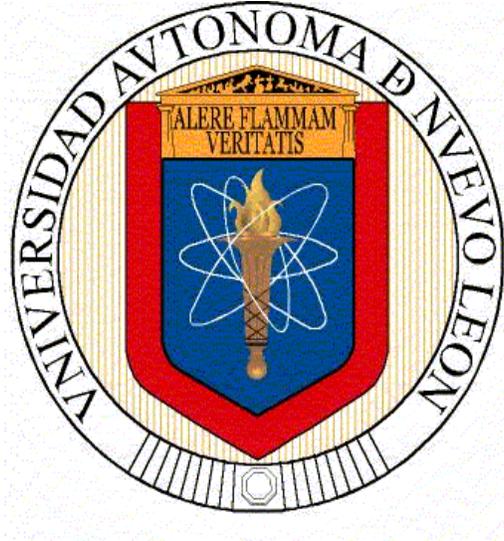


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PRESENCIA DE Salmonella EN CANALES DE BOVINO, ANÁLISIS  
DE SUS PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y DE  
SUS PROPIEDADES DE ADHESIÓN EN COMPARACIÓN CON LAS  
DE MICROORGANISMOS SUSTITUTOS**

**Por**

**M. C. JULIA AURORA PÉREZ MONTAÑO**

**Como requisito parcial para obtener el título de DOCTOR EN  
CIENCIAS con Especialidad en Microbiología**

**Diciembre, 2012**

**PRESENCIA DE Salmonella EN CANALES DE BOVINO, ANÁLISIS DE SUS  
PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y DE SUS  
PROPIEDADES DE ADHESIÓN EN COMPARACIÓN CON LAS DE  
MICROORGANISMOS SUSTITUTOS**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
**Presidente**

---

**Dra. Elisa Cabrera Díaz**  
**Secretario**

---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
**Primer Vocal**

---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**  
**Segundo Vocal**

---

**Dra. Ma. Refugio Torres Vitela**  
**Tercer Vocal**

---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
**Suplente**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la Dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, la Co-dirección de la Dra. Elisa Cabrera Díaz y la asesoría del M. C. Pablo Torres Morán.

Este trabajo fue financiado por el Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP, Proyecto No. 103.5/08/2918) y el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) de la UANL. La beca otorgada a la alumna Julia Aurora Pérez Montaña fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Número de becario 235785/220089).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios. Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por financiar este proyecto; así como a la Universidad de Guadalajara por permitirme superarme.

Quiero expresar todo mi agradecimiento a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y el Dr. José Santos García Alvarado por aceptarme en su programa y permitirme formar parte de la UANL, por sus enseñanzas, consejos, paciencia y apoyo en todo momento.

A la Dra. Elisa Cabrera Díaz por todo su apoyo para mi formación académica, por haber conseguido el apoyo PROMEP para la realización de esta investigación; y en especial por su guía, sus enseñanzas, paciencia y amistad.

Al M.C. Pablo Torres Morán por su valiosa asesoría, sus enseñanzas y su tiempo.

A las Dras. Lydia Rivera M., Licet Villarreal T., Ma. Refugio Torres V., Luisa Solís S. y Dr. Santos García A., por sus sugerencias y valiosas observaciones como miembros de mi Comité Tutorial y de Tesis.

Gracias a todos los alumnos del Laboratorio de Inocuidad de Alimentos que en diferentes momentos colaboraron y me brindaron su apoyo incondicional (Erika, Blanca, Chepis, Juan Manuel, Esaúl, Claudia, Ana y más). En particular gracias a Carlos Viveros, Rodrigo Nuño y Jorge Muñoz por todo su apoyo. También gracias especiales a los compañeros profesores que colaboraron en el proyecto, Delia González, Carlos Pacheco, Carlos Campos, Jeannette Barba, gracias por su compromiso y amistad.

Al personal del Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos, Luisa Solís, Sandra Castillo, Eduardo Sánchez, Fabiola Venegas, Nereida Rivera y Alma Solís, especialmente a Nydia Orué, gracias por su amabilidad, su apoyo y su amistad. Gracias al personal de la Subdirección de Posgrado, por sus orientaciones y amabilidad.

Gracias a mis amigas y compañeras por su motivación, apoyo y valiosos comentarios. A quienes me ayudaron a superar las dificultades, M.C. Manuel Rodríguez, Dr. Francisco Ramírez.

A mis padres, por su amor incondicional, hermanas y hermanos, sobrinas y sobrinos, a todos por su apoyo y estar siempre conmigo.

A mi esposo Raúl Ruíz N. por su apoyo, paciencia y comprensión. A mi hijo Raúl mi mayor motivación. A los dos por ceder, por compartir, por todo su cariño.

Finalmente a Dios por hacerme saber que siempre está ahí, gracias por todo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
NOMENCLATURA.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTEIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos particulares.....	5
4. JUSTIFICACIÓN.....	6
5. ANTECEDENTES.....	8
5.1 Salmonella: características generales.....	8
5.2 Importancia de Salmonella como causante de ETA.....	9
5.3 Reservorios de Salmonella.....	10
5.4 Resistencia antimicrobiana de Salmonella.....	12
5.5 Contaminación de la carne por Salmonella.....	14
5.6 Bacterias indicadoras de calidad sanitaria.....	17
5.7 Adhesión de microorganismos a la superficie de la carne.....	19
5.8 Microorganismos sustitutos para estudios de calidad microbiológica.....	20
5.9 Disminución de la carga microbiana de canales de bovino.....	22

