



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Salmonella* *typhimurium* EN CARNE DE CERDO, RES Y POLLO

MONZERRAT ROSAS ESPEJEL

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

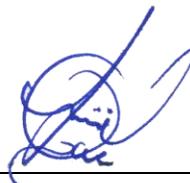
2014

La presente tesis titulada: **Estandarización y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo**, realizada por la alumna: **Monzerrat Rosas Espejel**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

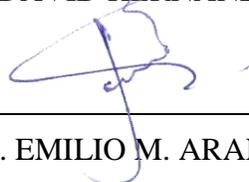
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESOR



DR. EMILIO M. ARANDA IBÁÑEZ

ASESOR



DRA. LEONOR MIRANDA JIMÉNEZ

ASESOR



DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2014

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL
DIAGNÓSTICO DE *Salmonella typhimurium* EN
CARNE DE CERDO, RES Y POLLO

Monzerrat Rosas Espejel, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

El estudio tuvo como objetivo estandarizar y validar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella typhimurium* (*St*) en carne de cerdo, res y pollo, optimizando el tiempo y la sensibilidad con relación al método microbiológico; además se realizó el diagnóstico en estos tipos de carnes para evaluar su calidad microbiológica en la Ciudad de Texcoco. Un total de 60 muestras de carne (20 de cerdo, 20 de res y 20 de pollo) de 250 g fueron recolectadas en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco. Las muestras recolectadas procedían de carnicerías, tianguis y supermercados. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar *St*; asimismo, se validó esta técnica en relación al método microbiológico con base al nivel de concordancia y finalmente se realizó un diagnóstico de la incidencia de *St*. El cálculo de sensibilidad y especificidad se realizó utilizando la tabla 2x2; el nivel de concordancia se estableció utilizando la prueba de McNemar y el índice Kappa, y el nivel de incidencia de *St* fue calculado con el uso de frecuencias y el porcentaje de muestras contaminadas. La concentración mínima de detección de DNA fue de 0.310 ng μL^{-1} . El gen *InvA* y el gen *fliC* mostraron una sensibilidad y especificidad del 100% revelado en la PCR. Se obtuvo un nivel de concordancia entre la PCR y el método microbiológico del 88% para la carne en general. Un total de 10, 5 y 10% de carne de cerdo, res y pollo respectivamente, analizadas por PCR fueron positivas a *St*. Ninguna de las muestras de supermercado fue positiva a *St*. El método desarrollado en el presente estudio demostró ser rápido y específico para la detección de *Salmonella typhimurium* para los tipos de carnes analizadas.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*, PCR, carne, validación.

PCR STANDARDIZATION AND VALIDATION FOR *Salmonella typhimurium*
DIAGNOSTIC IN PORK, BEEF AND CHICKEN MEAT

Monzerrat Rosas Espejel, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

The aim of this study was to standardize and validate the Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Salmonella typhimurium* (*St*) detection in pork, beef and chicken meat, optimizing time and sensitivity in relation to microbiological method; further diagnostic was performed in Texcoco City retail outlets, using these kinds of meats to evaluate its microbiological quality. A total of 60 meat samples (20 pork, 20 beef and 20 chicken) of 250 g were collected from retail outlets in Texcoco City. Meat samples were collected from butchers, street markets and supermarkets. The sensitivity and specificity of the PCR for *St* was evaluated; also, this technique was validated with respect to the microbiological method based on the concordance level and finally, diagnosed of *St* incidence was performed. Sensitivity and specificity was calculated using the 2x2 table; the level of concordance was established using the McNemar test and Kappa index, and the incidence of *St* on meats collected was calculated using frequency and percentage of samples contaminated. The minimum concentration of DNA detection was $0.310 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. The *InvA* and the *fliC* genes showed 100% of sensitivity and specificity though to PCR, and 88% of concordance between PCR and microbiological method for the meats analyzed in general. Overall, 10, 5, and 10% of pork, beef and chicken meat respectively, tested with PCR were positive to *St*. Meats samples from supermarket resulted negative to *St*. Method developed in this study proved a rapid and specific tool for *Salmonella typhimurium* detection.

Key words: *Salmonella typhimurium*, PCR, meat, validation.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado durante mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados. Especialmente al programa de Ganadería por permitirme desarrollar profesional y académicamente, a través de mis estudios de maestría.

A la LPI 7, Inocuidad, Calidad de Alimentos y Bioseguridad, por el apoyo recibido para la realización de esta investigación.

Al Dr. David Hernández Sánchez, por haber confiado en mí en el inicio de mi trayecto por esta institución, por todo su apoyo, orientación y conocimientos brindados.

Al Dr. Emilio M. Aranda Ibáñez, por formar parte de mi consejo particular y su apoyo en los acontecimientos que surgieron en mi estancia en la institución.

A la Dra. Leonor Miranda Jiménez, por los conocimientos aportados a mi formación y por la ayuda brindada durante la realización de mi proyecto.

Al Dr. Gabriel Leyva Ruelas, por formar parte de mi consejo particular y por las correcciones realizadas a los escritos.

A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán, por el apoyo y el tiempo dedicado al análisis estadístico de los datos de la tesis.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván, por su apoyo incondicional en el laboratorio y sus acertados consejos.

A la Ing. Margarita Crosby Galván, por su apoyo y conocimientos brindados y siempre alentarme para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, tu que en silencio me has acompañado a lo largo de mi vida y sin pedir nada a cambio, hoy me regalas la alegría de ver realizado uno más de mis sueños.

A mis papas, Martha Espejel Morales y Antonino Rosas Gonzales, por darme la vida e inculcarme los valores que ahora poseo, por todo el amor que a lo largo de mi existencia he recibido de su parte y haberme apoyado en los momentos más difíciles, ya que sin su amor y comprensión no hubiera podido salir adelante y lograr lo que en estos momentos soy. Por todo lo que significan en mi vida y por todo lo que me han dado solo les puedo decir...Gracias.

A mis hermanos, Diana y Sergio con mucho cariño para ustedes por estar conmigo en todo momento compartiendo cada uno de mis logros.

A Jorge, por los momentos que durante este tiempo hemos compartido, por siempre alentarme a seguir adelante y por el apoyo que me brindaste para culminar una más de mis metas.

A mis Abuelitos Consuelo[†], Julia, Moisés y Lázaro[†], por todos los sabios consejos que me han brindado para ser una mejor persona, y todos los cuidados que han tenido hacia mí.

A mis tías, tíos, primas y primos, por los buenos deseos que siempre han tenido hacia mí y por el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

A todos los profesores del Colegio de Postgraduados y en especial a los del Programa de Ganadería, por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación profesional.

Con mucho cariño para ustedes

Monzerrat

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Producción, importación y exportación de carne en México.....	3
2.1.1. Producción de carne en México.....	3
2.1.2. Importación y exportación de carne en México.....	5
2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	6
2.3. Situación de enfermedades transmitidas por alimentos en México.....	9
2.4. Características del género <i>Salmonella</i>	10
2.5. Contaminación de productos cárnicos por <i>Salmonella</i>	12
2.6. Detección de <i>Salmonella</i> en Alimentos.....	16
2.6.1. Detección de <i>Salmonella</i> en alimentos por método microbiológico	16
2.6.2. Detección de <i>Salmonella</i> en alimentos por PCR.....	19
2.7. Validación de métodos analíticos.....	21
III. OBJETIVOS.....	23
3.1. General.....	23
3.2. Específicos.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Ubicación.....	24
5.2. Muestreo.....	24
5.3. Cepas de control.....	25
5.4. Inoculación artificial.....	25

5.5. Detección de <i>Salmonella</i> mediante método microbiológico.....	26
5.6. Detección de <i>Salmonella typhimurium</i> mediante PCR.....	27
5.6.1. Extracción de DNA de muestras de carne.....	27
5.6.2. Iniciadores.....	27
5.6.3. Controles.....	28
5.6.4. Condiciones de PCR.....	28
5.6.5. Mezcla de reacción de PCR.....	28
5.6.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	29
5.6.7. Concentración de detección mínima de DNA.....	29
5.6.8. Especificidad y sensibilidad relativa.....	29
5.7. Análisis estadístico.....	29
5.7.1. Calculo de sensibilidad y especificidad relativa.....	29
5.7.2. Índice de McNemar.....	30
5.7.3. Índice de Kappa.....	31
5.7.4. Incidencia de <i>Salmonella typhimurium</i>	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1. Validación de la técnica de PCR.....	33
6.1.1. Concentración mínima de detección de DNA.....	33
6.1.2. Especificidad y sensibilidad relativa.....	36
6.2. Comparación de metodologías; microbiológica vs PCR.....	39
6.3. Incidencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en carne de cerdo, res y pollo en puntos de venta de la ciudad de Texcoco.....	44
6.3.1. Incidencia por tipo de carne (cerdo, res y pollo).....	46
6.3.2. Incidencia por tipo de establecimiento.....	51

VII. CONCLUSIONES.....	55
VIII. LITERATURA CITADA.....	56
IX. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	8
Cuadro 2. Porcentaje de muestras de res (bistec) positivas a patógenos por región en México.....	16
Cuadro 3. Iniciadores para los genes InvA y fliC.....	27
Cuadro 4. Tabla 2x2 para comparar los resultados de la PCR en muestras inoculadas y no inoculadas.....	30
Cuadro 5. Tabla cruzada de los resultados de dos variables dicotómicas con el mismo resultado (método 1 y método 2).....	30
Cuadro 6. Escala de interpretación del valor Kappa.....	32
Cuadro 7. Lecturas de la concentración del DNA en las diluciones.....	34
Cuadro 8. Especificidad y sensibilidad relativa de la PCR para detección de <i>Salmonella typhimurium</i>	37
Cuadro 9. Resultados de las muestras de carne de cerdo, res y pollo analizadas con método microbiológico y la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i>	40
Cuadro 10. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i> en muestras de carne de cerdo, res y pollo	40
Cuadro 11. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i> en muestras de carne de cerdo.....	41
Cuadro 12. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i> en muestras de carne de res.....	41

Cuadro 13. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de
Salmonella typhimurium en muestras de carne de pollo..... 42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción de carne en México en el 2012 (toneladas y porcentaje)	3
Figura 2. Producción media anual de carne en el municipio de Texcoco (toneladas/año).....	4
Figura 3. Precio medio anual de carne en el municipio de Texcoco (\$ kg ⁻¹)....	5
Figura 4. Posibles causas de enfermedades transmitidas por alimentos.....	7
Figura 5. Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella</i> según la norma NOM-114-SSA1-1994.....	18
Figura 6 (a). Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para los genes InvA para <i>Salmonella</i> y fliC para <i>Salmonella typhimurium</i> , por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.....	33
Figura 6 (b). Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para los genes InvA para <i>Salmonella</i> y fliC para <i>Salmonella typhimurium</i> , por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.....	34
Figura 7 (a). Prueba de especificidad de los iniciadores del gen InvA y del gen fliC, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.....	36
Figura 7 (b). Prueba de especificidad de los iniciadores del gen InvA y del gen fliC, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.....	37
Figura 8. Incidencia de <i>Salmonella typhimurium</i> en carne de cerdo, res y pollo en puntos de venta de la ciudad de Texcoco.....	45
Figura 9. Incidencia de <i>Salmonella typhimurium</i> (n=60) por tipo de carne (cerdo, res y pollo).....	47

Figura 10. Incidencia de *Salmonella typhimurium* por tipo de establecimiento..... 52

I. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los países se ha incrementado la preocupación por asegurar el suministro de alimentos libres de peligros químicos, físicos y biológicos, debido al riesgo que esto representa para la salud humana; además de ser la base para incrementar la participación de los alimentos en el comercio internacional, y contribuir para certificar la inocuidad de los productos alimenticios de importación y exportación (Mercado, 2007).

Entre los alimentos de origen pecuario que implican alto riesgo, se encuentran los productos cárnicos, en donde se han reportado casos de contaminación por microorganismos como *Salmonella* y *Escherichia coli* entre otros.

Actualmente, la identificación de estos microorganismos se realiza por métodos convencionales que requieren de 5 a 10 días, para conocer su presencia o ausencia en productos sospechosos (Li, 2004). Sin embargo, en la industria alimentaria estos métodos no permiten la toma de decisiones rápidas, causando incrementos en el costo de producción y pérdidas económicas considerables de productos perecederos.

Los avances tecnológicos, han desarrollado herramientas como la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés), que permiten detectar con rapidez y sensibilidad la presencia de microorganismos contaminantes en carne y otros alimentos crudos o procesados (Rodríguez y Barrera, 2004).

La detección oportuna y confiable de patógenos bacterianos en cualquier etapa de la producción y comercialización de la cadena cárnica, es un paso importante hacia su control, monitoreo y prevención.

En este sentido, la implementación y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de enteropatógenos como *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, pollo y res, permitirá contar con una herramienta confiable y rápida, que permita contribuir a un control eficiente

del proceso de producción, almacenamiento y venta, así como al monitoreo de las Buenas Prácticas de Manejo en la cadena productiva de la carne, y la toma de decisiones a corto plazo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Producción, importación y exportación de carne en México

2.1.1. Producción de carne en México

Las tres principales especies que se producen en México son pollo, res y cerdo. La producción nacional en el 2012 fue aproximadamente de 2.79 millones de toneladas de carne de pollo, 1.82 millones de toneladas de carne de res y por ultimo 1.23 millones de toneladas de carne de cerdo. La producción nacional de carne se muestra en la Figura 1. Los principales estados productores de carne de pollo son: Jalisco, Durango, Veracruz, Aguascalientes y Querétaro; de carne de res son: Veracruz, Jalisco, Chiapas, Chihuahua y Sinaloa. Mientras que de cerdo son Jalisco, Sonora, Puebla, Guanajuato y Veracruz (SIAP, 2013).

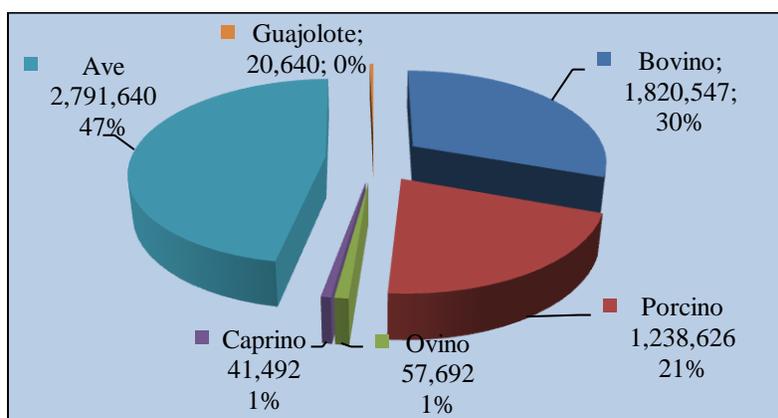


Figura 1. Producción de carne en México en el 2012 (toneladas y porcentaje). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las delegaciones de la SAGARPA (SIAP, 2013).

El estado de México ocupa el décimo primer lugar en producción de carne de pollo, con un aproximado de 124 mil toneladas. Los principales municipios del estado de México productores de carne de pollo son Jilotepec, Polotitlán y Zumpango. El municipio de

Texcoco ocupa la cuarta posición con una producción de 6.77 mil toneladas de carne pollo en el 2012.

El estado de México ocupa el décimo séptimo lugar con una producción de carne de res de 83 mil toneladas, los principales municipios productores de carne de res en el estado de México son Tlatlaya, San José del Rincón y Amatepec. El municipio de Texcoco ocupa la décima tercera posición con una producción de 1.03 mil toneladas de carne de res en el 2012 (SIAP, 2013).

