitaria de la carne. La microbiología de los alimentos cárnicos hace uso de diversas técnicas para identificar patógenos contaminantes; sin embargo, las técnicas de laboratorio disponibles no satisfacen las necesidades en función de costos y tiempo requerido para agilizar el proceso, así como la capacidad y eficiencia diagnóstica requerida.

El sistema MicroSnap^{MT} es un biosensor conformado por un elemento enzimático (β -galactocidasa y β -glucoronidasa) y un substrato bioluminigénico que desarrolla un haz de luz como señal de salida, proporcional a la concentración de la enzima producida en la reacción cuando hay presencia de un microorganismo específico (Meighan, 2014). El sistema MicroSnap^{MT} promete superar la eficiencia diagnóstica de los métodos tradicionales para identificar y cuantificar microorganismos patógenos en el área agroalimentaria; de tal forma, la técnica todavía se encuentra en fase de desarrollo y ajuste.

Los trabajos reportados que usan esta metodología son escasos y relativamente recientes (Meighan, 2014). Las ventajas que ofrece esta técnica, sobre los procesos convencionales se refieren sobre todo al tiempo empleado para obtener un resultado. El proceso oscila entre 6 y 8 horas, agilizando los resultados de diagnóstico en campo. De tal manera que tiene la desventaja de no ser una prueba con buena sensibilidad y especificidad, principalmente al tener pocos valores predictivos de los negativos (VPN), afectándose su especificidad e incrementando la proporción de falsos positivos. No obstante, este proceso técnico se encuentra en desarrollo y requiere de estudios más amplios para evaluar principalmente la fase relacionada con el periodo de incubación, ya que consideran que esta etapa es crítica para el correcto funcionamiento del sistema MicroSnap^{MT}.

Las empresas o establecimientos que transforman o procesan carne se ven en la necesidad de garantizar que los productos que proveen, sean inocuos. En el mismo tenor, las instancias regulatorias oficiales deben verificar la calidad e inocuidad de los productos que se ofrecen al consumidor. En materia de análisis de alimentos de

origen animal para consumo humano se realiza el análisis microbiológico que dé indicios de la inocuidad del producto y de su idoneidad para ser apto para el consumo humano. Muchas veces estos análisis resultan ser exorbitantes en sus costos y demorados; por lo cual se hace necesario contar con métodos o técnicas que permitan desarrollar análisis de manera rápida aumentando la productividad de los laboratorios y lo más importante que proporcione resultados confiables y seguros.

XI. Conclusiones

1. Empleando las técnicas convencionales de aislamiento se lograron identificar los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *E. coli* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en canales de ovino y carne procesada de ovino (Barbacoa).
2. Se identificó la presencia de enterobacterias mediante el uso de los biosensores, sin embargo, no se pudo determinar el género bacteriano en las muestras sometidas al biosensor, caso contrario con el cultivo bacteriano tradicional en donde si se pudo identificar el género bacteriano.
3. La mejor bondad que mostro el del biosensor como técnica de identificación fue para estimar el valor predictivo de los negativos (ES=71.43) en las muestras de carne procesada (Barbacoa).
4. En la actualidad la presencia de una gran cantidad de Enfermedades transmitidas por los alimentos es un problema creciente y por ello surge la necesidad de un diagnóstico rápido y efectivo para determinar si los alimentos de origen animal se encuentran contaminados con bacterias patógenas que podrían afectar a los humanos, sin embargo, en el presente estudio se determinó un índice de concordancia pobre entre las técnicas MicroSnap^{MT} y cultivo bacteriano tradicional, debido a esto se concluye que la técnica con MicroSnap^{MT} no es tan confiable como el método tradicional de aislamiento e identificación microbiológico, por lo cual el trabajo para poder realizar diagnósticos más rápidos aún tiene un recorrido largo de perfeccionamiento, pero que un día no tan lejano se contará con técnicas lo suficientemente confiables y rápidas para el diagnóstico.