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Determinación de la prevalencia de Salmonella en canales de bovino.....	27
6.1.1 Universo del estudio.....	27
6.1.2 Recolección de muestras.....	27
6.1.3 Aislamiento e identificación de Salmonella.....	29
6.1.3.1 Pre-enriquecimiento, enriquecimiento y post-enriquecimiento de las muestras.....	29
6.1.3.2 Prueba de ELISA.....	29
6.1.3.3 Aislamiento y pruebas bioquímicas presuntivas.....	30
6.1.3.4 Aglutinación somática.....	31
6.1.3.5 Pruebas bioquímicas complementarias.....	31
6.1.3.6 PCR multiplex.....	32
6.1.4 Serotipificación de los aislados.....	32
6.1.5 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	33
6.1.6 Análisis estadístico.....	34
6.2 Determinación de la concentración de bacterias indicadoras de calidad sanitaria.....	34
6.2.1 Muestras.....	34
6.2.2 Análisis Microbiológicos.....	34
6.2.3 Análisis estadístico.....	35
6.3 Comparación de las propiedades de adhesión entre los serotipos de Salmonella aislados y el grupo de cepas de E. coli biotipo I Previamente propuestas como organismos sustitutos.....	35
6.3.1 Cultivos de bacterias.....	35
6.3.2 Determinación de la hidrofobicidad.....	36
6.3.3 Determinación de la capacidad de Salmonella y E. coli biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes...	37
6.3.3.1 Experimentos preliminares.....	39
6.3.3.1.1 Recuperación de la biopelícula mediante hisopado versus vortex.....	39
6.3.3.1.2 Recuento biopelículas a diferentes tiempos de incubación.....	39
6.3.3.1.3 Comparación entre la utilización del caldo de cultivo con y sin reemplazo.....	40
6.3.3.2 Preparación del inóculo.....	40
6.3.3.3 Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable y látex.....	41
6.3.3.4 Cuantificación de biopelículas en poliestireno.....	42
6.3.3.5 Diseño experimental y análisis estadístico.....	42
6.4 Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I.....	43
6.4.1 Preparación de cepas e inóculo.....	43
6.4.2 Experimentos preliminares.....	44
6.4.2.1 Influencia del diluyente en la cantidad de bacterias	

recuperadas del músculo.....	44
6.4.2.2 Influencia del método de agitación en la recuperación de las bacterias adheridas al músculo.....	46
6.4.2.3 Determinación de la etapa del crecimiento de las bacterias.....	46
6.4.3 Obtención de las muestras de tejidos de la canal de bovino.....	47
6.4.4 Adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I a la superficie de tejidos de la canal de bovino.....	48
6.4.5 Determinación de la actividad de agua y humedad relativa durante la experimentación.....	50
6.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	50
6.5 Comparación de la capacidad de agentes surfactantes para remover a Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie de la canal de bovino.....	52
6.5.1 Experimentos preliminares.....	52
6.5.1.1 Efecto del SDS y Tween 20 sobre Salmonella inoculada en CST con y sin la inclusión de caldo neutralizante.....	52
6.5.1.2 Efecto del SDS y Tween 20 en la remoción de Salmonella adherida al músculo con y sin aplicación de masaje.....	53
6.5.2 Obtención de muestras y cortes de tejidos.....	54
6.5.3 Preparación de cultivos e inóculos.....	55
6.5.4 Capacidad del SDS y Tween 20 para remover a Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie de tejidos de la canal de bovino.....	55
6.5.5 Diseño de experimentos y análisis estadístico.....	56
7. RESULTADOS .....	58
7.1 Prevalencia y resistencia antimicrobiana de serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino.....	58
7.1.1 Prevalencia de Salmonella.....	58
7.1.2 Resistencia antimicrobiana.....	63
7.2 Determinación la concentración de bacterias indicadoras de calidad sanitaria en canales de bovino .....	64
7.2.1 Bacterias mesófilas aerobias.....	65
7.2.2 Coliformes totales.....	67
7.2.3 Escherichia coli.....	70
7.2.4 Potabilidad del agua para lavado de las canales.....	73
7.3 Comparación de las propiedades de adhesión entre serotipos de Salmonella y un grupo de cepas de Escherichia coli biotipo I Previamente propuestas como organismos sustitutos.....	74
7.3.1 Determinación de la hidrofobicidad.....	74
7.3.2 Capacidad de Salmonella y E. coli biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes.....	77
7.3.2.1 Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable.....	77
7.3.2.2 Cuantificación de biopelículas en látex.....	82

7.3.2.3 Comparación de la cantidad de biopelícula formada en acero inoxidable y látex.....	85
7.3.2.4 Cuantificación de biopelículas en poliestireno.....	88
7.3.2.5 Relación entre la hidrofobicidad (ABH) y la formación de biopelículas entre las cepas de Salmonella y E. coli biotipo I.....	91
7.4 Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de serotipos de Salmonella y de E. coli biotipo I.....	92
7.4.1 Resultados de experimentos preliminares.....	92
7.4.1.1 Influencia del diluyente en la cantidad de bacterias recuperadas del músculo.....	92
7.4.1.2 Influencia del método de agitación en la recuperación de las bacterias adheridas al músculo.....	93
7.4.1.3 Determinación de la etapa del crecimiento de las bacterias.....	93
7.4.2 Diferencia entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino.....	94
7.4.3 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino expresada en log UFC/cm <sup>2</sup> .....	95
7.4.4 Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de los grupos de cepas adheridas a los tejidos.....	95
7.4.5 Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y fuertemente adheridas en cada grupo de cepas.....	100
7.4.6 Cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino a TA versus TA-R-TA.....	101
7.4.7 Determinación de la actividad de agua y la humedad relativa durante la experimentación.....	101
7.5 Comparación de la capacidad de agentes surfactantes para remover Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie la canales de bovino.....	102
7.5.1 Estudios preliminares.....	103
7.5.1.1 Efecto del SDS y Tween 20 sobre Salmonella en caldo soya tripticasa con y sin inclusión de caldo neutralizante.....	103
7.5.1.2 Efecto de SDS y Tween 20 en la remoción de Salmonella adheridas al músculo con y sin aplicación de masajeo.....	103
7.5.2 Diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes.....	104
7.5.2.1 Tratamientos con SDS.....	104
7.5.2.2 Tratamientos con Tween 20.....	105
7.5.3 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes (expresadas en log UFC/cm <sup>2</sup> ).....	105
7.5.3.1 Tratamientos con SDS.....	105
7.5.3.2 Tratamientos con Tween 20.....	106