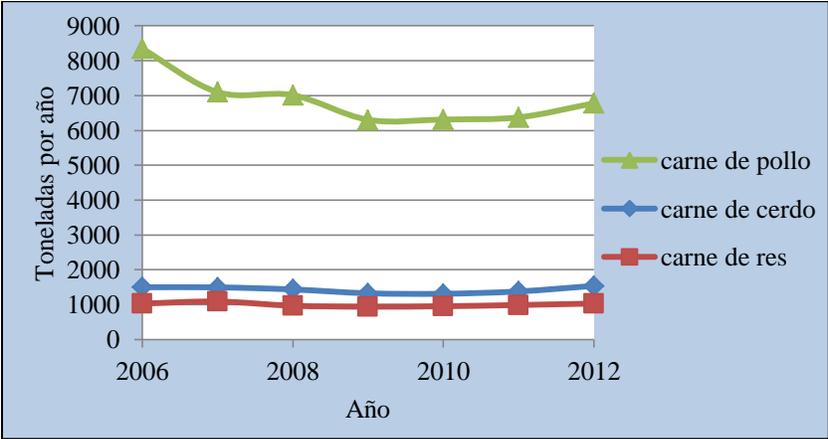


Figura 2. Producción media anual de carne en el municipio de Texcoco (toneladas/año). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las delegaciones de la SAGARPA (SIAP, 2013).

El estado de México ocupa la décimo tercera posición con una producción de 27 mil toneladas de carne de cerdo, los principales municipios productores carne de cerdo en el estado de México son Texcoco, Jilotepec y Zumpango. El municipio de Texcoco es el principal productor con un total de 1.5 mil toneladas de carne de cerdo en el 2012 (SIAP, 2013).

Según las estadísticas en el municipio de Texcoco en los últimos años se ha tenido una mayor producción anual de carne de pollo, seguida de la carne de cerdo y finalmente la carne de res como se observa en la Figura 2; siendo muy probablemente la causa principal

el precio medio anual que presenta cada una de las especies como se muestra en la Figura 3 ya que a mayor precio menor es la demanda del producto y a menor precio la demanda aumenta (SIAP, 2013).

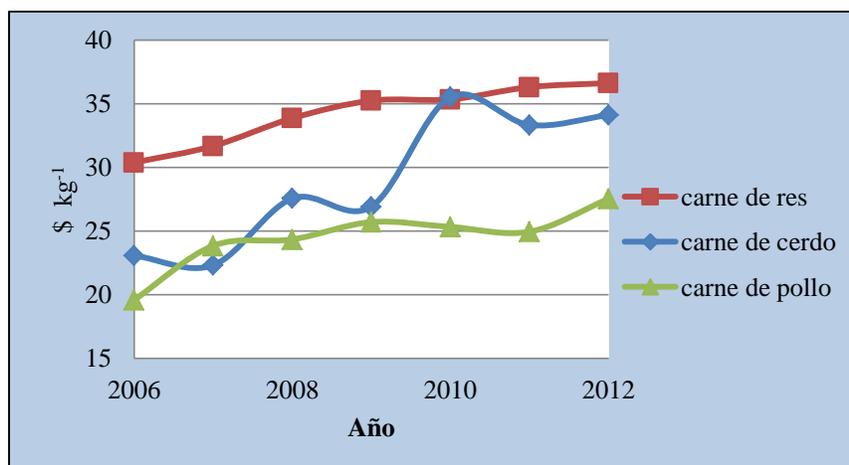


Figura 3. Precio medio anual de carne en el municipio de Texcoco (\$ kg⁻¹). Elaboración propia con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las delegaciones de la SAGARPA (SIAP, 2013).

2.1.2. Importación y exportación de carne en México

México registra para el 2010 la mayor importación de carne de res de los últimos años con un volumen de 273,000 toneladas, en el año 2012 se importaron 197,000 toneladas, aumentando para el 2013 a 212,000 toneladas. La mayor parte de las importaciones provienen de Estados Unidos y de Canadá, mientras que la exportación más importante fue la del 2012 con un volumen de 177,000 toneladas, en el 2013 se exportaron 144,000 toneladas (AMEG, 2014).

Las importaciones de carne de cerdo fresca, refrigerada y congelada se han mantenido constantes durante los últimos años. La Confederación de Porcicultores Mexicanos, A. C. (PORCIMEX, 2014) reporta volúmenes totales de importación para el año 2011 de 416,598 toneladas y para el año 2012 y 2013 de 516,217 y 573,642 toneladas respectivamente,

provenientes en su mayoría de Estados Unidos y Canadá, mientras que las exportaciones han ido incrementando durante los últimos años, para el año 2011 se reportan 64,000 toneladas, para el año 2012 un total de 71,000 toneladas y para el año 2013 se tiene reporte de 84,000 toneladas, la mayoría de las exportaciones se destinan a Japón y Corea del Sur.

Las importaciones de carne de pollo fresca, refrigerada y congelada han ido aumentando en los últimos años debido a la demanda que existe. México es el principal país importador de carne de pollo en América, actualmente importa unas 630,000 toneladas al año, de las cuales alrededor del 90% proviene de los Estados Unidos, y solo Chile es el otro proveedor importante. Un pronóstico a largo plazo sugiere que las importaciones de México, tanto de pollos como de pavos, podrían superar 1 millón de toneladas para el 2021. No se cuenta con datos de exportación de este producto (UNA, 2013).

2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, toxinas, venenos naturales o sustancias químicas dañinas, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Elley, 1994).

Las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control (Gurtler *et al.*, 2005). Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas

inmunodeprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA (Álvarez, 2007).

Existen numerosos tipos de ETA que presentan sintomatologías variables, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y en casos extremos, la muerte. Las causas más comunes son intoxicaciones e infecciones (FDA, 2001; FAO/OMS, 2005).

En la Figura 4, se muestran algunas de las posibles causas que contribuyen a la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos.



Figura 4. Posibles causas de enfermedades transmitidas por alimentos (Cervantes *et al.*, 2008).

Según la FAO/WHO (2009a), dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, las de mayor incidencia son las causadas por microorganismos. Siendo los principales agentes causales *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Escherichia coli*, las dos

últimas se reportan principalmente en productos lácteos y cárnicos. En el Cuadro 1 se muestran las características de las principales enfermedades alimentarias.

Cuadro 1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Bacteria	Síntomas	Principales alimentos	Incubación
<i>Salmonella</i>	Dolor abdominal, diarrea, escalofríos, vómito frecuente y debilidad.	Lácteos, pollo, carne, pescado, huevo.	6 a 72 h
<i>E. coli</i>	Dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, vómito	Carne molida, agua contaminada, leche y alimentos preparados.	12 a 72 h
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea abundante y acuosa, vómito, deshidratación rápida que puede causar la muerte.	Agua contaminada, alimentos en contacto con agua contaminada, manos sucias y moscas.	24 a 28 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Náusea, vómito, dolor de cabeza, meningitis y abortos.	Lácteos, vegetales crudos, carne de res y cerdo mal cocida.	1 a 20 d

Gutiérrez, 2008.

Adicionalmente, se han presentado brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella enteritidis* en huevo, *Salmonella typhimurium* en alimentos de origen animal (Poppe, 1998), *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC) en carnes y vegetales (Masana, 2010), *Listeria monocytogenes* en carne y quesos (Copes *et al.*, 2000), *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolítica* en carne de cerdos y aves (López, 2000), *Shigella dysenteriae* en agua (Faruque *et al.*, 2003) y *Cronobacter sakazakii* en productos lácteos deshidratados (Gurtler *et al.*, 2005). Entre los reemergentes se encuentra *Vibrio*

cholerae O1, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos de origen marino (González *et al.*, 2009).

Las ETA no solo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino que también imponen una carga sustancial en los sistemas de salud y reducen notablemente la productividad económica del país. Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, estima que 76 millones de personas por año sufren ETA en ese país, 325,000 personas son hospitalizadas y 5,000 mueren. Por lo tanto, las ETA tienen un importante impacto económico, y expertos en salud estiman que sólo en Estados Unidos el costo anual de todas las ETA es de 5 a 6 billones de dólares (CDC, 2007).

2.3. Situación de enfermedades transmitidas por alimentos en México

Las enfermedades transmitidas por alimentos son una de las principales causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública en el nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (León-Ramírez, 2002).

En nuestro país, no se tienen registros concretos de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos y del agente causal, debido a que en la mayoría de los casos (diarreas, náuseas, entre otros), no son atendidos en clínicas u hospitales, y son controlados en el hogar (Hernández *et al.*, 2011). Los agentes patógenos involucrados son virus, parásitos y bacterias. La búsqueda e identificación de éstos, en los laboratorios clínicos, se centra principalmente en patógenos clásicos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*,

Vibrio, *Campylobacter* y *Yersinia*. Existen otros géneros involucrados en estas enfermedades, como *Aeromonas*, que en otros países se ha documentado como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales y marcador de contaminación fecal en el agua (Vidal *et al.*, 2007).

Las bacterias del género *Salmonella* causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los 2,500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* (Gutiérrez *et al.*, 2000).

En México, el organismo encargado de llevar a cabo los registros por brotes de estas enfermedades es el CENA VECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades); según reportes de este centro, en el 2012 (semana epidemiológica 52), se presentaron 127,756 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 53,737 casos de fiebre tifoidea así como 5,279,236 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos. Para el 2013 (semana epidemiológica 20), se presentaron 30,387 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 18,701 casos de fiebre tifoidea, así como 2,014,580 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos (CENA VECE, 2013).

2.4. Características del género *Salmonella*

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades (Smith y Ahmer, 2003). Todas las salmonelas son potencialmente patógenas (Mahajan *et al.*, 2003) al ser parásitos intracelulares y por medio

de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado, aprovechando la vía linfática y sanguínea (Stanchi, 2007).

En medicina humana están descritas diversas presentaciones de la salmonelosis: fiebre entérica, septicemia y finalmente gastroenteritis; mientras tanto, en medicina veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia, enteritis aguda, subaguda y crónica, además de abortos en diferentes animales (Stanchi, 2007). Las diversas especies de esta bacteria se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque por lo general la enfermedad producida por este agente microbiano tiene un origen alimentario debido a la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno, teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (Stanchi, 2007).

Morfológicamente, los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, de 0.7-1.5 x 2.0-5.0 mm, generalmente no fermentan lactosa, anaerobios facultativos, no esporulado, generalmente móviles por flagelos peritricos (Jawetz *et al.*, 2005). Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, rojo de metilo y citrato positivo, producen H₂S, son urea negativo y descarboxilasa positivo (Terrango *et al.*, 2003). Otras características bioquímicas son la reducción de los nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetrionato reductasa (Jawetz *et al.*, 2005).

El género *Salmonella*, definido por su conjunto de características bioquímicas, reúne cerca de 2,500 tipos serológicos; cada tipo serológico a su vez está caracterizado por antígenos específicos que pueden ser identificados mediante pruebas serológicas. Los antígenos que

caracterizan los tipos serológicos de las salmonellas son los antígenos O (somáticos), y los antígenos H (flagelares); algunos presentan un tercer tipo el denominado antígeno Vi.

Existen tres tipos de *Salmonella*, la *Salmonella choleraesuis*, la *Salmonella typhi* y la *Salmonella enteritidis*. Las dos primeras corresponden a un sólo serotipo; la *S. enteritidis* engloba los demás serotipos. Se reúnen estos microorganismos en seis grupos: el grupo A que incluye la *Salmonella paratyphi* A; el grupo B que incluye la *Salmonella typhimurium* y la *Salmonella bredeney*; el grupo C1 con la *Salmonella choleraesuis*, la *Salmonella montevideo* y la *Salmonella oranienburg*; el grupo C2 tiene sólo la *Salmonella neuport*; al grupo D pertenecen la *Salmonella typhi*, la *Salmonella enteritidis*, la *Salmonella dublin* y la *Salmonella gallinarum*, finalmente en el grupo E1 se encuentran la *Salmonella butantan*, la *Salmonella anatum* y la *Salmonella give* (White *et al.*, 2008).

2.5. Contaminación de productos cárnicos por *Salmonella*

La existencia de *Salmonella* en poblaciones animales se debe a la contaminación de los alimentos por animales de la misma población que son portadores de éstos microorganismos o están infectados. Un portador se define como un animal o persona que elimina dicha enfermedad, sin presentar síntoma de la infección (Ukuku y Fett, 2006).

Las aves son afectadas especialmente por esta enfermedad, aunque también el cerdo y el ganado vacuno están sujetos a infecciones de esta clase. Por otra parte, puede haber salmonelas en huevos enteros, así con en el contenido intestinal de mucho animales de sangre caliente.

Existen casos, en que estos microorganismos están presentes en la carne de los animales, pero esto es indudablemente raro. Cuando se encuentran en carne de pollo lo más probable

es que las superficies cárnicas se hayan contaminado, directa o indirectamente con el contenido intestinal (Stocki *et al.*, 2007).

Se ha investigado la presencia de *Salmonella* en granjas de porcinos y bovinos, así como en rastros y se comprobó que en corrales de animales infectados, cuando llegaban a la sala de matanza, una parte significativa de estos (12 al 18%), se encontraban infectados. Se sabe que una pequeña proporción de porcinos y bovinos se infectan con *Salmonella* antes de su comercialización y que algunas aves tienen ocasionalmente esta enfermedad, por lo que el problema pudiera tener su origen en la granja (Steenackers *et al.*, 2012). La contaminación de los animales con *Salmonella* en el rastro, proviene desde el suministro de alimentos en la granja y las prácticas de transporte y aquellas previas al sacrificio de los animales.

Aspectos como la preparación de los animales para el sacrificio, el método de insensibilización, las técnicas de sacrificio, sangrado, eviscerado y manejo de la canal están directamente relacionadas con la inocuidad de la carne, por lo cual debe prestarse especial importancia a los programas de limpieza y desinfección de las instalaciones propias de un rastro, para minimizar los riesgos que afectan la calidad y la contaminación de la carne (FAO, 2007). Además, esto se complementa con estudios de contaminación de la carne y de la canal, incluyendo los parámetros de inocuidad y los métodos para su determinación en la línea de sacrificio, así como los temas importantes en la actualidad, como la implantación del sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, por sus siglas en inglés) en rastros y la trazabilidad de la carne (Miranda *et al.*, 2010).

Las carnes frescas se pueden contaminar con *Salmonella* a través de los operarios de los rastros o como consecuencia de proceder de animales enfermos; esta situación se vuelve más frecuente cuando la carne de cerdo, res, pollo y sus derivados pierden la cadena de frío

y se mantienen a temperatura ambiente en el proceso de comercialización, permitiendo así la multiplicación bacteriana (FAO/WHO, 2009b).

La carne de ave así como sus salsas y aderezos no deberían dar lugar a ningún problema si se manipulan y cocinan adecuadamente, pero con frecuencia se descuida este tratamiento, como acontece también con el pescado, los mariscos y ciertos productos lácteos como la leche fresca o fermentada, helados y quesos (M'ikanatha *et al.*, 2010). La manipulación de los alimentos en gran escala como se realiza en muchos establecimientos, tiende a incrementar las posibilidades de diseminación como ocurre con las máquinas expendedoras de alimentos y con los productos precocinados (Rodríguez *et al.*, 2011).