XII. Literatura citada

- Altamirano M., García-Villada L., Agrelo M., Sánchez-Martín L., Martín-Otero L., FloresMoya A., Rico M., López-Rodas V., Costas E., 2004. Biosensors & Bioelectronics. Pag. 1319-1323.
- Álvarez M, Calle A, Tamayo J, Lechuga LM, Abad A, Montoya A., 2003 Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. Biosens Bioelectron. Pag. 649-653.
- Arispe, I., y M. Tapia. 2007. Inocuidad y Calidad: Requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Agroalimentaria. Pag. 105-117.
- Avendaño, B., R. S. Rindermann, S. Y. Lugo, y A. Mungaray. 2006. Las hortalizas frescas de exportación. Porrúa. Baja California, México. Pag.189.
- Bhandare S.G., A. Sherikar, A. Paturkar, V. Waskar, R. Zende, 2007. A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Control. Pag. 854-858.
- Barreto, G. 2010. Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en Camagüey, Cuba, durante el período 2000-2008. Revista Electrónica de Veterinaria. Pag. 1-16.
- Bossi A, Bonini F, Turner AP, Piletsky SA. 2007. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art. Biosens Bioelectron. Pag. 1131-1137.
- Bravo, TA. 2006. Manual de procedimientos para el muestreo microbiológico oficial en carnes faenadas en mataderos de exportación. Chile.
- Caffer, M., R. Terragno, y N. Binsztein. 2008. Manual de Procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. 2a. ed. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. WHO. Buenos Aires, Argentina. Pag. 76.
- Calva, E. 2007. *Salmonella* Typhi y la fiebre tifoidea: de la Biología Molecular a la salud pública. UNAM. México. Pag. 1-11.
- Chang SM, Muramatsu H, Nakamura C, Miyake J., 2000. The principle and applications of piezoelectric crystal sensors. Mater Sci Eng. Pag. 111-123.

Codex Alimentarius. 2003. Food hygiene basic texts recommended international code of practice. General principles of food hygiene. CA/RCP 1-1969, rev. 4 2003. CDC. Roma, Italy. Pag. 1-31.

Datta, S., Akter, a., Shah, I., Fatema, K., Islam, T., Bandyopadhyay, A., Khan, Z., Biawas, D., 2012. Microbiological quality Assessment of raw meat and meat products, and antibiotic susceptibility of isolated *Staphylococcus aureus*. Agriculture, Food and Analytical Bacteriology. Pag. 187-194.

Da Silva EM, Soares AM, Moreno AJ. The use of the mitochondrial transmembrane electric potential as an effective biosensor in ecotoxicological research. Chemosphere. Pag. 2375-2390.

Essers, S. 2005. Inocuidad de alimentos y seguridad alimentaria. Segundo curso de Postgrado de SA y Pobreza, Guatemala. Universidad de Wageningen. Países Bajos. Pag. 32.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). Dirección de Información de la FAO. Roma, Italia. Pag. 248.

FDA. Food and Drug Administration. 2003. "Bacteriological Analytical Manual". 9th ed. Arlington, VA: AOAC.

FDA (U. S. Food and Drug Administration). 1999. The problem of foodborne illness, Partnership for Food Safety Education. U. S. Pag. 35.

Figueroa, I. M., y A. Verdugo. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. Revista Latinoamericana de Microbiología. Pag. 25-42.

Fukushima, M., Kakinuma, K., Ryuji, K., 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* Gene sequence. Journal of Clinical Microbiology. Pag. 2779-2785.

Giono, S. "Diagnóstico de las enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal". En: Hernández, JT., García, CRE., Giono CS., Aparicio, OG. Bacteriología Médica diagnóstica. México, 2009: 79-81, 134.