7.5.4	Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos tratados con surfactantes.....	107
7.5.4.1	Tratamientos con SDS.....	107
7.5.4.2	Tratamientos con Tween 20.....	107
7.5.5	Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y bacterias fuertemente adheridas a los tejidos tratados con surfactantes en cada grupo de cepas.....	110
7.5.6	Cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes a TA versus TA-R-TA.....	112
7.5.7	Comparación entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino en los experimentos con y sin tratamiento con surfactantes.....	112
8.	DISCUSIÓN.....	113
8.1	Prevalencia y resistencia antimicrobiana de serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino.....	113
8.1.1	Prevalencia de Salmonella.....	113
8.1.2	Resistencia antimicrobiana.....	115
8.2	Determinación de bacterias indicadoras de calidad sanitaria.....	117
8.2.1	Bacterias mesófilas aerobias.....	117
8.2.2	Coliformes totales.....	119
8.2.3	Escherichia coli.....	120
8.2.4	Potabilidad del agua para lavado de las canales.....	124
8.3	Comparación de las propiedades de adhesión entre serotipos de Salmonella aislados y un grupo de cepas de Escherichia coli biotipo I previamente propuestas como organismos sustitutos.....	124
8.3.1	Determinación de la hidrofobicidad.....	124
8.3.2	Capacidad de Salmonella y E. coli biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes.....	126
8.3.2.1	Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable.....	126
8.3.2.2	Cuantificación de biopelículas en látex.....	127
8.3.2.3	Comparación entre la cantidad de biopelícula formada en acero inoxidable y látex.....	127
8.3.2.4	Cuantificación de biopelículas en poliestireno.....	128
8.3.2.5	Relación entre la hidrofobicidad (ABH) y la formación de biopelículas entre las cepas de Salmonella y de E. coli biotipo I.....	129
8.4	Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de serotipos de Salmonella y de E. coli biotipo I.....	130
8.4.1	Diferencia entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino.....	130
8.4.2	Diferencias entre los grupos de cepas adheridas a los tejidos de la canal de bovino expresadas en log UFC/cm <sup>2</sup> .....	131
8.4.3	Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de los grupos de cepas adheridas a los tejidos.....	131

8.4.4 Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y bacterias fuertemente adheridas en cada grupo de cepas.....	133
8.4.5 Comparación entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal TA versus TA-R-TA.....	135
8.5 Capacidad de agentes surfactantes para remover Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie de canales de bovino.....	136
8.5.1 Diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con agentes surfactantes.....	136
8.5.2 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes expresadas en log UFC/cm <sup>2</sup> .....	136
8.5.3 Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino en los experimentos con y sin tratamiento con surfactantes.....	138
9. CONCLUSIONES.....	140
LITERATURA CITADA.....	141
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	162

## IISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Prevalencia de Salmonella en canales de bovino en establecimientos de Sacrificio.....	18
1. Relación y origen de cepas de Salmonella utilizadas en los estudios de hidrofobicidad <sup>a</sup> y de formación de biopelículas <sup>b</sup> .....	38
3. Frecuencia de Salmonella spp. en canales de bovino en cuatro rastros municipales en Jalisco, México.....	60
4. Serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino en cuatro rastros municipales en Jalisco, México.....	61
5. Diversidad de serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino por establecimiento.....	62
6. Fenotipos de multirresistencia de aislamientos de Salmonella recuperados de canales de bovinos.....	64
7. Recuentos de bacterias mesófilas aerobias (log UFC/cm <sup>2</sup> ) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco.....	65
8. Niveles de BMA en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco.....	66
9. Recuentos de coliformes totales (log UFC/cm <sup>2</sup> ) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco.....	68
10. Niveles de coliformes totales en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco.....	69
11. Recuentos de Escherichia coli (log UFC/cm <sup>2</sup> ) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco.....	71
12. Niveles de Escherichia coli en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco.....	72

13. Número más probable de organismos coliformes en agua para el lavado de canales de bovino en rastros municipales.....	74
14. Valores de hidrofobicidad determinados mediante el método de adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I.....	76
15. Recuento de Salmonella <sup>a</sup> y de Escherichia coli biotipo I en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	80
16. Recuento de Escherichia coli <sup>a</sup> biotipo I en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	81
17. Media del recuento de Salmonella <sup>a</sup> y de Escherichia coli biotipo I en superficies de acero inoxidable, látex y poliestireno incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	83
18. Valores de absorbancia a 550 nm de Salmonella <sup>a</sup> y E. coli biotipo I en superficie de poliestireno incubadas con caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	89
19. Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculados en diferentes tejidos de la canal de bovino y almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos.....	97
20. Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculados en diferentes tejidos de la canal de bovino y almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-Refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos.....	99
21. Estadística descriptiva para las determinaciones fisicoquímicas de los tejidos de canales de bovino bajo las condiciones de experimentación.....	102
22. Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) después de la aplicación de SDS para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos.....	108

23.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) después de la aplicación de SDS para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-Refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos.....	109
24.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) después de la aplicación de Tween 20 para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos.....	110
25.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S <sub>R</sub> ) después de la aplicación de Tween 20 para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-Refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos.....	111
26.	Límites de aceptabilidad de bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino en rastros municipales respecto al reglamento de la Unión Europea.....	119
27.	Niveles de Escherichia coli en canales de bovino para determinar la aceptabilidad en el control del proceso de obtención de la carne en canal en rastros municipales de Jalisco.....	123