De acuerdo a un reporte de la EFSA-ECDC (2011), en la Unión Europea, la salmonelosis fue la infección zoonótica de segundo orden en 2009, con 108,614 casos confirmados en humanos y una tasa de mortalidad de 0.08%, la cual correspondió a 90 personas fallecidas. Ese año, *Salmonella* fue el patógeno más común en carne fresca de pollo, pavo y cerdo, dando en proporción un total de muestras positivas de 5.4, 8.7 y 0.7%, respectivamente. Los dos serotipos más comunes de *Salmonella*, implicados en la mayoría de los casos fueron *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (52.3 y 23.3%, respectivamente).

En Estados Unidos, *Salmonella* provoca 1 millón de casos de enfermedades causadas por alimentos anualmente, 19,336 hospitalizaciones y 378 muertes cada año (Scallan *et al.*, 2011). En 2012, cerca del 40% de las infecciones bacterianas y parasitarias confirmadas por laboratorio en las zonas de vigilancia de FoodNet fueron debidas a *Salmonella* (CDC, 2013). Esta bacteria también representaron el 30% de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos durante 2009-2010 (CDC, 2013).

Una amplia variedad de productos alimenticios han sido implicados en brotes de *Salmonella*, como la carne de res, aves, huevos, productos lácteos, la mantequilla de maní y

productos frescos; asimismo, en un estudio realizado en Florida se ha comprobado que el 7.5% de los embutidos frescos de cerdos fabricados en industrias de hábito nacional y el 57.4% de los elaborados por industrias locales, contenían salmonellas aunque se sabe que es posible encontrar salmonellas en la carne de vaca, la frecuencia de contaminación de este producto no es tan grande como en otros alimentos (CDC, 2013; Painter *et al.*, 2013).

En México existen muchas variantes en las condiciones sanitarias de los tipos de carne que se comercializan; estas condiciones son dependientes del desarrollo económico de la industria en las diversas regiones geográficas del país. La nula condición de higiene en el manejo de la carne que se vende en los mercados sobre ruedas en México, constituye un riesgo a la población consumidora (Rubio *et al.*, 2013).

Las consecuencias en salud pública por contaminación con *Salmonella* en carne para consumo humano, es motivo central de varios estudios, lo que obligó a abordar algunos factores clave en el origen y reproducción de *Salmonella* en el proceso de distribución de la carne para consumo humano (Gutiérrez *et al.*, 2000; Estrada *et al.*, 2004; Gallegos *et al.*, 2009).

El riesgo para la salud de los consumidores que adquieren productos cárnicos está latente en México; así lo demostraron los resultados de una investigación realizada por Rubio *et al.* (2013), quienes al analizar muestras de carne de bovino, procedentes del extranjero y mexicanas, encontraron 27.78% de muestras positivas a *L. monocytogenes*, 8.89% a *Salmonella* y 28.89% a *Y. enterocolitica*. Las muestras mexicanas presentaron mayor índice de contaminación con estas bacterias que las muestras de carne importada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de muestras de res (bistec) positivas a patógenos por región en México

Microorganismo	Monterrey, NL (n=30)		Ciudad de México (n=40)		Tabasco (n=20)		% global positivos
	Imp.	Mex.	Imp.	Mex.	Imp.	Mex.	
<i>L. monocytogenes</i>	0.0	26.7 (8)	17.5 (7)	10.0 (4)	5.0 (1)	25.0 (5)	27.7 (25)
<i>Salmonella</i>	0.0	3.3 (1)	0.0	2.5 (1)	0.0	30.0 (6)	8.8 (8)
<i>Yersinia</i>	0.0	6.7 (2)	12.5 (5)	27.5 (11)	30.0 (6)	10.0 (2)	28.8 (26)

Imp.: importado, Mex.: Mexicano, ()= número de muestras (Rubio *et al.*, 2013).

2.6. Detección de *Salmonella* en alimentos

La vigilancia de *Salmonella* en la cadena productiva y el procesamiento de alimentos constituyen un elemento importante en la investigación de la epidemiología de este patógeno. El mercado nacional e internacional, para proteger la salud de sus consumidores, exige que todos los alimentos estén libres de Enteropatógenos, y *Salmonella* (Gálvez, 2006).

Se han hecho grandes esfuerzos en materia de prevención para el control de las enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y de las entidades encargadas del control. Muchos países, tienen establecido dentro de su legislación “cero tolerancia” para *Salmonella* (Schneider *et al.*, 2007) y los métodos para su detección son variados.

2.6.1. Detección de *Salmonella* en alimentos por método microbiológico

Los análisis microbiológicos convencionales son laboriosos debido al tiempo que se requiere para obtener resultados, ya que dependen de pruebas estándar para aislar y confirmar diversos patógenos en la carne (Rubio *et al.*, 2013).

Debido a su alto grado de infección, los métodos sensibles son deseables para la detección de *Salmonella*; para aumentar la especificidad y la sensibilidad, se ha usado el agar semisólido modificado de Rappaport Vassiliadis (MSRV) como una etapa de enriquecimiento, y varios estudios han demostrado que MSRV es más sensible que el método estándar caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) para la detección de *Salmonella* a partir de heces, alimentos y piensos (Eriksson y Aspan, 2007). Este método se incorporó en el anexo D del método ISO 6579 para la detección de *Salmonella*, y es una modificación de la norma ISO 6579:2002 para la detección de este Enteropatógeno en heces de animales y en muestras de alimentos (EFSA, 2006).

El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) para *Salmonella* recomienda el uso de MSRV y también fue recomendado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en un estudio de referencia realizado entre el año 2006 y 2007 sobre la prevalencia de *Salmonella* en cerdos de engorda (EFSA, 2008).

En México, las técnicas microbiológicas para la determinación de *Salmonella* que actualmente se usan en los laboratorios autorizados o acreditados, tardan de 5 a 10 días para conocer la presencia o ausencia de este microorganismo en los alimentos analizados (Estrada *et al.*, 2004). Estas técnicas, basadas en el uso de medios de cultivos, consisten principalmente en el pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y la identificación serológica (Figura 5), con la que se concluye la identificación específica del patógeno (NOM-114-SSA1-1994). Las etapas que implican la identificación y confirmación de *Salmonella* resultan en una desventaja cuando los resultados se necesitan rápidamente para la toma de decisiones.

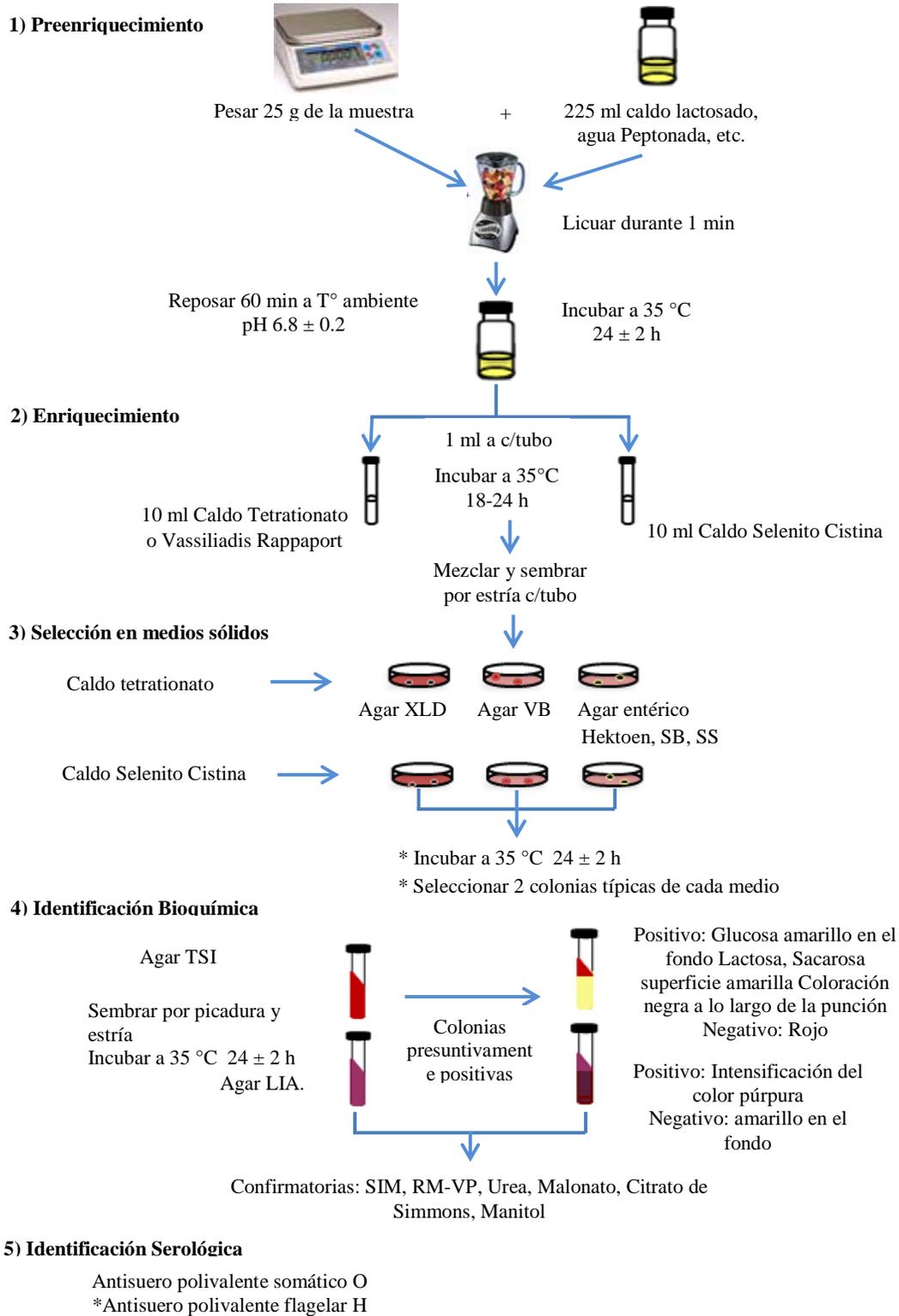


Figura 5. Procedimiento para la determinación de *Salmonella* según la norma NOM-114-SSA1-1994.

En este sentido, los métodos tradicionales resultan tardados y laboriosos para detectar e identificar cepas de *Salmonella* a través de procesos sucesivos que involucran caldos de enriquecimiento, cultivos en medios selectivos y por último el análisis de las propiedades metabólicas o serológicas de las colonias sospechosas, por esta razón esta técnica consume mucho tiempo y trabajo para el bacteriólogo.

Adicionalmente, como este procedimiento toma demasiado tiempo, algunos alimentos con una vida media corta pueden ser consumidos antes de que el resultado del análisis esté disponible (Fratamico, 2003). Además, las células bacterianas como *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Listeria monocytogenes* frecuentemente se encuentran bajo estrés y desnaturalizadas por las condiciones desfavorables a las que se exponen (altas concentraciones de sal, pH desfavorables, o repetidos procesos de congelación y descongelación), implicando un resultado falso negativo en los medios de cultivo (Candrian, 1995).

2.6.2. Detección de *Salmonella* en alimentos por PCR

Las condiciones actuales de mercados globalizados y la demanda de alimentos hacen necesario implementar técnicas rápidas y muy sensibles en el control de Enteropatógenos en los productos para consumo humano, antes de su liberación al mercado. La implementación de los métodos moleculares es necesaria, ya que las técnicas microbiológicas convencionales toman demasiado tiempo para la detección y la identificación de *Salmonella* (Schneider *et al.*, 2007).

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos para la detección de Enteropatógenos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por

estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos; tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica molecular basada en la amplificación in vitro del DNA (Rodríguez y Barrera, 2004).

Los métodos moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han demostrado alta sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos, incluyendo *Salmonella* en diferentes tipos de alimentos, y el tiempo requerido para obtener resultados pueden ser tan cortos como de 12 horas (Salehi *et al.*, 2005).

Los métodos moleculares permiten la detección y cuantificación de DNA específico de la bacteria blanco a partir de un número muy reducido de moléculas en la muestra, y además de permitir detectar al patógeno, también se pueden detectar genes que codifican para otras proteínas involucradas en la patogenicidad como adhesinas, endotoxinas, exotoxinas que revisten importancia en la práctica microbiológica (Malorny, 2004). Por esto, en los últimos años se estimuló la utilización de técnicas moleculares tanto en las etapas de tamizaje como en las etapas de confirmación e identificación del diagnóstico bacteriológico.

Si bien, las técnicas basadas en PCR son una poderosa herramienta para la detección de patógenos a partir de alimentos, pueden generar diferentes resultados entre laboratorios debido a la falta de validación de protocolos estandarizados, a la variabilidad de equipos y reactivos, y a la posible interferencia de la matriz con la reacción de PCR.

Para reconocer estos posibles inconvenientes se utilizan controles de sistema, controles externos y controles internos. Como control de sistema se usa la misma mezcla de reacción de PCR sin DNA templado. Los controles externos positivos y negativos son templados conocidos, que se analizan en tubos independientes del DNA problema.

2.7. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico implica la confirmación de los resultados obtenidos por una técnica en particular, mediante la provisión de evidencias objetivas, donde se cumplen requisitos particulares para un uso pretendido y específico, y según la rigurosidad de las diferentes etapas de validación, es posible clasificar a los métodos analíticos en: I) métodos del propio laboratorio, II) métodos de revistas científicas, III) métodos oficiales y IV) métodos estándar (Trullols *et al.*, 2004).

Se define como método cualitativo, a aquel cuya respuesta se basa en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra (Feldsine *et al.*, 2002). Según Trullols *et al.* (2004), para validar un método cualitativo se deben incluir los siguientes parámetros: a) Rango de trabajo: intervalo de concentración en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión. Bajo el concepto de rango de trabajo se incluyen los términos límite de detección y límite de corte; límite de detección es la menor concentración de analito detectable, y límite de corte es la cantidad óptima de analito detectable. b) Selectividad: parámetro que permite ponderar la detección de la mayor cantidad de microorganismos especificados por parte de la técnica evaluada y la ausencia de reacción positiva con otros géneros y especies relacionados. La selección de un mínimo de 50 cepas puras de microorganismos relacionados y la selección de un mínimo de 30 cepas potencialmente competitivas deben ser analizadas como cultivos puros. Bajo el concepto de selectividad se incluyen los términos exclusividad e inclusividad (Feldsine *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 2006).

Exclusividad es la habilidad del método de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas. Inclusividad es la habilidad del método alternativo de detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos

blanco (Feldsine *et al.*, 2002). c) Robustez: resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas a los parámetros del mismo. Deben especificarse las condiciones diferentes para poder identificar cuáles son los factores de la técnica que pueden afectar la robustez. Deben determinarse como mínimo 10 resultados y todos los pasos del método, incluidas la toma y preparación de la muestra, deben realizarse n veces (OAA, 2003).

III. OBJETIVOS

3.1. General

Implementar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico rápido y sensible de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de cerdo, res y pollo.

3.2. Específicos

- Estandarizar y validar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella typhimurium* en productos cárnicos optimizando el tiempo y la sensibilidad con relación al método microbiológico.
- Realizar monitoreo de productos cárnicos para evaluar su calidad microbiológica en productos distribuidos en la ciudad de Texcoco.

IV. HIPÓTESIS

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa permite analizar muestras de productos cárnicos sospechosos de contaminación de manera más rápida y eficiente disminuyendo los falsos negativos y falsos positivos en comparación con las técnicas microbiológicas convencionales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

Los análisis se realizaron en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillos en el Laboratorio de “Microbiología Ruminal y Genética Microbiana”, perteneciente al Postgrado de Ganadería, ubicado en la Carretera México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo, Texcoco.