- Gonzales, L. 2000. "Salmonella infection." In Diseases of Sheep, 3rd ed. Edited by W.B. Martin and I.D. Aitken. Malden, MA : Blackwell Science. Pag. 102-7.
- Halamek J, Pr ibyl J, Makower A, Skladal P, Scheller FW. Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. Anal Bioanal Chem. 2005; 382 (8): 1904-11.
- Hayes JR et al. 2003. Appl Environ Microbiol. Pag. 7153.
- Henríquez, P., y M. Lizano. 2008. Sistemas de aseguramiento de inocuidad y calidad de productos hortofrutícolas. IICA. El Salvador. Pag. 11-17.
- Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. 2011. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Vol. 31. Pag 138.
- Hurtado L., 2010 Prevalencia de contaminación microbiológica de la carne producida en el Frigorífico y Rastro de Morelia, S.A. de C.V. Tesis de Maestría. INSP. Morelia, Mich.
- ICMSF. 1998. Microorganisms in Foods - Microbial Ecology of Food Commodities. Vol 6, Blackie Academic & Professional, London.
- Kauffmann-White, F. 1966. The Bacteriology of *Enterobacteriaceae* collected studies. Baltimore: Williams y Wilkins. 3th. ed. Wisconsin University, U. S. Pag. 400.
- Koneman, E., Allen, s., Janda, W., Schreckenberger, Paul. y Winn, W., 1999. Diagnostico Microbiológico. Quinta edición. Editorial Panamericana. Pag. 173-197
- Kopper, G., y G. Calderón. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe Técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. FAO. Roma, Italia. Pag. 194.
- Korpan YI, Raushel FR, Nazarenko EA, Soldatkin AP, Jaffrezic- Renault N, Martelet C., 2006. Sensitivity and Specificity Improvement of an Ion Sensitive Field Effect Transistors-Based Biosensor for Potato Glycoalkaloids Detection. J. Agric. Food Chem. Pag. 707-712.
- Mairal T, Cengiz Özalp V, Lozano Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. Anal Bioanal Chem. Pag. 989-1007.

- Marcos, L. A. and H. L. DuPont. 2007. Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. *Journal of Infection*. Pag. 385-93.
- Martínez, E., M. Varela, C. Cevallos, A. Torres, y P. Ordóñez. 2008. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Pag. 241-248.
- McDonald K., D.W. Sun, 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Pag. 1-27
- Mei Y, Ran L, Ying X, Yuan Z, Xin S. 2007. A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosens Bioelectron*. Pag. 871-876.
- Meighan, P. 2014. Validation of the MicroSnap Coliform and E. coli Test System for Enumeration and Detection of Coliforms and E. coli in a Variety of Foods. *Journal of AOAC International*. Pag. 453-476.
- Mello LD, Kubota LT. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem*. Pag. 237-256.
- Méndez, A. Maldonado, A. Ruiz-Villamor, E. Luque, I. Bautista, M. Huerta, B. Sierra, E. Borge, C. 2016. Enfermedades neonatales. Pag. 23.
- Michanie, S., 2003. Escherichia coli O157:H7, La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Ganados y carnes*. Pag. 40-42.
- MicroSnap^{MT}. Manual de uso. Recuperado a partir de:
<https://www.higiene.com/microsnap-eb-enterobacteriaceae-food-and-beverage.html>
- Momtaz, H., Dehkordi, F. S., Rahimi, E., Ezadi, H., & Arab, R., 2013. Incidence of Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups in ruminant's meat. *Meat Science*. Pag. 381-388.
- Najib FM, Zewar S, Abdulla AM., 2007. A new sensor for thermometric titrations. *Talanta*. Pag. 141-148.
- Nakamura, H. y Karube, I. 2003 Current research activity in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 377.