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Esquema general de la metodología.....	26
2.	Áreas de muestreo superficial de la canal de bovino en el rastro para el aislamiento de Salmonella (USDA, 1996).....	28
3.	Toma de muestra superficial mediante frotación con esponja (USDA, 1996).....	28
4.	Toma de muestras de tejidos de la canal de bovino en el rastro: a) última vértebra, b) área del riñón y c) área del brazuelo.....	48
5.	Obtención de los cortes de tejidos de la canal de bovino: d) hueso, e) tendón, f) fascia, g) músculo y h) grasa.....	48
6.	Adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I a tejidos de la canal de bovino.....	51
7.	Capacidad de SDS y Tween 20 para remover Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a diferentes tejidos de la canal de bovino.....	57
8.	Distribución de los recuentos de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda.....	67
9.	Distribución de los recuentos de coliformes totales (CT) en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda.....	70
10.	Distribución de los recuentos E. coli en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda.....	73
11.	Valores promedio de la adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) de Salmonella y Escherichia coli biotipo I.....	75

12.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de biopelículas formadas por Salmonella y Escherichia coli en acero inoxidable después de incubar en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	79
13.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de acero inoxidable incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	82
14.	Medias (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de las cuentas de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y E. coli en superficies de látex incubadas en CST a 26°C durante 24 h y 7 días.....	84
15.	Medias (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de las cuentas de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de látex incubadas en CST a 26°C durante 24 h y 7 días.....	85
16.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y E. coli en superficies de acero y látex incubadas en CST a 26°C durante 24 horas.....	86
17.	Promedio de los recuentos (log UFC/cm <sup>2</sup> ) de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y E. coli en superficies de acero y látex incubadas en CST a 26°C durante 7 días.....	87
18.	Promedio de los valores (A <sub>550nm</sub> ) de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y E. coli en superficies de poliestireno incubadas en CST a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	90
19.	Promedio de los valores (A <sub>550nm</sub> ) de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de poliestireno incubadas en CST a 26°C durante 24 horas y 7 días.....	91
20.	Crecimiento Salmonella y E. coli durante los experimentos de adhesión a temperatura ambiente y temperatura alternada.....	94
21.	Fuerza de adhesión (SR) para cepas de Salmonella y E. coli en tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente durante 30 minutos (TA).....	96
22.	Fuerza de adhesión (SR) para cepas de Salmonella y E. coli en tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos (TA-R-TA).	98

## NOMENCLATURA

ATCC	Colección Americana de cultivos tipo
d	día (s)
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Hora
Log UFC/cm <sup>2</sup>	Logaritmo de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
p/v	relación peso/volumen
RFP	Proteína roja fluorescente
s	Segundos
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
v/v	relación volumen/volumen
YFP	Proteína amarilla fluorescente
%	por ciento, porcentaje
≤	menor o igual que
≥	mayor o igual que
±	más o menos
<	menor que
>	mayor que
°C	Grados centígrados
μl	microlitros

## RESUMEN

Algunos animales productores de alimentos pueden representar importantes reservorios de *Salmonella*. En México, este patógeno ha sido aislado de heces de ganado y canales de bovino en rastro, sin embargo la información disponible no es suficiente para estimar su prevalencia en las canales de bovino. Durante el procesamiento de la carne *Salmonella* puede adherirse a las superficies y formar biopelículas difíciles de remover, a partir de las cuales puede transferirse a la carne por mecanismos de contaminación cruzada. El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de *Salmonella* spp. en canales de bovino, caracterizar sus propiedades de resistencia antimicrobiana y de adhesión, y compararlas con organismos sustitutos no patógenos. Se aisló *Salmonella* a partir de 78 (15.4%) canales de bovino (n=505) en cuatro rastros municipales de Jalisco. Los serotipos más prevalentes fueron *Salmonella enterica* Give (24.4%), *Salmonella* Typhimurium (17.9%) y *Salmonella* Grupo B (14.1%). El mayor porcentaje de los aislamientos (46.2%) fueron resistentes a tetraciclina. La resistencia antimicrobiana fue más común en *Salmonella* Typhimurium, el 93% de los aislamientos de este serotipo fueron resistentes al menos a cinco antimicrobianos. Con respecto a las propiedades de adhesión, en las tres superficies estudiadas (acero inoxidable, látex y poliestireno) se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de biopelícula formada por *Salmonella* y *E. coli* después de 24 horas y 7 días. Los valores de biopelículas de *E. coli* quedaron comprendidos en los rangos observados para *Salmonella*. Los serotipos de *Salmonella* con mayor capacidad para producir biopelículas en las tres superficies fueron *S. Bovismorbificans* y *S. Give*. Se investigó la influencia de la topografía y composición superficial de la canal en el grado de adhesión de *Salmonella* y *E. coli* inoculadas en músculo, fascia, tendón, grasa y hueso almacenados a temperatura ambiente (TA) y temperatura alternada (TA-R-TA). No se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la fuerza de adhesión (SR) de *Salmonella* y *E. coli* en todos los tejidos y temperaturas por lo que la topografía y composición superficial de los tejidos no influyó en la adhesión de las bacterias. Se comparó la capacidad de agentes surfactantes para remover *Salmonella* y *E. coli* adheridas a la superficie de músculo, fascia y hueso después de almacenar los tejidos inoculados a TA y TA-R-TA. La fascia fue el tejido con el menor porcentaje ( $P \leq 0.05$ ) de bacterias fuertemente adheridas. No hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre los

valores de SR de Salmonella y E. coli después de los tratamientos con surfactantes. Es necesario adoptar medidas para reducir la prevalencia de Salmonella en canales de bovino en rastros municipales y estrategias para controlar la propagación de patógenos resistentes a los antibióticos. El grupo de cepas de E. coli biotipo I mostraron propiedades de adhesión similares a Salmonella, por lo que tienen potencial para ser utilizadas como sustitutos del patógeno en la validación de tratamientos de descontaminación de canales de bovino.