5.2. Muestreo

El muestreo se realizó en la ciudad de Texcoco, para ello se delimitó la ciudad de Texcoco, posteriormente se realizó un censo de las carnicerías, tianguis y supermercados de la zona que comercializaban carne de cerdo, res y pollo.

El tamaño de muestra se calculó usando un Muestreo Aleatorio Simple Cualitativo (MASC) (Rendón, 2001). Una vez definido el tamaño de muestra se procedió a la selección de esta, con base a la relación de los establecimientos de carnicerías, tianguis y supermercados recabados en el censo, de manera aleatoria mediante la “tabla de números aleatorios”.

De los locales que se seleccionaron se tomó una muestra de 250 gramos de carne (cerdo, res y pollo), las cuales se identificaron con los siguientes datos: número de muestra, fecha de colecta y especie animal. Las muestras se trasladaron al laboratorio para su análisis bajo condiciones asépticas a temperatura de refrigeración de acuerdo a lo indicado en la NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

5.3. Cepas de control

Como control de calidad, se utilizaron cepas puras de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 6898 y *Escherichia coli* ATCC 25922, las cuales fueron adquiridas en el Laboratorio de Bacteriología Medica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Para su preservación cada cepa fue sembrada en Caldo Soya Trypticaseina con 15% de glicerol (CST), e incubada a 35°C durante 24 horas. Posteriormente de cada frasco que presentó crecimiento se tomó 1 mL de cultivo y se colocó en viales Eppendorf de 2 mL, previamente esterilizados, elaborando 5 viales de cada cepa. Finalmente cada vial fue identificado con el nombre de la cepa, su ATCC y fecha de preparación, y colocados a -20 °C, para preservar las cepas.

Para la obtención de las cepas de trabajo o de control de calidad, se tomó uno de los viales preservado a -20 °C, bajo condiciones asépticas el contenido se depositó en tubos de ensayo que contenía 20 mL de CST, los cuales se incubaron a 35°C por 24 horas, posteriormente se realizó la siembra por estría en placa en medio solido (Agar Soya Trypticaseina) para *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli*. Las cajas de petri fueron identificadas con el nombre del microorganismo estriado y la fecha de siembra, y se colocaron en refrigeración a -4°C.

5.4. Inoculación artificial

Las muestras de carne escogidas para la inoculación artificial se confirmaron negativas para *Salmonella typhimurium* por análisis microbiológico y por PCR. Se procedió a la inoculación de la carne con un inóculo de 10^6 UFC mL⁻¹ a partir de un cultivo en CST incubado por 12-18 horas a 37°C de cada bacteria (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia*

coli y *Proteus vulgaris*). La concentración en UFC mL⁻¹ del inóculo se determinó por ensayo y error hasta estandarizar la lectura.

5.5. Detección de *Salmonella* mediante método microbiológico

La detección de *Salmonella* se realizó conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Para ello se pesaron bajo condiciones asépticas 25 g de cada muestra colectada en los establecimientos, y se depositaron en frasco de dilución que contenían 225 mL de caldo selenito-cistina, posteriormente se incubaron a 35°C durante 24 h; transcurrido este tiempo se tomó 1 mL del líquido homogeneizado y se depositó en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm, que contenía 9 mL de caldo tetratiónato. Otra muestra de 1 mL fue tomada del contenido del frasco de dilución y se depositó en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm, que contenía 9 mL de caldo selenito-cistina; los dos tubos se incubaron a 35± 1 °C por 24 horas. Posteriormente, de los dos tubos antes mencionados se sembró por estría de forma independiente en agar Xilosa- lisina desoxicolato (XLD), Agar verde brillante (AVB) y Agar sulfito de bismuto (SB) para la detección de *Salmonella*, los cuales fueron incubados a 35 ± 1 °C durante 24 horas.

Después de la incubación las colonias sospechosas fueron sometidas a pruebas bioquímicas en los agares lisina-hierro (LIA) y triple azúcar-hierro (TSI); complementario a esto se realizaron las pruebas bioquímicas que establece el protocolo del kit API® 20E, para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*.

5.6. Detección de *Salmonella typhimurium* mediante PCR

Para la detección de *Salmonella typhimurium* en las muestras colectadas se procedió a la extracción del DNA a partir del cual se corrieron muestras para la amplificación del gen InvA y fliC.

5.6.1. Extracción de DNA de muestras de carne

La extracción de DNA de las muestras de carne de bovino, cerdo y pollo, se realizó con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (catalogo A1620, Promega, EUA). Posteriormente se cuantificó y evaluó la calidad del material genético mediante electroforesis con un gel de calidad (agarosa al 2%) teñido con bromuro de etidio. Las muestras de DNA se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Se cuantificó la concentración de DNA en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

5.6.2. Iniciadores

Se utilizaron iniciadores para la amplificación del gen InvA de *Salmonella*, descritos por Rahn *et al.* (1992) y del gen fliC para *Salmonella typhimurium* reportado por Lim *et al.* (2003), los cuales se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Iniciadores para los genes InvA y fliC

Iniciadores	Secuencia	Gen	pb
S139-F	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	InvA	284
S141-R	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		
Fli15-F	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	fliC	559
Tym-R	ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACT T		

Lim *et al.*, 2003; Rahn *et al.*, 1992.

5.6.3. Controles

Como control positivo se utilizó DNA de la cepa *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y como control negativo DNA de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922; cada una de las cepas se colocó en 5 mL de Caldo Soya Tripticaseína, se incubó a 37 °C durante 18 h.

La extracción del DNA se realizó con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (catalogo A1620, Promega, EUA). Adicionalmente se utilizó como blanco un tubo sin DNA como control de sistema.

5.6.4. Condiciones de PCR

El programa de amplificación consistió en: un ciclo a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación-extensión a 60 °C y un ciclo final de extensión de 1 min a 72 °C. Finalmente se realizó una rampa de disociación desde 55 °C a 95 °C, 30 seg.

El tiempo de análisis total fue de 2 h, 25 min 42 seg. El programa fue implementado en un Termociclador Modelo CG1-96 (Corbertt Research).

5.6.5. Mezcla de reacción de PCR

Para las reacciones de amplificación se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 2 µL de buffer 10X, 0.4 µL de MgCl₂ 1.0 mM, 0.8 µL de dNTP's a una concentración de 0.1 mM, 2.5 µL de primer InvA (Forward+ Reverse); Cuadro 3 a una concentración de 0.125 µM, 2.5 µL de primer fliC (Forward+ Reverse) a una concentración de 0.125 µM, 0.12 µL de BIOLASE™ DNA polimerasa (BIO-21042), 10.68 µL de agua grado Biología molecular. Las reacciones fueron preparadas en tubos Eppendorf libres de nucleasas.

5.6.6. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0%. Se utilizó TBE 1X como buffer de corrida, el gel se corrió a 90 V durante 40 min aproximadamente, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para su observación en el Transiluminador A323 (Bio-Imaging).

5.6.7. Concentración de detección mínima de DNA

Para determinar la concentración mínima de DNA detectable con pruebas de PCR, se inocularon muestras de carne con diluciones seriadas de *Salmonella typhimurium*, a partir de 10^{-1} hasta 10^{-12} UFC. La concentración de DNA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se determinó por la lectura en un nanodrop y la concentración de bacterias (UFC mL^{-1}) por conteo en placa.

5.6.8. Especificidad y sensibilidad relativa

Para determinar la especificidad, los iniciadores para la amplificación del gen *InvA* para *Salmonella* y el gen *fliC* para *Salmonella typhimurium* fueron evaluados en pruebas preliminares con DNA proveniente de *Escherichia coli*, con el fin de descartar amplificaciones inespecíficas mediante PCR. Para determinar la sensibilidad del método las muestras inoculadas artificialmente con *Salmonella typhimurium* fueron analizadas mediante el método microbiológico y la técnica de PCR.

5.7. Análisis Estadístico

5.7.1. Calculo de especificidad y sensibilidad relativa

El cálculo de especificidad (E) y sensibilidad (S) se realizó utilizando la tabla 2x2, que compara los resultados de la prueba en las muestras inoculadas y muestras no inoculadas. En el Cuadro 4 se detalla el procedimiento seguido para el cálculo.

Cuadro 4. Tabla 2x2 para comparar los resultados de la PCR en muestras inoculadas y no inoculadas.

		Muestras probadas		
		Inoculada	No inoculada	Total
Resultado de PCR	Positiva	a	b	a+b
	Negativa	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	n

López y Fernández, 2001.

En donde:

$$E = \frac{d}{(b + d)}$$

$$S = \frac{a}{(a + c)}$$

5.7.2. Índice de McNemar

La prueba de McNemar se utiliza para decidir si puede o no aceptarse que determinado "tratamiento" induce un cambio en la respuesta de los elementos sometidos al mismo, y es aplicable a los diseños del tipo "antes-después" en los que cada elemento actúa como su propio control. Consiste en "n" observaciones de una variable bidimensional (X_i, Y_i) para $i=1, \dots, n$. La escala de medición para X e Y es nominal con dos categorías tales como positivo-negativo o presencia-ausencia, que se puede denominar "0" y "1". Los resultados correspondientes a una muestra de "n" elementos se disponen en una tabla de frecuencias 2 x 2 como se muestra en el siguiente Cuadro 5.

Cuadro 5. Tabla cruzada de los resultados de dos variables dicotómicas con el mismo resultado (método 1 y método 2).

		Método 2		
		(+)	(-)	Total
Método 1	(+)	a	b	r=a+b
	(-)	c	d	s=c+d
Total		t=a+c	u=b+d	n

Caravaca *et al.*, 2000.

En las celdas del Cuadro 5, “a” es el número de elementos cuya respuesta es la misma, +; “b” es el número de elementos cuya respuesta es + antes del "tratamiento" y - después de éste; “c” es el número de elementos que han cambiado de - a +; y “d” es el número de elementos que mantienen la respuesta -.

Por lo tanto, b+c es el número total de elementos cuyas respuestas han cambiado, y son los únicos que intervienen en el contraste. La hipótesis nula es que el "tratamiento" no induce cambios significativos en las respuestas, es decir, los cambios observados en la muestra se deben al azar, y la hipótesis alternativa significa que el “tratamiento” si induce cambios significativos en las respuestas, es decir, los cambios observados no se deben al azar.

El estadístico de prueba que permite contrastar si existen diferencias significativas entre las frecuencias esperadas y las observadas es:

$$T_1 = \frac{(|b - c| - 1)^2}{b + c} \approx X_{(1)}^2$$

En este caso se rechaza la hipótesis nula si $X_{(1)}^2$ es mayor que $X_{1-\alpha/2(1 g.l.)}^2$ (Caravaca *et al.*, 2000).

5.7.3. Índice de Kappa

El índice Kappa relaciona el acuerdo que exhiben los métodos de observación, más allá del debido al azar, con el acuerdo potencial también más allá del azar y se usa para evaluar la concordancia o reproducibilidad de instrumentos o metodologías cuyo resultado es categórico. Por lo tanto el índice Kappa se define como

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde P_o es la proporción de acuerdos observados y P_e es la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores, es decir, de acuerdos por azar. A partir del Cuadro 5, $P_o = (a + d)/n$ y $P_e = (rt + su)/n^2$.

Por tanto, el índice Kappa presenta un valor de 1 cuando la concordancia observada es perfecta, un valor de 0 cuando la concordancia observada es igual a la concordancia esperada por azar y valores inferiores a 0 cuando la concordancia observada es inferior a la concordancia esperada por azar (López y Fernández, 2001).

Landis y Koch (1977) propusieron una escala de interpretación del valor de Kappa que considera como aceptable un valor mayor o igual a 0.40 y excelentes los valores superiores a 0.75 (Armendáriz y Barreiro, 2013). En el Cuadro 6 se muestra la escala de interpretación del valor Kappa.

Cuadro 6. Escala de interpretación del valor Kappa

Valor de Kappa (k)	Grado de acuerdo
< 0.00	Sin acuerdo
0.00-0.20	Insignificante
0.21-0.40	Mediano
0.42-0.60	Moderado
0.61-0.80	Sustancial
0.81-1.00	Casi perfecto

Armendáriz y Barreiro, 2013.

5.7.4. Incidencia de *Salmonella typhimurium*

Se realizó mediante el programa FREQ (SAS 9.2, 2008) $\alpha = 0.05$. Con lo cual se obtuvo la frecuencia y el porcentaje de muestras contaminadas por *Salmonella typhimurium* en relación al tipo de carne analizada (cerdo, res y pollo) y a la procedencia de las muestras (carnicerías, tianguis y supermercados).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación de la técnica de PCR

6.1.1. Concentración mínima de detección de DNA

En todas las diluciones que se realizaron para la determinación de la concentración mínima detectable de DNA por la técnica de PCR se generaron resultados de amplificación positivos tanto para el gen *InvA* (284 pb) de *Salmonella* y el *fliC* (559 pb) de *Salmonella typhimurium*, como se puede ver en las Figuras 6 (a) y (b).

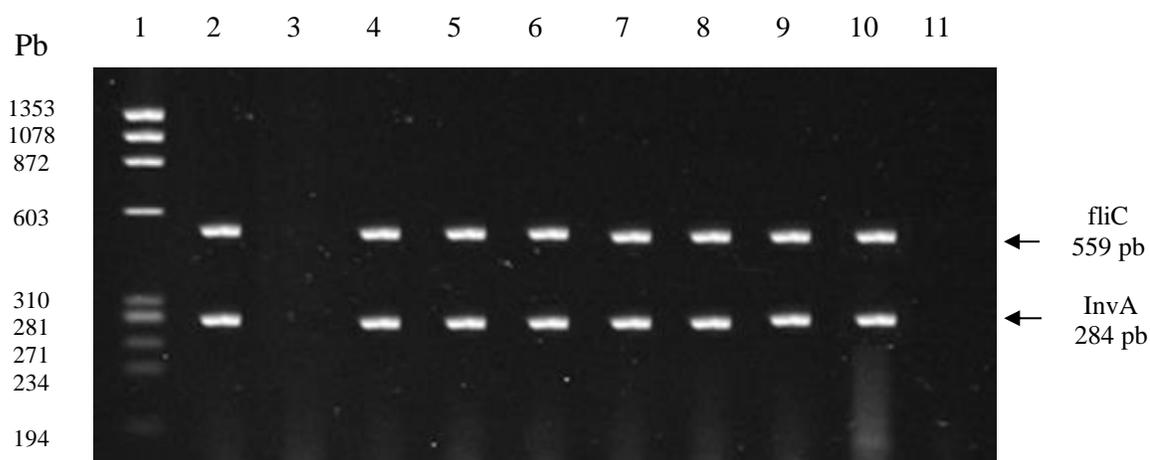


Figura 6(a). Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para los genes *InvA* para *Salmonella* y *fliC* para *Salmonella typhimurium*, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%. Pozos: 1) Marcador ϕ X174; 2) Control positivo; 3) Control negativo; 4) Dilución 10⁻¹; 5) Dilución 10⁻²; 6) Dilución 10⁻³; 7) Dilución 10⁻⁴; 8) Dilución 10⁻⁵; 9) Dilución 10⁻⁶; 10) Dilución 10⁻⁷; 11) Blanco.