- Ngundi MM, Shriver-Lake LC, Moore MH, Ligler FS, Taitt CR., 2006. Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array. J Food Prot. Pag. 69.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa 1994.
- Diario Oficial de la Federación, 1994. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos 1994.
- OIE (Organización Mundial de Salud Animal). 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.9.9. Pag 1.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2012. Estadísticas sanitarias mundiales 2012. OMS. Ginebra, Suiza. Pag. 180.
- Paniagua, GL., Monroy, E., García, O., Alonso, J., Negrete, E., Vaca, S., 2007. "Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children". Annals Clin Microbiol and Antimicrobials. Pag 6: 1-8.
- Parra, M., J. Durango, y S. Máttar. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Revista MVZ Córdoba. Pag. 187-200.
- Podpečan B., A. Pengov, S. Vadnja,,L. 2007. The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. Slovenian Veterinary Research. Pag. 25-30.
- Public Health Agency of Canada. Enterobacter: Pathogen safety data sheet- Infectious substances [Internet]. 2011 [citado 26 de noviembre de 2015].
- Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, W., Leonard, F. 2008. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.
- Rajan SC, Gupta BD., 2007 Surface plasmon resonance based fiberoptic sensor for the detection of pesticide. Sensors and Actuators B: Chemical. Pag 123.
- Ramos MV, Sampaio AH, Cavada BS, Calvete JJ, Grangeiro TB, Debray H., 2001. Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. Glycoconi J. Pag. 391-400.

Recuperado a partir de: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psdsftss/enterobacter-eng.php>

Roberts, J. and D. Orden. 1999. A framework for analyzing technical trade barriers in agricultural markets. Technical Bulletin No. 1879. USDA. Washington, U. S. Pag.

Signorini, M. Civit, S. Bonilla, M. Cervantes, E. Calderón, M. Pérez, A. Espejel, P. Almaza, C. 2006. Evaluacion de riesgos de los rastros y mataderos municipales.

Sippy N, Luxton R, Lewis RJ, Cowell DC., 2003. Rapid electrochemical detection and identification of catalase positive micro-organisms. Biosens Bioelectron. Pag.18 (5-6): 741-749.

Stanchi, N., Martino, P., 2007. Microbiología Veterinaria. Inter-Medica. Buenos Aires Argentina.

Swanson K.M., Petran R.L., Hanlin J.H. (2001) "Culture Methods for Enumeration of Microorganisms". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. Pag 53-67.

Tindall, B. J., P. Grimont, G. M. Garrity, and J. P. Euzéby. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Pag. 524

Todd, E. C. 2000. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. World Health Stat. Pag. 30-50.

Turner AP, Newman JD., 1998. An introduction to biosensor. En: Biosensor for Food Analysis, T. W. Gateshead, Ed. London, U.K.: Athaenaeum. Pag. 13-27.

USDA (U. S. Department of Agriculture). 2011. Parásitos y las enfermedades transmitidas por alimentos. En: Información sobre inocuidad de alimentos. USDA. EE. UU. Pag. 8.

Vargas, J., N. Clavo, y S. Máttar. 2004. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en cerdos en el Departamento de Córdoba. Revista MVZ Córdoba. Pag. 386-392.

Wang J., 2005. Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions. Small. Pag. 1036-1043.

Wang P, Liu Q, Xu Y, Cai H, Li Y., 2007. Olfactory and taste cell sensor and its applications in biomedicine. *Sensors and Actuators A: Physical*. Pag. 131-138.

Wolffs P., Radstrom P., 2006. Realtime PCR for the detection of pathogens in meat. Capítulo 6, En: *Advanced Technologies for Meat Processing*, L.M.L. Nollet y F. Toldrá, Ed., Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker. Pag. 131- 154.

XIII. Anexos

Anexo 1. Medición de las unidades relativas de luz (URL) en los biosensores cultivados en muestras de carne de ovinos.