## ABSTRACT

Some food producing animals may represent important *Salmonella* reservoirs. In Mexico, this pathogen has been isolated from cattle feces and beef carcasses at abattoir; however the information available is not enough to estimate its prevalence on beef carcasses. During the processing of the meat *Salmonella* can adhere to the surfaces forming biofilms difficult to remove, from which it can be transferred to the meat through cross contamination mechanisms. The purpose of this study was to investigate the prevalence of *Salmonella* spp. on beef carcasses, to characterize its antimicrobial resistance and adhesion properties, and to compare them to nonpathogenic surrogate organisms. *Salmonella* was isolated from 78 (15.4%) beef carcasses (n=505) at four municipal abattoirs from Jalisco. The most prevalent serotypes were *Salmonella enterica* Give (24.4%), *Salmonella* Typhimurium (17.9%) y *Salmonella* Grupo B (14.1%). The highest percentage (46.2%) of isolates was resistant to tetracyclin. Antimicrobial resistance was more common in *Salmonella* Typhimurium, and 93% (13 of 14) of the isolates of this serotype were resistant to at least five antimicrobials. Regarding to the adhesion properties, there were observed differences ( $P \leq 0.05$ ) on the three inert studied surfaces (stainless steel, latex and poliestirene) on the quantity of formed biofilm by *Salmonella* and *E. coli* after 24 h and 7 days. The *E. coli* biofilm values were included within the ranges for *Salmonella*. The *Salmonella* serotypes with better ability to produce biofilms on the three surfaces were *S. Bovismorbificans* y *S. Give*. It was studied the influence of the topography and superficial composition on the degree of adhesion of *Salmonella* and *E. coli* inoculated on muscle, fascia, tendon, fat and bone stored to environment temperature (TA) and on alternate temperature (TA-R-TA). There were no observed differences ( $P \geq 0.05$ ) between the strength of adhesion (SR) of *Salmonella* and *E. coli* in all tissues and temperatures so that the topography and superficial composition of the tissues did not influence the adhesion of bacteria. The ability of surfactants agents was compared to remove *Salmonella* and *E. coli* adhered to the surface of muscle, fascia and bone after the storage of the inoculated tissues to TA and TA-R-TA. Fascia was the tissue with less percentage ( $P \leq 0.05$ ) of strongly attached bacteria. There were no differences between the SR values of *Salmonella* and *E. coli* after the treatments with surfactants. Action is needed to reduce the prevalence of

Salmonella on beef carcasses in municipal abattoirs and strategies to control the spread of resistant pathogens to antimicrobials. The group of strains of *E. coli* biotype I showed similar adhesion properties to *Salmonella*, so they have the potential to be used as surrogates of the pathogen on the validation of decontamination treatments of beef carcasses.

## 1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es una de las bacterias patógenas más importantes en todo el mundo. En Estados Unidos de América (EUA), los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recientemente estimaron que Salmonella no tifoidea es responsable de aproximadamente un millón de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) cada año (11% del total reportado) y es la principal causa de hospitalizaciones (35% del total) y de muertes (28% del total) (Scallan et al., 2011). En México, Salmonella es el patógeno bacteriano más comúnmente citado como causa de infecciones gastrointestinales y un total de 120,414 casos de salmonelosis fueron reportados en 2010 al Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control del Enfermedades (Secretaría de Salud, 2010).

El principal reservorio de Salmonella son los animales productores de alimentos (Callaway et al., 2008), el patógeno puede ser transmitido del contenido intestinal y piel de los bovinos a las canales durante el proceso de sacrificio y faenado (Barkocy-Gallagher et al., 2003). La prevalencia de Salmonella en canales de bovino en EUA ha sido reportada que va del 1.4 al 58.0% en la etapa de pre-evisceración y antes de la aplicación de intervenciones antimicrobianas en EUA (Beach et al., 2002; Bosilevac et al., 2009; Sofos et al., 1999a). En otros estudios realizados en el mismo país, se estimó que las canales de bovino que recibieron tratamientos antimicrobianos pre- o post-evisceración, tuvieron una prevalencia de Salmonella entre 0.0 y 3.0% (Bacon et al., 2002; Rivera-Betancourt et al., 2004; Sofos et al., 1999b). En un estudio previo realizado en un rastro municipal en nuestro país (Estado de Hidalgo), Salmonella fue encontrada en el 14% de las canales de bovino que no habían recibido tratamientos antimicrobianos (Hernández-San Juan et al., 2007). Sin embargo, no existe suficiente información disponible para estimar la prevalencia de Salmonella en canales de bovino en México, de ahí el presente trabajo.

La serotipificación ofrece una oportunidad para poder establecer una probable asociación entre las cepas de Salmonella presentes en alimentos de origen animal y en casos humanos de salmonelosis (USDA, 2011b; van Duijkeren et al., 2002). En Estados Unidos durante el 2009, los serotipos de Salmonella más comúnmente aislados de canales de bovino fueron S. Montevideo, S. Give y S. Newport (USDA, 2011b). En contraste, S. Enteritidis, S. Typhimurium y S. Newport fueron los serotipos más frecuentemente aislados de infecciones humanas durante el mismo año (CDC, 2010). En México, S. Anatum, S. Meleagridis, S. Agona y S. Typhimurium fueron los serotipos más comúnmente encontrados en el ganado bovino y carne de res al menudeo del 2000 al 2005 (Zaidi et al., 2006, 2008) y S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Typhi, y S. Agona fueron los serotipos más comúnmente aislados de infecciones humanas de 1972 a 1999 (Gutierrez-Cogco et al., 2000).

La emergencia de aislamientos de Salmonella multirresistentes, entre los animales y humanos ha sido documentada y representa un problema de salud pública. Algunos reportes han indicado que el uso de antimicrobianos en la producción animal para el tratamiento enfermedades, la profilaxis y para la mejora del crecimiento promueven la selección de bacterias resistentes, aunque el impacto de estos usos en la salud humana no está claramente entendido (Mathew et al., 2007; WHO, 2008). La resistencia de bacterias patógenas a los antimicrobianos utilizados en la terapia humana puede resultar en una disminución de la eficacia de esos fármacos contra infecciones y puede subsecuentemente amenazar la salud pública. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2008), los programas de vigilancia son necesarios para monitorear la prevalencia y resistencia antimicrobiana de aislamientos de Salmonella de animales, humanos y alimentos. Estos programas pueden ser útiles para desarrollar políticas de salud pública para la regulación de los medicamentos utilizados en animales productores de alimentos y diseñar medidas de control para evitar la propagación de bacterias multirresistentes (Whichard et al., 2010; WHO, 2008).