Se puede observar que a partir de la dilución 10⁻⁹ hasta la dilución 10⁻¹² se presenta una reducción en el tamaño de las bandas de amplificación tanto para las de *Salmonella* como para las de *Salmonella typhimurium* (Figura 6b).

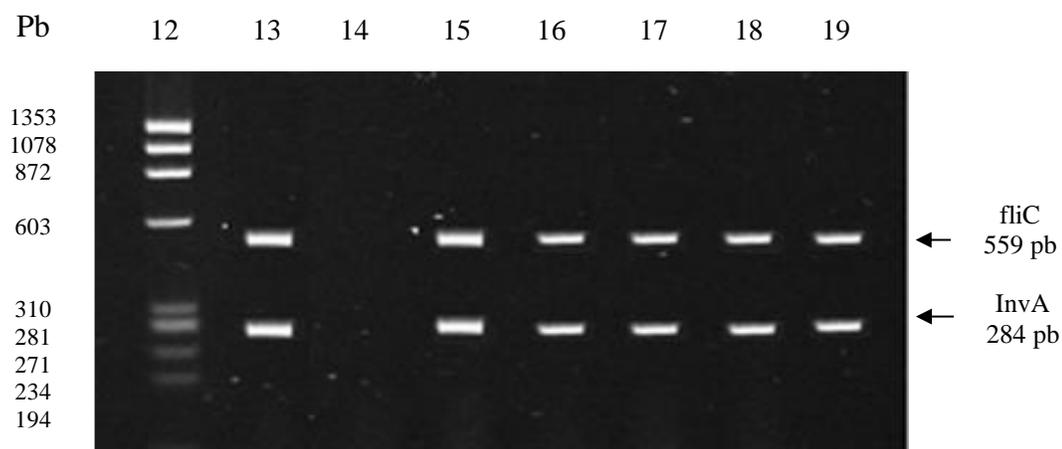


Figura 6(b). Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para los genes *InvA* para *Salmonella* y *fliC* para *Salmonella typhimurium*, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%. Pozos: 12) Marcador ϕ X174; 13) Control positivo; 14) Control negativo; 15) Dilución 10^{-8} ; 16) Dilución 10^{-9} ; 17) Dilución 10^{-10} ; 18) Dilución 10^{-11} ; 19) Dilución 10^{-12} .

Se realizó una dilución 1:10 de la concentración inicial de las diluciones para determinar la concentración mínima detectable, las concentraciones finales con las que se corrió el gel de agarosa se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Lecturas de la concentración del DNA en las diluciones

Dilución	Concentración de DNA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración final de DNA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Dilución 10^{-1}	147.6	14.76
Dilución 10^{-2}	123.7	12.37
Dilución 10^{-3}	111.0	11.10
Dilución 10^{-4}	99.80	9.980
Dilución 10^{-5}	93.80	9.380
Dilución 10^{-6}	90.40	9.040
Dilución 10^{-7}	86.00	8.600
Dilución 10^{-8}	70.50	7.050
Dilución 10^{-9}	51.50	5.150
Dilución 10^{-10}	34.40	3.440
Dilución 10^{-11}	12.40	1.240
Dilución 10^{-12}	3.100	0.310

La concentración mínima detectable de DNA en la técnica de PCR para este estudio fue de $0.310 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ó $0.310 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. De manera similar en un estudio realizado por Rubio *et al.* (2013) el nivel mínimo detectable de DNA fue de $0.4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Salmonella* en muestras de carne; sin embargo, Pérez *et al.* (2008) reporta un nivel mínimo detectable mucho menor el cual es de $0.027 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para la misma bacteria. El nivel mínimo detectable es establecido por el laboratorio en donde se realiza la técnica de PCR, el cual depende de varios factores como son la destreza o capacitación del analista, el buen funcionamiento de los equipos, calibraciones de equipos, calidad del DNA, calidad de los iniciadores, instalaciones adecuadas, entre otros aspectos.

Estos valores permiten observar la alta sensibilidad que presenta la técnica, en comparación con los cultivos microbiológicos convencionales en donde su sensibilidad se puede ver afectada por varios factores, como la viabilidad de la bacteria que se encuentra en la muestra o la recolección o transporte de la misma, en el caso de la PCR no se requiere de la existencia de bacterias vivas o viables en la muestra para diagnosticar su presencia. Sin embargo, Armendáriz y Barreiro (2013) mencionan que la alta sensibilidad que confiere a la técnica de PCR su utilidad, es también su limitación más seria, ya que la amplificación exponencial de DNA moldes puede conseguirse incluso a partir de una sola célula, cualquier resto celular o reactivos contaminados pueden presentar un riesgo de resultados falsos. Con mucho, los reservorios más importantes de moldes “contaminados” son los productos de reacciones previas de PCR. Estos representan una fuente altamente enriquecida de la secuencia, y pueden llegar a encontrarse por todas partes en el laboratorio después de un periodo de tiempo utilizando los mismos iniciadores.

6.1.2. Especificidad y sensibilidad relativa

Se obtuvo un 100% en la especificidad de los iniciadores del gen *InvA* y del gen *fliC* en las muestras inoculadas y no inoculadas con la cepa de *Salmonella typhimurium* y analizadas mediante la PCR (Figuras 7a y 7b), mismo porcentaje de especificidad que reporta Pérez *et al.* (2008) y Aliverti (2012), y en un estudio realizado por Wilkins *et al.* (2009) obtuvieron un valor del 99%.

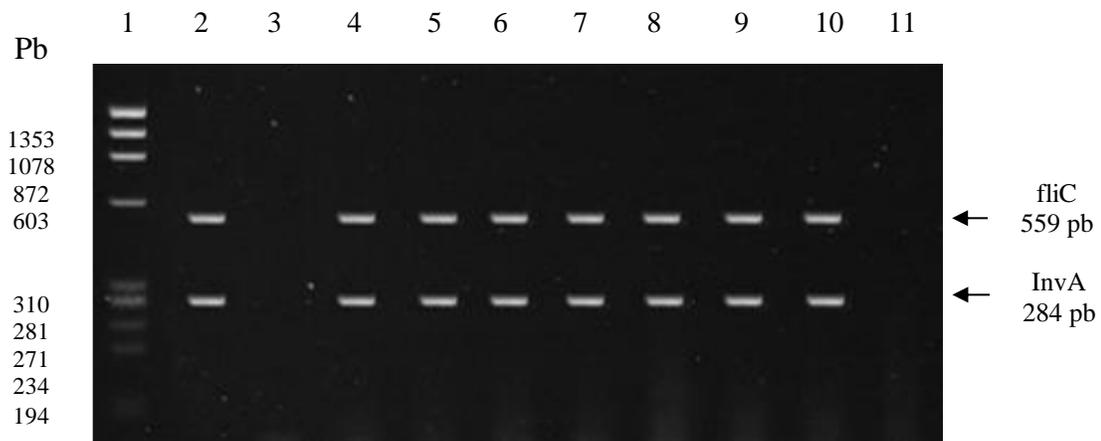


Figura 7 (a). Prueba de especificidad de los iniciadores del gen *InvA* y del gen *fliC*, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%. Pozos: 1) Marcador ϕ X174; 2) Control positivo; 3) Control negativo; 4-10) DNA de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; 11) Blanco.

En la Figura 7b se puede observar que no hubo amplificación del gen *InvA* y del gen *fliC* en muestras de DNA de *E. coli* ATCC 25922, lo que prueba la especificidad de estos iniciadores para *Salmonella* y *Salmonella typhimurium*

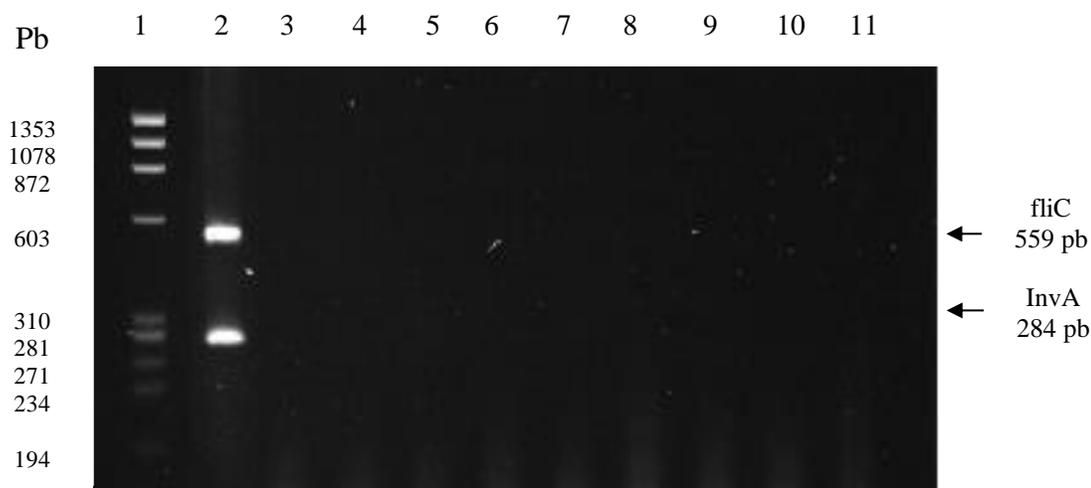


Figura 7 (b). Prueba de especificidad de los iniciadores del gen *InvA* y del gen *fliC*, por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%. Pozos: 1) Marcador ϕ X174; 2) Control positivo; 3) Control negativo; 4-10) DNA de *E. coli* ATCC 25922; 11) Blanco.

En el Cuadro 8 se percibe que todas las muestras inoculadas fueron positivas a *Salmonella* y a *Salmonella typhimurium* y las muestras que no fueron inoculadas fueron negativas a la presencia de la bacteria.

Cuadro 8. Especificidad y sensibilidad relativa de la PCR para detección de *Salmonella typhimurium*

		Muestras probadas		
		Inoculada	No inoculada	Total
Resultado de PCR	Presencia	10	0	10
	Ausencia	0	5	5
	Total	10	5	15
E		1.0	S	1.0

E: Especificidad; S: Sensibilidad

Una de las causas por la que la especificidad del gen *InvA* de *Salmonella* es alta podría deberse a lo que menciona Oliveira *et al.* (2002) quien indica que este gen contiene secuencias únicas de este género y ha sido demostrado como una adecuada secuencia para PCR, con aplicaciones de diagnóstico potenciales. La amplificación de este gen en los

últimos años ha sido reconocida como un estándar internacional para detección del género *Salmonella*. Este gen codifica una proteína en el interior de la membrana de las bacterias que es responsable la invasión de las células epiteliales del huésped (Darwin y Miller, 1999).

En el caso del gen *fliC* se utiliza para la identificación de *Salmonella typhimurium* debido a que codifica el componente principal del flagelo de esta especie; sin embargo, como presenta alta variabilidad de su región central también es utilizado para estudios de caracterización molecular de *Salmonella* (Aldridge *et al.*, 2006).

Algunos genes reportados en la bibliografía que se han utilizado para la detección del género *Salmonella* son *InvA*, *invE*, *himA*, *phoP*, *ipaB*, *iroB*, *lamB*, *fimY* y *fliC*, entre otros.

Debido a que las especies de *Salmonella* han sido consideradas como uno de los patógenos transmitidos por alimentos más importantes alrededor del mundo y a que las técnicas microbiológicas tardan más tiempo, en la amplificación in vitro de DNA por el método de PCR se han utilizado diferentes genes para la detección de las especies de *Salmonella* ya que cada una presenta diferentes síntomas y huésped específico, por lo tanto es necesario e importante diferenciar los serotipos de esta bacteria con el fin de garantizar que cada patógeno y epidemiología se reconozca correctamente.

En relación a la sensibilidad de la técnica de PCR en un estudio realizado por Pérez *et al.* (2008) reporta el mismo porcentaje que el obtenido en este trabajo en muestras de carne (Cuadro 8); sin embargo, en diferentes matrices reporta valores cercanos al 61%. En comparación Armendáriz y Barreiro (2013) indican que obtuvieron un valor de sensibilidad del 90% el cual coincide con el valor obtenido por Wilkins *et al.* (2009).

Por lo tanto puede considerarse que se tiene alta sensibilidad en la técnica de PCR, esta sensibilidad varía dependiendo del tipo de alimento analizado, del tipo de pre-enriquecimiento aplicado, de un trabajo adecuado del analista y también del método y la fuente de extracción del DNA.

Reynisson *et al.* (2006) ha descrito que los resultados también pueden variar de acuerdo al termociclador que se emplee, ya sea por marca o incluso entre modelos de la misma marca, por lo que es necesario ajustar el programa de temperaturas y componentes de la PCR antes de establecer una metodología.

Otra fuente indica que un problema que se repite en muestras de alimentos es la presencia de inhibidores (Di Pinto *et al.*, 2007). Así mismo, el crecimiento del microorganismo objetivo podría verse inhibido por la flora acompañante, dando un resultado negativo por el método tradicional, o bien, la sensibilidad del ensayo de PCR podría ser disminuida. Por esto, es importante seleccionar un medio de enriquecimiento adecuado para inhibir la flora competitiva y establecer un tiempo de incubación adecuado, ya que la sensibilidad de la PCR tiende a aumentar con el incremento del tiempo de enriquecimiento (Guo *et al.*, 2000). Cabe mencionar que el porcentaje de sensibilidad y especificidad de este estudio es válido para las matrices evaluadas, si se quisiera aplicar lo descrito en otro tipo de muestras es necesario realizar un estudio previo de las limitantes posibles y llevar a cabo una prueba piloto, adecuando la técnica para cada tipo de alimento.

6.2. Comparación de metodologías; microbiológica vs PCR

En el Cuadro 9 se muestran los resultados de las muestras que resultaron positivas (presencia en 25 g de carne) a *Salmonella* en relación a la metodología utilizada. Las ventajas de la PCR sobre los métodos convencionales son fundamentalmente su

sensibilidad y especificidad lo que permite detectar muestras positivas en PCR que han sido reportadas como negativas al analizarse con los métodos convencionales microbiológicos (uso de medios de pre-enriquecimiento no selectivo, seguido de enriquecimiento selectivo y en placas sobre agares selectivos y diferenciales y las colonias sospechosas deben ser confirmadas por pruebas bioquímicas y serológicas).

Cuadro 9. Resultados de las muestras de carne de cerdo, res y pollo analizadas con método microbiológico y la técnica de PCR para la detección de *Salmonella typhimurium*

	cerdo (n=20)		res (n=20)		pollo (n=20)		Total	
	%		%		%			
	+	-	+	-	+	-	+	-
microbiológico	2	18	1	19	1	19	4	56
PCR	2	18	1	19	2	18	5	55

+: Presencia de *Salmonella* en 25 g de carne; -: Ausencia de *Salmonella* en 25 g de carne.

A partir de los resultados obtenidos se trabajó con el índice de McNemar y el índice de Kappa para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos de las muestras analizadas por las dos metodologías propuestas y el grado de “concordancia” que existe entre ellas.

Cuadro 10. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de cerdo, res y pollo

		Microbiológico convencional		
		Presencia	Ausencia	Total
PCR	Presencia	4	1	5
	Ausencia	0	55	55
	Total	4	56	60
		k	0.8800	

Se determinó que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras de carne de cerdo, res y pollo positivas a *Salmonella* analizadas mediante el método microbiológico y las muestras positivas a *Salmonella typhimurium* analizadas mediante el método de PCR ya

que existe un nivel de concordancia entre los resultados de ambas metodologías del 88% (Cuadro 10). De acuerdo a los valores de “k” propuestos por Landis y Koch (1977) se tiene un grado de concordancia para las muestras en general “casi perfecto”, esto podría deberse a que ambas metodologías se trabajaron bajo los criterios establecidos en cuanto a los controles de calidad (cepas control, esterilización de material, capacitación del analista, controles positivos y negativos, etc.).