Enterobacterias

Número muestra	Resultado hisopo URL	Resultado hisopo +/-
-----------------------	-----------------------------	-----------------------------

Referencia

4	43	1
5	10	0
6	51	1
7	37	0
8	43	1
9	33	0
13	25	0
20	348	1
26	37	0
27	38	0
28	157	1
29	63	1
31	892	1
32	165	1
33	640	1
34	362	1
35	357	1
37	353	1
38	406	1
39	218	1
40	576	1
41	519	1
42	615	1
43	612	1
44	631	1
45	262	1
46	393	1
47	145	1

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

48	24	0
49	28	0
50	220	1
51	12	0
53	21	0
56	56	1
57	16	0
58	52	1
61	159	1
65	12	0
67	74	1
69	26	0
71	55	1
72	10	0
73	41	1
75	36	0
76	612	1
78	290	1
79	145	1
80	60	1
82	568	1
83	274	1
84	11	0
90	325	1
91	138	1
92	87	1
93	776	1
95	12	0
96	318	1
97	147	1
98	83	1

Nota: 0: Negativo, 1: Positivo

Anexo 2. Pruebas bioquímicas a los aislamientos de bacterias obtenidos de canales de ovinos.

Número muestra	PRUEBAS BIOQUÍMICAS												Identificación bacteriana
	TSI				CITRATO	MIO			SIM			UREA	
Referencia	fondo	superficie	Gases	Sulfuro	cambio de color	movilidad	indol	ornitina	sulfuro	indol	movilidad		
3	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
4	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
5	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
6	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
7	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
8	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
9	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
11	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
12	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
13	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
14	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
15	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
16	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
17	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
18	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
19	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
20	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
21	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
24	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
26	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
29	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
31	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
32	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
33	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
34	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
35	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
36	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
37	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

38	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
39	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
40	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
42	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
43	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
44	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
45	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
46	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
47	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
48	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
49	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
50	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
51	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
52	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
53	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
54	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
55	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
56	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
57	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
58	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
59	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
60	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
61	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
62	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
63	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
64	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
66	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
67	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
68	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
69	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
70	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
71	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
72	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
73	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
74	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	<i>E. coli</i>
75	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
76	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
77	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
78	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
79	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>E. coli</i>

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

80	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
81	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
82	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
83	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
84	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
85	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
86	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
87	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
88	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
89	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
90	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
92	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
93	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
94	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
95	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
96	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
97	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
98	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
99	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>

Nota: 0: Negativo, 1: Positivo

Anexo 3. Medición de las unidades relativas de luz (URL) en los biosensores cultivados en muestras de carne procesada (Barbacoa).

Enterobacterias

Número muestra	Resultado hisopo URL	Resultado hisopo +/-
-----------------------	-----------------------------	-----------------------------

Referencia

108	370	1
115	307	1
125	11	0
126	598	1
134	109	1
135	152	1
138	220	1
140	73	1
144	104	1
146	245	1
148	240	1
152	42	1
162	373	1
182	161	1
183	122	1

Nota: 0: Negativo, 1: Positivo

Identificación de enterobacterias, en carne de ovino fresca y procesada con empleo de biosensores y cultivo bacteriano

Anexo 4. Pruebas bioquímicas a los aislamientos de bacterias obtenidos de canales de ovinos.

Número muestra	PRUEBAS BIOQUÍMICAS											UR EA	Identificación bacteriana
	TSI				CITRATO	MIO			SIM				
Referencia	fondo	superficie	gas	sulfuro	cambio de color	movilidad	indol	ornitina	sulfuro	indol	movilidad		
103	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
104	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
105	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	<i>Citrobacter</i>
108	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
110	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
115	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
116	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
117	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
118	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	<i>Citrobacter</i>
120	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
125	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
126	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
133	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
134	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
135	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
136	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
140	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Enterobacter</i>
145	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
152	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
155	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
159	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
160	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
163	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
164	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>Citrobacter</i>
166	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
174	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	<i>Enterobacter</i>
183	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>Citrobacter</i>
187	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
192	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
194	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
197	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	<i>Enterobacter</i>
198	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>
199	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	<i>E. coli</i>

Nota: 0: Negativo, 1: Positivo