Por otra parte, durante el procesamiento de los alimentos, las bacterias patógenas se pueden adherir a las superficies con la subsecuente formación de biopelículas, representando un problema ya que son difíciles de remover y pueden reducir la eficacia de los tratamientos de sanitización. (Young, 2006). Las biopelículas pueden influir en la persistencia de las bacterias durante el procesamiento de alimentos y servir como fuentes potenciales de contaminación, con ello provocar el deterioro de los alimentos o transmisión de enfermedades (Poulsen, 1999). En el proceso de adhesión entre los microorganismos y las superficies vivas o inertes interactúan fuerzas de atracción, interacciones hidrofóbicas y adhesivos de la superficie bacteriana como flagelos, fimbrias y adhesinas no fimbriales. La carga eléctrica y la hidrofobicidad de la superficie bacteriana se han relacionado con su capacidad de adherirse a las superficies (Liu et al., 2004).

También se ha encontrado que la topografía superficial del alimento juega un papel importante en la adhesión. La superficie irregular, topografía y composición de las canales de bovino varía según el tejido que compone las diferentes áreas de la canal; algunas facilitan grandemente esta adhesión tales como el tejido muscular (Bouttier et al., 1997; Dickson and Koohmaraie, 1989; Medina, 2004). Debido a lo anterior resulta muy importante encontrar métodos para reducir la adhesión, remover y destruir las bacterias patógenas adheridas a la superficie de las canales y con ello mejorar la calidad microbiológica e inocuidad de la carne de bovino. Realizar estos estudios utilizando organismos sustitutos de patógenos (Busta et al., 2003) permitirá su aplicación para validar la eficacia de tratamientos para el control de patógenos en los rastros, ya que pueden representar su reducción bajo condiciones de operación comercial y en donde no se pueden introducir patógenos por cuestiones de bioseguridad. La utilización de cepas de *E. coli* biotipo I como sustitutos de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 fue propuesta en la validación de tratamientos con agua caliente y ácido láctico en canales de bovino (Cabrera-Diaz et al., 2009; Marshall et al., 2005) ya que mostraron propiedades de resistencia térmica y al ácido láctico similares a las bacterias patógenas. Por ello se consideró que podrían ser utilizadas también en la aplicación de tratamientos con agentes surfactantes para facilitar la remoción de *Salmonella* en la superficie de canales y en un futuro validar estos tratamientos en instalaciones comerciales.

## **2. HIPÓTESIS**

Diversos serotipos de Salmonella resistentes a antimicrobianos contaminan las canales de bovino que se producen en Jalisco; estos serotipos poseen propiedades de adhesión similares a las de aislamientos de Escherichia coli biotipo I propuestos como sustitutos del patógeno y pueden ser removidos de la superficie de la canal utilizando agentes surfactantes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Investigar la presencia de *Salmonella* spp. en canales de bovino y caracterizar sus propiedades de resistencia antimicrobiana, así como de adhesión comparándolas con las de organismos sustitutos no patógenos.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- 1.** Determinar la presencia y patrones de resistencia antimicrobiana de serotipos de *Salmonella* aislados de canales de bovino.
- 2.** Determinar la concentración de bacterias indicadoras de calidad sanitaria en canales de bovino en rastros.
- 3.** Comparar las propiedades de adhesión entre serotipos de *Salmonella* aislados de canales de bovino y cepas de *Escherichia coli* biotipo I previamente propuestas como organismos sustitutos.
- 4.** Estudiar la influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de serotipos de *Salmonella* y de *E. coli* biotipo I.
- 5.** Comparar la capacidad de agentes surfactantes para remover *Salmonella* y *E. coli* biotipo I de la superficie de canales de bovino.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Jalisco es uno de los principales estados ganaderos del país. En 2010 contó con un inventario de 2'620,863 cabezas de bovino para carne representando el tercer lugar nacional después de Veracruz y Chiapas (SIAP, 2010). En producción de carne de bovino, la entidad ocupó el segundo lugar nacional en 2008 con el 10.81% (180,292 ton) de la producción nacional (SAGARPA, 2010). Por lo anterior, resulta muy importante desarrollar un estudio que aporte información sobre la presencia y características de patógenos zoonóticos como Salmonella en una de las principales zonas ganaderas del país, ya que la información disponible en la actualidad es escasa (Hernández-San Juan et al., 2007; Zaidi et al., 2008; Zaidi et al., 2006). Al realizar el estudio sobre la contaminación por Salmonella en canales de bovino producidas en la entidad es posible identificar los serotipos de Salmonella más frecuentes en este punto de la cadena de producción y determinar sus patrones de resistencia antimicrobiana, así como conocer la magnitud de la presencia de cepas multirresistentes que pueden llegar al consumidor a través de la carne de res con un impacto en la salud pública. Todo ello permitirá contribuir al estudio de la epidemiología del patógeno en nuestro medio.