Cuadro 11. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de cerdo

		Microbiológico convencional		
		Presencia	Ausencia	Total
PCR	Presencia	2	0	2
	Ausencia	0	18	18
	Total	2	18	20
			k	1.000

Cuando se compararon los valores de k obtenidos en este estudio para cada tipo de carne se observó que las muestras de carne de cerdo y de res la concordancia es “casi perfecta” (Cuadro 6), ya que el 100% (Cuadro 11 y 12) de las muestras que se detectaron con *Salmonella* en el análisis microbiológico también se detectaron en la PCR.

Cuadro 12. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de res

		Microbiológico convencional		
		Presencia	Ausencia	Total
PCR	Presencia	1	0	1
	Ausencia	0	19	19
	Total	1	19	20
			k	1.000

Cuadro 13. Índice de McNemar e Índice de Kappa para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de pollo

		Microbiológico convencional		
		Presencia	Ausencia	Total
PCR	Presencia	1	1	2
	Ausencia	0	18	18
	Total	1	19	20
			k	0.6430

En el caso de las muestras de carne de pollo se tiene un nivel de concordancia entre las metodologías “moderado” (Cuadro 13), valor cercano al que reporta Álvarez (2012) para este tipo de carne quien realizó un estudio similar en donde encontró valores de k entre ambas metodologías de 0.5 para carne pollo, lo cual representa un grado de acuerdo “moderado”, destacando que podría deberse a dos aspectos fundamentales de la PCR, su mayor sensibilidad y especificidad en comparación con la técnica microbiológica.

De acuerdo a Candrian (1995) hay varias razones que podría explicar porque una muestra se detecta positiva mediante la técnica de PCR y negativa mediante el método microbiológico. Es posible que las células presentes en las muestras de carne se encuentren dañadas ya sea debido a la utilización de productos de saneamiento o las condiciones de almacenamiento, lo que puede dañar o incluso matar a la *Salmonella*, esto a su vez afecta la capacidad de detectar el patógeno utilizando el método microbiológico, ya que este método es dependiente del crecimiento de las células.

Otro factor que puede influir en la diferencia en el grado de concordancia entre estos dos métodos son los medios de cultivo que se utilizan en la técnica microbiológica ya que existen algunas modificaciones al método microbiológico que han sido previamente estudiadas y aprobadas por organismos internacionales para incrementar la sensibilidad y

especificidad de este (Deirdre *et al.*, 2012), la motilidad de la *Salmonella* puede ser aprovechada usando un agar semisólido por ejemplo Rappaport Vassiliadis Modificado semisólido (MRSV) como medio de enriquecimiento, varios estudios han demostrado que es más sensible que el caldo Rappaport-Vassiliadis que se usa en el método estándar para la detección de esta bacteria a partir de muestras de heces, alimentos y piensos (Eriksson y Aspan, 2007).

Este método ya fue incorporado en el anexo D de la norma ISO 6579 para la detección de *Salmonella*, y es una modificación de la norma ISO 6579:2002 para la detección de viabilidad y motilidad de *Salmonella* en heces de animales y en muestras de las etapas primarias de producción de alimentos (Anonymous, 2006).

El laboratorio de referencia de Estados Unidos recomienda para *Salmonella*, el uso de MRSV, también fue recomendado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para utilizarse durante un estudio de referencia sobre la prevalencia de *Salmonella* en cerdos de engorde en la Unión Europea (Deirdre *et al.*, 2012).

En México no se ha realizado alguna modificación en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, “Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos”, en relación a los medios de enriquecimiento utilizados. Los medios de enriquecimiento señalados en esta norma son caldo de tetrionato, caldo selenito-cistina y se menciona como alternativa, en sustitución del caldo tetrionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport. Cabe mencionar que para el análisis de las muestras se utilizó el medio Vassiliadis-Rappaport.

El Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) que es el laboratorio de referencia de la SAGARPA, incluye el uso del caldo Vassiliadis-Rappaport

modificado en su protocolo para el aislamiento e identificación de *Salmonella* en carne, aves de corral y productos de huevo.

Mientras no se realice esta modificación en la Norma Oficial Mexicana que establece el método general para la determinación de *Salmonella* en alimentos se deberá de seguir utilizando los medios de enriquecimiento indicados, ya que es una norma de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas y morales que requieren efectuar este método en productos nacionales y de importación para fines oficiales.

Sin embargo, si existe una mayor sensibilidad de la técnica de PCR en comparación con el método microbiológico, de acuerdo a los resultados obtenidos, aun a bajas concentraciones, como las que fueron probadas en este estudio ($0.310 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

6.3. Incidencia de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo en puntos de venta de la ciudad de Texcoco

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la presencia de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo comercializada en la ciudad de Texcoco (Figura 8). Sin embargo, en la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 “Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba”, se establece que en los productos cárnicos crudos *Salmonella* debe estar ausente en 25 g de muestra de carne.

El porcentaje de incidencia de *Salmonella typhimurium* estimado es del 8.3% mediante la técnica de PCR para la carne en general. La presencia de este Enteropatógeno puede estar relacionada con problemas asociados a las instalaciones, a las buenas prácticas de manipulación, buenas prácticas de higiene, transporte de materia prima y la conservación de la carne (cadena de frío). Daum *et al.* (2002) menciona que los alimentos perecederos y

los que requieren manipulación, son los que con mayor frecuencia están involucrados en brotes alimentarios debido a este patógeno, entre ellos se encuentran los productos y subproductos cárnicos, leche cruda, huevos, productos que contienen huevo y vegetales, entre otros (Gast *et al.*, 1998).

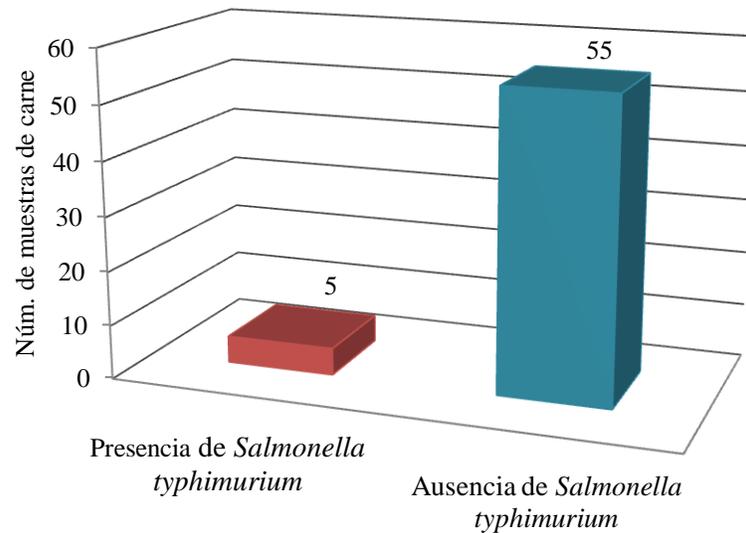


Figura 8. Incidencia de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo en puntos de venta de la ciudad de Texcoco

La importancia de identificar *Salmonella typhimurium* en este tipo de muestras se debe a que junto con *Salmonella enteritidis* son los serovares más frecuentemente aislados en brotes de transmisión alimentaria en todo el mundo (Jamshidi *et al.*, 2009) y Zaidi *et al.* (2006) indica que también son los serovares de *Salmonella* más recurrentes en México.

Según la Organización Mundial de la Salud, entre un 70 y un 80% de los casos de diarrea que se producen se deben a la ingestión de agua y alimentos contaminados, constituyendo actualmente un desafío, puesto que se desconoce su real incidencia.

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados.

La Secretaria de Salud indica que afecta a todos los grupos de edad; sin embargo, su mayor incidencia se da en los extremos de la vida: en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables.

La FAO (2011) indica que si bien los alimentos contaminados con bacterias pueden ser consumidos tras cocinarlos a temperaturas superiores a 70 °C, se debe tener especial cuidado con la contaminación cruzada ya que los alimentos ya cocinados pueden contaminarse a través de las materias primas, trato o manipulación inadecuados. Las bacterias pueden continuar creciendo en los alimentos, a menos que se controlen los parámetros de los procesos pertinentes, como valor del pH, actividad del agua, temperatura y tiempo. Sólo unas pocas células bacterianas que sobrevivan en los alimentos pueden ser suficientes para provocar enfermedades.

6.3.1. Incidencia por tipo de carne (cerdo, res y pollo)

Se detectó presencia de *Salmonella typhimurium* en los tres tipos de carne analizada (Figura 9). Esto puede deberse a que los animales son los principales reservorios de esta bacteria (Winfield y Groisman, 2003), los productos y subproductos cárnicos, leche cruda, huevos, productos que contienen huevo y vegetales, entre otros están involucrados en mayor frecuencia en brotes alimentarios debido a este patógeno (Gast *et al.*, 1998), en adición dentro de los productos cárnicos la carne de cerdo, res y pollo han demostrado ser un buen vehículo para la transmisión de *Salmonella* de animales a seres humanos.

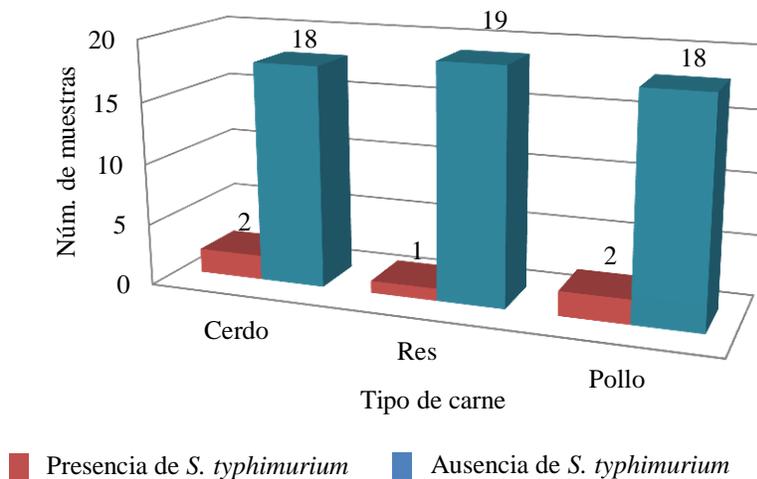


Figura 9. Incidencia de *Salmonella typhimurium* (n=60) por tipo de carne (cerdo, res y pollo)

En el caso de la carne de cerdo el porcentaje de incidencia fue del 10%, en comparación diversos sondeos indican valores de aproximadamente 8% de incidencia en productos cárnicos de cerdo en países como Estados Unidos, Alemania (Kaesbohrer, 1999), Italia y Holanda (Comisión Europea, 2000), muy por encima del < 1% en Dinamarca o < 0.02% en Suecia (Hurd *et al.*, 2001). En la gran mayoría de los casos, el principal serotipo aislado es *Salmonella typhimurium*. Los bajos porcentajes de incidencia presentados en estos países se debe principalmente a los programas de control de *Salmonella* que se han establecido a lo largo de la cadena productiva de la carne de cerdo.

Se estima que la carne de cerdo es el origen de un 15% de las tox infecciones por *Salmonella* (rango entre 5 y 25% según estudios) y de un 50% de las producidas por *Salmonella typhimurium* (Berends *et al.*, 2008) a nivel mundial. Sin embargo, el control de las tox infecciones alimentarias debe pasar por una reducción de la prevalencia de los patógenos en la población animal porcina.

Para la carne de res se obtuvo un porcentaje de incidencia de *Salmonella typhimurium* del 5%, valor menor al que reporta Hernández (2013) quien realizó un estudio de incidencia de *Salmonella* en carne molida de res comercializada en Texcoco obteniendo un 15% de muestras positivas a este patógeno, utilizando el Metodo Via Tecra para el análisis de las muestras.

Hernández *et al.* (2011) menciona que existe un predominio estacional, hay mayor incidencia de gastroenteritis vírica en otoño-invierno; mientras que las bacterias afectan preferentemente en primavera-verano. Gutiérrez *et al.* (2000) menciona que *Salmonella* presenta una incidencia estacional en cuanto a frecuencia con relación a los meses del año ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Esta podría ser una de las causas por las que se obtuvieron porcentajes de incidencia diferentes ya que en el trabajo realizado por Hernández (2013) el muestreo se realizó en los meses de junio y julio y en el presente trabajo los muestreos fueron realizados en los meses de noviembre y diciembre del mismo año, eligiendo estos meses debido a la alta demanda de consumo de carne que se presenta durante esta época del año.

En un estudio realizado por Rubio *et al.* (2013) encontraron un nivel de incidencia de *Salmonella* del 2.5% en muestras de res obtenidas en la ciudad de México, y un nivel de incidencia del 3.0% en muestras obtenidas en la ciudad de Monterrey, en contraste con muestras obtenidas en Tabasco en donde obtuvieron niveles de incidencia del 30% para dicho patógeno, esto puede deberse a que el uso de programas pre-requeridos y la implementación de sistemas como el HACCP para reducir cargas patógenas no es obligatorio y solamente es usado por algunos rastros como iniciativa propia. En este estudio también se realizaron análisis de *Listeria monocytogenes* y *Yersenia enterocolitica* a las

mismas muestras, siendo *Salmonella* el patógeno con menor incidencia (8.8%) en la carne de res, posiblemente debido a las condiciones bajo las cuales los patógenos mencionados, sobreviven, crecen y se desarrollan.

Vargas (2009) indica que los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos de salmonelosis son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz. Las entidades federativas con menos reportes fueron Durango, Hidalgo, México, San Luís Potosí, y Tlaxcala.

Estrada *et al.* (2004) mencionan que en México existen muchas variantes en las condiciones sanitarias de la carne de res; estas condiciones son dependientes del desarrollo económico de la industria en las diversas regiones geográficas del país. La región norte de México, que incluye los estados de Chihuahua y Nuevo León, ha mostrado tener un gran desarrollo económico e industrial en comparación con los estados localizados en el centro y sur. Este desarrollo ha tenido como consecuencia un impacto en las condiciones higiénicas de los rastros y de los puntos de venta y por lo tanto, en la presencia y desarrollo de patógenos en la carne.

Aliverti (2012) reporta niveles de incidencia de *Salmonella* del 8.0% en carne de bovino molida en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, el cual lo relaciona con problemas asociados a las instalaciones, a las buenas prácticas de manipulación, buenas prácticas de higiene, transporte de materia prima y la conservación de la carne.

La incidencia de *Salmonella typhimurium* en la carne de pollo fue del 10%. En general los productos de aves de corral han sido reconocidos como fuente principal de enfermedades humanas causadas por este patógeno (Amavisit *et al.*, 2001), además la carne de pollo crudo es también una de las causas más frecuentes de la infección de humanos por cepas de *Salmonella* (Panisello *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Jamshidi *et al.* (2009) reportan un nivel de incidencia del 8.3% para *Salmonella* y un 1.6% para *Salmonella typhimurium* en canales de pollo, menciona que los resultados también dependen del método utilizado para el análisis de las muestras y que los serotipos predominantes son diferentes para cada país.

Otro estudio realizado por el Servicio Nacional de Salud Animal en Costa Rica (SENASA, 2009) reporta una prevalencia de *Salmonella* en carnes frescas y subproductos de pollo del 14.3%.

En el 2010, la Unión Europea publicó un estudio sobre *Salmonella* en carne de pollo, donde estimaron la prevalencia promedio en 15.7% (EFSA, 2010). En este mismo estudio se observan importantes variaciones en la prevalencia entre los estados miembros de la Unión Europea que van desde 0 % a 26.6%. Finlandia, Estonia, Dinamarca, Luxemburgo y Suecia mostraron prevalencias de 0%, lo que demuestra que los países pueden tomar las medidas adecuadas para disminuir la prevalencia de *Salmonella* en los productos cárnicos.

En países como Alemania y España se reportan prevalencias del 14.5% y 14.4%, respectivamente y del 11.5% para Estados Unidos (Míkanatha *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la contaminación de la carne con patógenos puede ocurrir durante la matanza y en la evisceración de las aves, especialmente en los establecimientos que sacrifican una cantidad considerable de pollos, por lo que una mejora en las condiciones de proceso e higiene durante el sacrificio puede reducir significativamente el riesgo de contaminación por *Salmonella*.

Un ejemplo es el informe del FSIS-USDA para el programa de reducción de patógenos PR/HACCP, el cual demuestra que luego de aplicar este programa se redujo la presencia de *Salmonella* de 11.4 a 7.2% en pollo entero para asar, esto en el periodo 2006 -2009 (FSIS-USDA, 2009).

La FAO/WHO (2009b) indica que aunque la información sobre la incidencia de *Salmonella* en carne de aves de corral es limitada, el papel de estas se considera significativo en los brotes alimentarios presentados en los últimos años a nivel mundial. Sin embargo, la incidencia en diferentes países varía de acuerdo con el control, medidas y prácticas implementadas a lo largo de la cadena desde la producción primaria hasta la preparación de la carne para el consumo. En 2007, la Comisión del Codex Alimentarius convino que la elaboración de directrices para el control de *Salmonella* en las aves de corral era una prioridad.

El Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para los Alimentos (NACMCF), indico que una cocción del pollo crudo a una temperatura interna mínima de 74 °C permite una reducción de 7 log₁₀ en *Salmonella* (SENASA, 2009).

La contaminación por *Salmonella* puede producirse en cualquier etapa de la cadena cárnica: desde las materias primas para alimentación animal, la fabricación de pienso, la granja, el matadero, la sala de despiece, los centros de elaboración hasta la conservación y preparación del producto cárnico por el consumidor en el hogar.

6.3.2. Incidencia por tipo de establecimiento

Las muestras para la detección de *Salmonella typhimurium* procedieron de carnicerías, tianguis y supermercados. Se encontró presencia del Enteropatógeno en muestras de carne de cerdo que procedían de carnicerías y en muestras de carne de cerdo, res y pollo que procedían de los mercados rodantes conocidos como tianguis. No se encontró incidencia de *Salmonella typhimurium* en muestras obtenidas de supermercados (Figura 10).

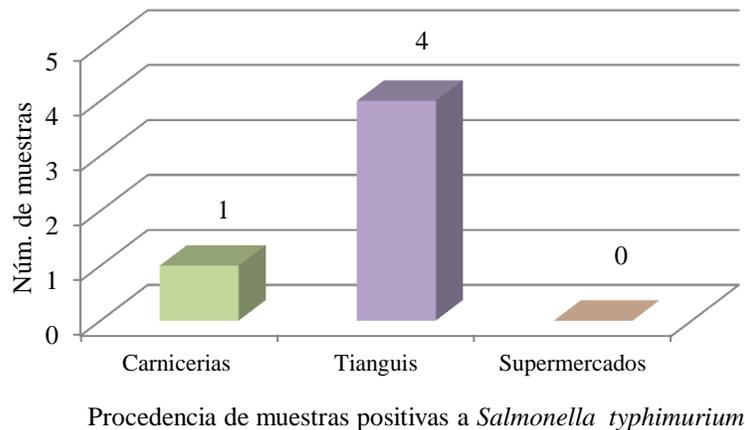


Figura 10. Incidencia de *Salmonella typhimurium* por tipo de establecimiento

De las muestras positivas a *Salmonella typhimurium* (5/60) el 80% provenían de tianguis y el 20% de carnicerías. El elevado número de muestras positivas provenientes de tianguis se debe a las pocas medidas de higiene y control sanitario con el que es manipulada la carne, la cual está totalmente expuesta a la contaminación y pone en riesgo potencial la salud de las personas.

Además de la inapropiada manipulación de la carne, una de las características generales encontradas en los puestos de venta de carne en el tianguis durante este estudio fue el tipo de suministro de agua que presentaron; en estos sitios no existían fuentes constantes de agua como lavabos, lavamanos, etc.

La carne debe mantenerse en refrigeración o congelación en los puntos de venta a una temperatura máxima en su centro térmico de 4°C o -18 °C respectivamente, se menciona que en el caso de la carne proveniente de aves domésticas y vísceras se puede emplear hielo (NOM-194-SSA1-2004); sin embargo, la mayoría de la carne comercializada en estos puntos de venta no se mantienen estas condiciones lo que permite que se rompa la cadena de frío.

Tanto las carnicerías como los puestos en el tianguis presentan una deficiente o mal manejo de basura que puede ser una posible fuente de contaminación, ya que la acumulación de los residuos líquidos y sólidos es un ambiente propicio para la llegada de vectores como moscas y roedores.

Otro factor que es importante mencionar es la manera en la que se transporta la carne a los puntos de venta y que fomenta la contaminación de la carne, por ejemplo se transportan carnes de diferentes especies teniendo contacto entre ellas, la carne se coloca en el piso de la unidad, en un mismo vehículo se movilizan las vísceras y las canales teniendo contacto directo entre ellas, los vehículos no son exclusivos para el transporte de carne y no cuentan con sistemas de refrigeración o congelación.

Mediante el uso de la versión armonizada de la Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria (ELCSA, 2010) se estimó que el 28.2% de los hogares mexicanos (alrededor de 8,322, 486) han tenido que disminuir la cantidad y calidad de alimentos que suelen consumir lo cual favorece la compra de alimentos en lugares poco higiénicos como puestos en la calle o carnicerías insalubres donde se cuestiona primero el precio, en segundo término la calidad y se pasa por alto la inocuidad (López *et al.*, 2010).

Con el fin de reducir la presencia de los principales microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la carne cruda, se han establecido especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio indicadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004.

En el caso de los supermercados no se encontró incidencia de *Salmonella typhimurium* en ningún de las especies de carne analizadas; sin embargo, en el estudio realizado por Rubio *et al.* (2013) en muestras de res provenientes de supermercados del norte, centro y del sur

del país si detectaron la presencia de la bacteria, así mismo Hernández (2013), también reporta presencia en muestras de la misma especie para Texcoco.

VII. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos establecidos en este estudio se puede concluir lo siguiente:

La técnica de PCR desarrollada en el presente estudio demostró ser rápida y específica para la detección de *Salmonella typhimurium*. De manera general, para los productos cárnicos analizados (cerdo, res y pollo) se tuvo una sensibilidad alta (100%) de la técnica de PCR con una concentración mínima detectable de $0.3 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, y también la especificidad de los primers utilizados fue del 100%, indicando el potencial de detección de *Salmonella typhimurium*.

La validación de la técnica de PCR resultó altamente similar al método microbiológico para la detección *Salmonella typhimurium*. De manera general, para los tres tipos de productos cárnicos analizados, la concordancia entre PCR y el método microbiológico fue alta (88%) e indica la factibilidad del uso de PCR en el diagnóstico de *Salmonella typhimurium*. Específicamente, el uso de PCR para detección de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo y res resulta en 100% y en el caso de carne de pollo fue de 64%, indicando que en este producto cárnico, PCR muestra vulnerabilidad.

Con base a las muestras de carne analizadas en los puntos de venta de la Ciudad de Texcoco, se concluye que el 10% de la carne de cerdo, el 5% de carne de res y 10% carne de pollo presentan contaminación por *Salmonella typhimurium*. De las muestras positivas, el 80% provenían del tianguis y el 20% de carnicerías; no se encontró incidencia de *Salmonella typhimurium* en muestras provenientes de supermercados.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aldridge, P., J. Gnerer, J. E. Karlinsey, y K. T. Hughes. 2006. Transcriptional and Translational Control of the *Salmonella* fliC Gene. *J. Bacteriol.* 188: 4487-4496.
- Aliverti, V. 2012. Desarrollo y validación intra-laboratorio de una metodología para la detección de *Salmonella* spp. en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de prevención y control. Tesis de maestría. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 107 p.
- Álvarez, M. N. 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella entérica*. Tesis doctoral. Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España. 107 p.
- Álvarez, S. A. 2012. Comparación de la técnica microbiológica en relación a la técnica de PCR en muestras de carne de res. *Revista Argentina de Microbiología.* 32: 49–52.
- Amavisit, P., G. F. Browning, D. Limes, y C. S. Anderson. 2001. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. *J. Vet. Microbiol.* 79: 63-74.
- AMEG. Asociación Mexicana de Engordadores de Ganado. México. <http://www.ameg.org.mx/estadisticas/nacional/> (Consulta: mayo 2014).
- Anonymous. 2006. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006–2007. Part A. *J. EFSA.* 135:1–111.
- Armendáriz, I., y Z. E. Barreiro. 2013. Detección de *Salmonella* spp. Mediante PCR en muestras de Embutido, cereales y superficies Inertes. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 121 p.

- Berends, B. R., F. Knapen, C. D. A. Mossel, S. A. Burta, y J. M. A. Snijders. 2008. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 219-229.
- Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction in food microbiology. *J. Microbiol. Metho.* 23: 89-95.
- Caravaca, G., C. Villar, M. Mosquera, E. Corral, B. Piñero, y E. López. 2000. Concordancia diagnóstica entre atención primaria y atención especializada al evaluar *nevus melanocíticos*. *SEMERGEN.* 26:428-431.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention of U.S.A. 2007. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2012. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 62: 283-287.
- CDC. Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations. 2013. <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html> (Consulta: junio 2013).
- CENAVECE. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. México. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd_informacion (Consulta: junio 2013).
- Cervantes, T. L. A., V. A. Chalte, y C. K. Tapia. 2008. Enfermedades transmitidas por Alimentos. 2008. Capacitación para el Servicio de Alimentación. Secretaria de Educación Pública. http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs_SEP_2008.pdf (Consulta: mayo 2012).
- Codex Alimentario. 2007. Programa conjunto FAO /OMS, sobre normas alimentarias. Comité de higiene de los alimentos. Documento de debate sobre las estrategias de gestión de riesgo para *Salmonella* spp. en las aves de corral. CX/FH04/10- ADD.

- Comisión Europea. 2000. Opinion of the scientific comite in food-borne diseases. <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/> (Consulta: junio 2013).
- Copes, J., K. Pellicer, G. Echeverría, N. Stanchi, C. Martínez, y L. Leardini. 2000. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. Revista Argentina de Microbiología. 32: 49–52.
- Darwin, K. H., y V. L. Miller. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. 12: 405-428.
- Daum, L., W. Barnes, J. Mc Avin, M. Neidert, L. Cooper, y W. Huff. 2002. Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. J. Clin. Microbiol. 40:3050-3052.
- Deirdre, M. P., O. G. Don, M. Andrew, M. Evonne, F. J. E. Seamus, F. June, y G. Montserrat. 2012. Application of PCR for rapid detection and serotyping of *Salmonella* spp. from porcine. J. Food Research International. 45: 993-999.
- Di Pinto, A., V. Forte, M. G. Guastadisegni, C. Martino, F. Schena, y B. Tantillo. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. J. Food Control 18: 76-81.
- EFSA. European Food Safety Authority. 2006. Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. Proposal of baseline study on the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs in the EU. J. EFSA. 341: 117–131.
- EFSA. 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006–2007. Part A. J. EFSA. 135: 1–111.

- EFSA. 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. PartA: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. J. EFS. 8(3):1503.
- EFSA-ECDC. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. J. EFSA. 9(3): 2090-2101.
- ELCSA. Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria 2010. Manual y Uso de Aplicaciones. <http://www.rlc.fao.org/es/publicaciones/elcsa> (Consulta: marzo 2014).
- Elley, A. 1994. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Editorial Acribia, Zaragoza, España, p. 17.
- Eriksson, E. y A. Aspan 2007. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Veterinary Research.3: 1–19.
- Estrada, G. T., S.C. López, A. B. Zamarripa, M. R. Thompson, C. L. Gutiérrez, M. A. Mancera, y G. A. Escobar. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City. J. Epidemiol Infect. 132:1181-1184.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. Manual de buenas prácticas para la industria de la carne. Producción y sanidad animal. FAO, Roma, Italia. 302 p.
- FAO. 2011. Prevención de la E. coli en los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos. Dirección de información de la FAO. Roma, Italia. pp: 1-16.

- FAO/OMS. 2005. Red de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos. Nota de información de INFOSAN No. 6/2005 – WHO Global Salm-Surv.
- FAO/ WHO. 2009a. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 12. Roma, Italia. 132 p.
- FAO/ WHO. 2009b. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 19. Roma, Italia. 69 p.
- Faruque, S. M., C. Nityananda, K. Rasel, H. M. Rubayet, N. Jebun, I. M. Johirul, Y. Shinji, A. N. Ghosh, N. G. Balakrish, y A. D. Sack. 2003. *Shigella dysenteriae* Type 1-specific bacteriophage from environmental waters in Bangladesh. Applied Environ. Microbi. 68(12): 7028–7031.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. 2001. The problem of foodborne illness, Partnership for Food Safety Education. U. S. 35 p.
- Feldsine, P., C. Abeyta, y W. Andrews. 2002. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Internat. 85: 1187-1200.
- Fratamico, P. M. 2003. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. Mol. Cell Probes. 17: 215-221.
- FSIS-USDA. Food Safety and Inspection Service-United States Department Agriculture. 2009. Isolation and identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, and Egg Products. Microbiology Laboratory Guidebook.

- Gallegos, R. M. A., L. A. Morales, O. G. Álvarez, G. J. A. Osuna, I. O. Martínez, L. H. Morales-Ramos, y P. Fratamico. 2009. PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. *J. Food Sci.* 74(1): 37-40.
- Gálvez, E. R. 2006. Calidad e inocuidad en las cadenas latinoamericanas de comercialización de alimentos. FAO 14: 1-93. <http://www.fao.org/Ag/ags/subjects/es/agmarket/agsfop14.pdf> (Consulta: agosto 2013).
- Gast, R., R. Porter, y S. Holt. 1998. Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella* enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. p: 12-18.
- González, F. S., T. A. Villagra, M. Pichel, S. Figueroa, G. Merletti, y M. I. Caffer. 2009. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 11-19.
- Guo, X., J. Chen, L. Beuchat, y R. Brackett. 2000. PCR detection of *Salmonella* enterica serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from h1A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5248-52.
- Gurtler, J. B., J. L. Kornacki, y L. R. Beuchat. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International J. Food Microbiology.* 104: 21-34.
- Gutiérrez, C. L., B. C. González, C. S. Giono, y L. G. Beltrán. 2000. Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 703 cepas en México entre 1982 y 1993. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 36:221-226.
- Gutiérrez, C. S. 2008. Diagnóstico de las enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal. *Bacteriología Médica diagnóstica. México.* 6: 79-81.