La presencia de Salmonella en las canales de bovino representa uno de los mayores retos para la industria de la carne en lo que a inocuidad se refiere. Resulta útil estudiar algunas de las propiedades de adhesión de los serotipos de Salmonella más prevalentes en este alimento y compararlas con las de cepas de E. coli biotipo I que ya han sido previamente propuestas como sustitutos del patógeno para la validación de tratamientos antimicrobianos. Es importante determinar si estas cepas también pueden ser utilizadas para la validación de tratamientos que tengan por objeto facilitar la remoción del patógeno en superficies de la canal de bovino, al responder de manera similar ante estos tratamientos. Resulta también importante estudiar la influencia que ejercen la topografía y la composición superficial de la canal de bovino en la adhesión y

remoción del patógeno y de los organismos propuestos como sustitutos, además describir aspectos significativos de la interacción superficial patógeno-alimento que deban ser tomados en consideración para el desarrollo de tratamientos eficaces para su remoción o inactivación, así como para el desarrollo de procedimientos que validen la eficacia de dichos tratamientos.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Salmonella: características generales

Salmonella es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae que es generalmente móvil, aerobio o anaerobio facultativo. Típicamente las salmonelas catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas, son oxidasa y catalasa negativas, generalmente producen sulfuro de hidrógeno, descarboxilan la lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea. Se reconocen biotipos o biovares, esto debido a que existen diferencias en las reacciones bioquímicas de algunas cepas, pertenecientes incluso al mismo serotipo (cepas ornitina negativa o lactosa positiva). Contiene una gran cantidad de antígenos, los cuales son somáticos (O), de naturaleza polisacárida y flagelares (H), de origen proteico (Fernández-Escartín, 2008) y Vi (capsular), este último contenido solamente en S. Typhi, S. Dublin y algunas cepas de S. Paratyphi C. Los miembros de este género son móviles por flagelos peritricos, pero existen serotipos inmóviles que carecen de flagelos, tales como Salmonella enterica serotipo Pullorum y S. enterica serotipo Gallinarum y cepas no móviles como resultado de flagelos disfuncionales (D'Aoust et al., 2001). También se observan en algunos serotipos diferencias en la susceptibilidad a las lisis por fagos. Todos los anteriores son empleados como base para su identificación en serotipos, biotipos y fagotipos respectivamente. Además para estos fines también son útiles para refinar la identificación, la producción de bacteriocinas y el perfil de plásmidos, así como las pruebas moleculares (Fernández-Escartín, 2008).

La nomenclatura del género Salmonella ha progresado a través de esquemas taxonómicos basados en pruebas bioquímicas y características serológicas propuestas originalmente por Kauffmann-White y en principios de taxonomía numérica y homología del DNA (CDC, 2008; D'Aoust et al., 2001). El CDC adoptó como oficial el esquema propuesto por la OMS para la nomenclatura del género Salmonella, el cual

contiene dos especies con una variedad de serotipos cada una: *S. enterica* y *S. bongori*, que anteriormente era subespecie V. *Salmonella enterica* se subdivide en seis subespecies, referidas con números romanos y un nombre (I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae* y VI, *S. enterica* subsp. *indica*) (Brenner et al., 2000; CDC, 2004). Las subespecies de *S. enterica* se diferencian bioquímicamente y por relaciones genómicas. En la subespecie I, el CDC usa los nombres para serotipos y las fórmulas antigénicas para serotipos no nombrados descritos después de 1966 en las subespecies II, IV y VI (Brenner et al., 2000; CDC, 2008). En la subespecie I se encuentran los serotipos que causan enfermedad en humanos y animales de sangre caliente como *S. enterica* serotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Paratyphi, Choleraesuis, Sendai y Abortusovis. En las subespecies II a VI se ubican los serotipos aislados de animales de sangre fría y del ambiente. *S. bongori* se sitúa en la subespecie V (Brenner et al., 2000; Fernández-Escartín, 2008).

Con respecto a las condiciones para su desarrollo, la temperatura óptima es de 37°C, algunas cepas muestran capacidad para crecer en alimentos almacenados a 2-4°C, otras pueden crecer a temperaturas elevadas ( $\leq 54^{\circ}\text{C}$ ). Valores cercanos a la neutralidad son más favorables para su multiplicación activa, sin embargo se ha demostrado su adaptabilidad fisiológica para proliferar a valores de pH de 4-5 y hasta 9.5 (D'Aoust et al., 2001). El pH mínimo para desarrollarse es afectado por la naturaleza del ácido, serotipo, temperatura de incubación, entre otras condiciones. La actividad de agua (Aa) óptima para su desarrollo es alrededor de 0.99, siendo 0.93 su límite mínimo para desarrollar, aunque el microorganismo es inhibido generalmente en presencia de 3-4% de NaCl (D'Aoust et al., 2001).

## **5.2. Importancia de Salmonella como causante de ETA**

Las infecciones causadas por *Salmonella* en humanos y animales representan un problema mayor de salud pública en todo el mundo. Algunos serotipos como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* están altamente adaptados a humanos, mientras que los serotipos no

tifoideos tienen una diversidad de reservorios animales (Chiu et al., 2004a, b). En EUA se estima un millón de casos anuales de enfermedad por *Salmonella* no tifoidea (11% del total reportado) y son la principal causa de hospitalizaciones (35% del total) y de muertes (28% del total) (Scallan et al., 2011). Los vehículos más comunes fueron huevo, carnes de pollo, bovino y cerdo, productos lácteos, frutas y hortalizas (CDC, 2006). Se considera que el número de brotes y casos reportados representa solo una pequeña proporción de los que realmente ocurren debido a fallas en los sistemas de identificación y notificación. De acuerdo con datos de la Secretaría de Salud de México, el número total de casos de salmonelosis reportados al Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades en 2010 fue de 120,414 (Secretaría de Salud, 2010). Según Zaidi et al. (Zaidi et al., 2006), en México no se cuenta con estadísticas nacionales certeras de infecciones por *Salmonella*, ya que con frecuencia el diagnóstico se basa solo en el cuadro clínico del paciente, sin estudios microbiológicos para la obtención de un diagnóstico completo.