- Hernández, A. S. 2013. Incidencia de *Escherichia coli* 0157 y *Salmonella* sp. en carne de bovino comercializada en Texcoco. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Hernández, C. C., A. G. Aguilera, y E. G. Castro. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en Mexico. *Enf. Inf. Microbiol.* 31 (4): 137-151.
- Hurd, H., J. Mckean, M. Rostagno, R. Griffith, y I. Wesley. 2001. Proc. 32nd American Association of Swine Practicioners. pp: 25-26.
- Jamshidi, A., M. R. Bassami, y S. Afshari-Nic. 2009. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int. J. Vet. Res.* 3(1): 43-48.
- Jawetz, E., J. Melnick, E. Adelberg. 2005. *Microbiología Médica. El manual moderno.* 18ª edición. México D. F. pp. 65-73.
- Kaesbohrer, A. 1999. Proc. of the 3rd international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Washington, USA. p: 358-361.
- Krause, M., M. H. Josefsen, M. Lund, N. R. Jacobsen, L. Brorsen, M. Moos, A. Stockmarr, y J. Hoorfa. 2006. Comparative, collaborative, and on-site validation of a TaqMan PCR method as a tool for certified production of fresh, *Campylobacter*-free chickens. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 72(8): 5463-5468.
- Landis, J. R., y G. G. Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.
- León-Ramírez, S. 2002. Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco.* 8(1): 22-25.
- Li, Y. M. 2004. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *J. Food Microbiol.* (21):369-375.

- Lim, Y. H., K. Hirose, H. Izumiya, E. Arakawa, H. Takahashi, J. Terajima, K. I. Itoh, K. Tamura, S. I. Kim, y H. Watanabe. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 151-155.
- López, C. 2000. Estado del conocimiento de la Campylobacteriosis en la República Argentina: alcances y limitaciones. Tesis Maestría en Salud Pública. Centro de Estudios Avanzados. Universidad de Buenos Aires. 112 p.
- López, G., y P. S. Fernández. 2001. Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Revista Epidemiología Clínica y Bioestadística.* 6: 169-171.
- López, S. C., J. F. Cerna y, G. T. Estrada. 2010. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* is the most prevalent diarrheagenic *E. coli* pathotype in street-vended taco dressings in Mexico City. *Clinical Infectious Diseases.* 50 (3): 450–451.
- Mahajan, R. K., S. A. Khan, D. S. Chandel, N. Kumar, C. Hans, y R. Chaudhry. 2003. Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5830–5832.
- Malorny, B. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella*. *Food Applied Environ. Microbiol.* 70: 7046-7052.
- Masana, M. O. 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. <http://www.faqs.org/periodicals> (Consulta: enero 2014).
- Mercado, F. H. 2007. Implementación del Sistema de Análisis y Puntos Críticos de Control (HACCP) en Alimentos. *Revista Ciencia UNAL.* 5:221-254.

- M'ikanatha, N. M., C. H. Sandt, A. R. Localio, D. Tewari, y S.C. Rankin. 2010. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates *Foodborne Pathogens and Disease*. 7(8): 929-934.
- Miranda, L. G. C., M. Villarroel, G. Liste, J. Escós, y G. A. María. 2010. Critical points in the pre-slaughter logistic chain of lambs in Spain that may compromise the animal's welfare. *Small Ruminant Research*. 90(3): 174-178.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Secretaria de Salud.
- Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. Secretaria de Salud.
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaria de Salud.
- OAA. Organismo Argentino de Acreditación. 2003. <http://www.oaa.org.ar/> (Consulta: agosto 2013).
- Oliveira, S. D., L. R. D. Santos, M. T. Schuch, A. B. C. Silva, T. P. Salle, y C. W. Canal. 2002. Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR. *J. Vet. Microbiol.* 87: 25-35.
- Painter, J. A., R. M. Hoekstra, T. Ayers, R. V. Tauxe, C. R. Braden, F. J. Angulo, y P. M. Griffin. 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 407-415.

- Panisello, P. J., R. Rooney, P. C. Quantick, y R. Stanwell-Smith. 2000. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP system. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 221-234.
- Pérez, C., M. M. Sánchez, S. Henao, y N. M. Cardona-Castro. 2008. Estandarización y Evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. *Revista Científica Universidad de CES.* 40: 235-242.
- Poppe, C., N. Smart, R. Khakhria, W. Johnson, J. Spika, y J. Prescott. 1998. *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *J. Can. Vet.* 39 (9): 559-565.
- PORCIMEX. Confederación de Porcicultores Mexicanos, A. C. México. <http://www.porcimex.org/estadisticas.htm> (Consulta: junio 2014).
- Rahn, K., S. DeGrandis, R. Clarke, S. Mcewen. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probe.* 6: 271-279.
- Rendón, S. G. 2001. Apuntes del curso de Muestreo. Aplicación en la estimación simultanea de varios parámetros. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco. México.
- Reynisson, E., M. Josefsen, M. Krause, y J. Hoorfar. 2006. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J. Microbiol Methods.* 66:206-216.
- Rodríguez, D., P. Teixeira, R. Oliveira, y J. Azeredo. 2011. *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *J. Food Protect.* 74(1): 32-37.

- Rodríguez, I. y H. Barrera. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Revista Ciencia UNAL*. 7:323-335.
- Rubio, L. M. S., B. J. F. Martínez, C. R. Hernández, C. C. Bonilla, M. R. Danilo, J. F. Medina, E. Núñez, A. Echeverryb, y M. B. Mindy. 2013. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 4(1):107-115.
- Salehi, T. Z., M. Mahzounieh, y A. Saeedzadeh. 2005. Detection of InvA Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method. *International J. of Poultry Science*. 4 (8): 557-559.
- SAS. 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 104 p.
- Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M. A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, y P. M. Griffin 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 7–15.
- Schneider, A., C. Gronewald, M. Fandke, B. Kurth, S. Barkowsk, y K. Berghof-Jager. 2007. Real time detection of the genus with the Light Cycler System. *Biochemical*. 4:19-21.
- SENASA. Servicio Nacional de Salud Animal de Costa Rica. 2009. Prevalencia de *Salmonella* spp. en carnes frescas y subproductos de pollo. Informe técnico. <http://bvs.panalimentos.org/local/File/BolMayoInf-TecnicoSalmonellaCarnesPollo2011.pdf> (Consulta: marzo 2013).
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. 2013. <http://www.siap.gob.mx> (Consulta: marzo 2014).
- Smith, J. N., y B. M. Ahmer. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J. Bacteriology*. 185(4): 1357-1366.

- Stanchi, O. 2007. Microbiología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 273 p.
- Steenackers, H., K. Hermans, J. Vanderleyden, y S. C. J. De Keersmaecker. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International. 45: 502–531.
- Stocki, S. L., C. B. Annett, C. D. Sibley, M. McLaws, S. L. Checkley, N. Singh, M. G. Surette, y A. P. White. 2007. Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is dependent on the belt type but not on the rdar morphotype. Poultry Sci. 86: 2375-2383.
- Terrango, R., M. L. Caffer, S. Bruno, y S. Binstein. 2003. Aislamiento, identificación y serotipificación *Salmonella*. Parte 1. En: Manual de procedimientos Ministerio de Salud de la Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos C. Malbran”. Buenos Aires, Argentina. 253 p.
- Trullols, E., I. Ruisánchez, y X. Rius. 2004. Validation of qualitative analytical methods. Trends Analyt. Chem. 23: 137 - 145.
- Ukuku, D. O., y W. F. Fett. 2006. Effects of cell surface charge and hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella serovars* to cantaloupe rind and decontamination with sanitizers. J. of Food Protection. 69(8): 1835-1843.
- UNA. Unión Nacional de Avicultores. México. <http://una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> (Consulta: Abril 2013).
- Vargas, M. M. R. 2009. Paratifoidea y otras salmonelosis. Vigilancia epidemiológica 2009. 40: 1-3.

- Vidal, J. E., R. A. Canizález, J. J. Gutiérrez, y G. F. Navarro. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Sal. Pub. Mex.* 49: 376-386.
- White, A. P., D. L. Gibson, G. A. Grassl, W. W. Kay, B. B. Finlay, B. A. Vallance, y M. G. Surette. 2008. Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infection and Immunity.* 76(3): 1048-1058.
- Wilkins, W., C. Waldner, A. Rajic, M. McFall, A. Muckles, y R. C. Mainar-Jaime. 2009. Comparison of Bacterial Culture and Real-Time PCR for the Detection of *Salmonella* in Grow-Finish Pigs in Western Canada Using a Bayesian Approach. *J. Zoonoses Public Health.* 57: 115-120.
- Winfield, M. D., y E. A. Groisman. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3687-3694.
- Zaidi, M. C., M. López, y E. Calva. 2006. Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, Vacunas y Biología Molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 48 (2): 121-125.

ANEXO A

Cuadro A-1. Censo de las carnicerías, tiendas de autoservicio, pollerías y expendios de carnes (carne de res, pollo y cerdo) de la zona centro de Texcoco.

Número	Nombre	Dirección	Producto
1	Carnicería "Mary"	Mercado de Santa Cruz s/n	cerdo, res y pollo
2	Carnicería "Santa Cruz"	Prolongación Manuel González núm. 5	cerdo y res
3	Carnicería "Mary"	Moleros núm. 538	cerdo, res y pollo
4	Carnicería "Los atómicos"	José Ma. Morelos s/n	cerdo y res
5	Carnicería "La ponderosa"	Morelos núm. 507	res
6	carnicería "2 de Marzo"	2 de Marzo núm. 302	cerdo y res
7	Expendio de carne "Aurora"	Fray Pedro de Gante núm. 316	cerdo, res y pollo
8	Distribuidora de pollo "Rancho alegre"	Fray Pedro de Gante núm. 255	pollo
9	"Mercado de carnes y vísceras Texcoco"	Fray Pedro de Gante núm. 213	cerdo, res y pollo
10	Carnicería "Trejo"	Fray Pedro de Gante s/n	cerdo y res
11	Carnicería "La 1"	Central de abastos Col. Nezahualcóyotl	cerdo y res
12	Pollería "La 4"	Central de abastos Col. Nezahualcóyotl	pollo
13	Pollería "La 3"	Central de abastos Col. Nezahualcóyotl	pollo
14	Pollería "Las vías"	Nezahualcóyotl núm. 313	pollo
15	Carnicería	Nezahualcóyotl núm. 314	cerdo y res
16	Pollería "Crucero"	González Ortega s/n	pollo
17	Carnicería "Susana"	Nezahualcóyotl núm. 522	cerdo y res
18	La periquita	Nicolás Romero s/n	res y pollo
19	Carnicería Diego	Nicolás Romero núm. 217	cerdo, res y pollo
20	Pollería "Saira"	Prolongación Abasolo núm. 9	pollo
21	Pollería "Panchino"	Abasolo esquina Francisco Sarabia	pollo
22	Carnicería	Francisco Sarabia num. 62	cerdo y res
23	pollería "Clemen"	Francisco Sarabia núm. 16	pollo
24	Distribuidora Mexicana de alimentos "Karnika"	Francisco Sarabia núm. 510	res
25	Pollería "Mi Ángel"	Tenía núm. 1	pollo
26	Pollería "Barbarita"	Abasolo núm. 112	pollo
27	Carnicería Landa	Noche Buena 4c	cerdo y res
28	Pollería "Wrindolyne"	Noche buena s/n	pollo
29	Carnicería "California"	Noche buena s/n	cerdo y res
30	Carnicería "Itzel"	Noche buena s/n	cerdo, res y pollo
31	Pollería "Jaime"	Calle higuierilla s/n	pollo

32	Pollería "Blanquita"	Arrayan manzana 3 lote 6	pollo
33	Carnicería "Zapata"	Emiliano Zapata núm. 223	cerdo, res y pollo
34	Pollería "Los Güeros"	Fray Bartolomé de las Casas s/n	pollo
35	Pollería "Lalo"	Fray Pedro de Gante núm. 230	pollo
36	Carnicería "Mary"	Miguel Hidalgo s/n	cerdo, res y pollo
37	Carnicería "Evanecer"	Miguel Hidalgo núm. 24	cerdo, res y pollo
38	Carnicería "1"	Mercado Belisario Domínguez local 1	cerdo, res y pollo
39	Carnicería	Mercado Belisario Domínguez local 22	cerdo, res y pollo
40	Carnicería	Mercado Belisario Domínguez local 25	cerdo, res y pollo
41	Pollería "Rancho Alegre"	Mercado Belisario Domínguez s/n	pollo
42	Pollería "Tyson"	Mercado Belisario Domínguez s/n	pollo
43	Pollería	Mercado Belisario Domínguez andador 1	pollo
44	Pollería	Mercado Belisario Domínguez s/n	pollo
45	Pollería	Mercado Belisario Domínguez s/n	pollo
46	Carnicería "La Flor"	Mercado Belisario Domínguez s/n	cerdo y res
47	Carnicería "El Negrito"	Mercado San Antonio s/n	cerdo, res y pollo
48	Pollería "Roció"	Mercado San Antonio s/n	pollo
49	Pollería "Catedral"	Mercado San Antonio s/n	pollo
50	Carnicería "La Conchita"	Mercado San Antonio s/n	pollo
51	Carnicería "La Fortunita"	Mercado San Antonio s/n	cerdo, res y pollo
52	Carnicería "Los ángeles"	Mercado San Antonio local 2	cerdo y res
53	Carnicería "La Rosa Blanca"	Mercado San Antonio s/n	cerdo, res y pollo
54	Carnicería "La Poderosa"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y pollo
55	Carnicería "El Tapatío"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y res
56	Carnicería	Mercado San Antonio s/n	cerdo y res
57	Carnicería "La ternera"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y res
58	Pollería "Concha"	Mercado San Antonio s/n	pollo
59	Carnicería	Mercado San Antonio local 5	cerdo, res y pollo
60	Pollería "Arcos"	Mercado San Antonio s/n	pollo
61	Carnicería "San Juanita"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y res
62	Pollería "Cristóbal"	Mercado San Antonio s/n	pollo
63	Carnicería "El sabio"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y pollo
64	Carnicería "Cuzgar"	Mercado San Antonio s/n	cerdo y res
65	Pollería "Chela"	Mercado San Antonio s/n	pollo
66	Carnicería "La única"	Mercado San Antonio s/n	cerdo, res y pollo

	morenita"			pollo
67	Pollería "Mis Lupitas"		Fray Pedro de Gante s/n	pollo
68	Bodega Aurrera		16 de septiembre s/n, San Pablo	cerdo, res y pollo
69	Wal-Mart		Miguel Hidalgo esquina con José Ma. Morelos y Pavón "Patio Texcoco"	cerdo, res y pollo
70	Comercial Mexicana		Av. Arteaga, Centro, Texcoco	cerdo, res y pollo
71	Comercial Libramiento	Mexicana	Col. Emiliano Zapata y libramiento, Texcoco- lechería s/n	cerdo, res y pollo
72	Soriana		Av. Jiménez Cantú y Barranquilla, Col. El Ahuehuate	cerdo, res y pollo
73	Pollería		Fray Pedro de Gante esquina con Silverio Pérez	pollo
74	Pollería		Santa Úrsula núm. 262	pollo
75	Puesto 1		Tianguis	pollo
76	Puesto 2		Tianguis	cerdo, res y pollo
77	Puesto 3		Tianguis	cerdo y res
78	Puesto 4		Tianguis	pollo
79	Puesto 5		Tianguis	pollo
80	Puesto 6		Tianguis	cerdo, res y pollo
81	Puesto 7		Tianguis	cerdo, res y pollo
82	Puesto 8		Tianguis	cerdo y res
83	Puesto 9		Tianguis	cerdo, res y pollo