### **5.3. Reservorios de *Salmonella***

El hábitat de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos, animales de granja, aves, reptiles e insectos. Las tasas de prevalencia de *Salmonella* en pollos varían mucho, se ha reportado en EUA, Canadá y Japón valores que van del 4.3 al 30% (Arsenault et al., 2007; Bailey et al., 2001; Siemon et al., 2007); mientras que en cerdos la prevalencia ha sido reportada entre 3.4 y 54% (Duggan et al., 2010; Funk et al., 2001; Hurd et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Vieira-Pinto et al., 2006). En México, *Salmonella* ha sido aislada del 17% de muestras de contenido intestinal de pollos (Zaidi et al., 2008); del 42 al 53% del contenido intestinal de cerdos (Rodriguez-Buenfil et al., 2006; Zaidi et al., 2008) y del 27% de nódulos linfáticos de cerdos al momento del sacrificio (Talavera-Rojas et al., 2007). En nuestro país, se ha aislado también de muestras de materia fecal de pollos (39.6%), vacas (32.5%) y borregos (25.0%) (Jimenez et al., 2010). La mayor cantidad de estudios en nuestro país, han sido enfocados al estudio en pollos y cerdos como reservorios, pero es limitada la información que existe sobre la prevalencia del patógeno en ganado bovino.

En EUA se documenta constantemente la prevalencia de Salmonella en bovinos a fin de medir el impacto de las medidas de control implementadas desde la crianza hasta el sacrificio. En ese país, el patógeno ha sido recuperado del 4.4% de las muestras fecales de bovinos en tres plantas de sacrificio ubicadas en el Medio Oeste (Barkocy-Gallagher et al., 2003), del 6.3% de las muestras fecales recolectadas de bovinos en 73 ganaderías localizadas en 12 estados (Dargatz et al., 2003), del 18% de las muestras fecales obtenidas en una granja de gran capacidad (>65,000 cabezas) y del 46% de las heces de los bovinos procedentes de la misma granja cuando arribaron al rastro (Barham et al., 2002). En un estudio realizado en ese país en un tamaño pequeño de muestras (n=50) se reportó Salmonella en el 70% de las muestras rectales (Bischoff et al., 2004). En otros países como Australia, Irlanda del Norte y Gran Bretaña, Salmonella ha sido aislada del 6.8%, del 3% y 5.3% de las muestras fecales de bovinos recolectadas en rastros, respectivamente (Arthur et al., 2007; Davies et al., 2004; Fegan et al., 2004; Madden et al., 2007).

Se ha establecido que la piel de los bovinos muestra una alta frecuencia de esta bacteria y esto se puede deber a la contaminación de los animales en los corrales y durante el transporte debido a la falta de prácticas higiénicas en la granja y durante el transporte y el descanso de los animales en el rastro, que permiten la contaminación de la piel de los bovinos y ésta a su vez constituye una fuente de contaminación a las canales durante el proceso de sacrificio. Apoyando esta afirmación se ha aislado a Salmonella del 40% al 89.6% de la piel de bovinos presentados para sacrificio (Arthur et al., 2007; Barkocy-Gallagher et al., 2003; Brichta-Harhay et al., 2008; Rivera-Betancourt et al., 2004) y se ha demostrado que su presencia aumenta durante el transporte de los animales (Barham et al., 2002). En México los pocos estudios relacionados con bovinos han reportado la presencia de Salmonella en el 21% de las muestras de contenido intestinal de los animales en el rastro (Zaidi et al., 2008). Aunque esta frecuencia de aislamiento es mayor a la reportada en otros países, es necesario realizar más estudios para determinar la importancia de los bovinos como reservorios de Salmonella, pero sobre todo, con un enfoque que permita estudiar los factores que

influyen en su presencia y distribución para poder proponer medidas de control acordes a nuestra realidad.

#### **5.4. Resistencia antimicrobiana de Salmonella**

Además de la importancia que tiene la presencia de Salmonella en los alimentos, existe preocupación por el impacto a la salud pública que implica la capacidad de resistencia a antibióticos presente en el microorganismo. Numerosos estudios han revelado un rápido aumento en la incidencia de la resistencia antimicrobiana e incluso la emergencia de cepas multirresistentes de Salmonella proveniente de animales y alimentos de origen animal (CDC-NARMS, 2012a; EFSA-ECDC, 2012; Hur et al., 2012; Institute of Medicine, 1998) y humanos (CDC-NARMS, 2012b; Molbak et al., 1999). La OMS destacó el preocupante aumento en la incidencia de cepas resistentes de Salmonella y publicó una estrategia mundial para contener la resistencia antimicrobiana (WHO, 2001).

En EUA se estableció en 1996 el Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana para Bacterias Entéricas (NARMS, por sus siglas en inglés), como un esfuerzo de colaboración entre el CDC, FDA y USDA (CDC-NARMS, 2006). El sistema de vigilancia inició para monitorear los cambios en las susceptibilidades de patógenos zoonóticos en animales, productos animales y humanos. En el 2003, en su reporte anual, el CDC reportó una tendencia en la resistencia a antimicrobianos clínicamente importantes (por ejemplo, fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación); 2% de los aislamientos de Salmonellas no Typhi en ese año fueron resistentes a la cefalosporina de tercera generación y al ceftiofur (una droga animal) comparados con el 0.2% en 1996. La resistencia a la ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación), se incrementó de cero en 1996 a 0.4% en 2003 (IFT, 2006). En 2010, el NARMS reportó que el 2.0% de los aislamientos de Salmonella no tifoidea fueron resistentes al ácido nalidíxico y el 2.8% a la ceftriaxona (CDC-NARMS, 2012b). El serotipo de Salmonella más reconocido en enfermedades animales y de humanos es S. Typhimurium y de particular preocupación es el incremento de aislamientos de S. Typhimurium multirresistente a fármacos (denominados MDR) incluyendo el fagotipo

definitivo 104 (denominado DT104). Esta cepa es normalmente resistente a por lo menos cinco agentes antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina, perfil de resistencia denominado ACSSuT y su prevalencia en *S. Typhimurium* se incrementó de 0.6% en 1979-1980 a 34% en 1996 en EUA (IFT, 2006).

Este aumento en la resistencia ha sido atribuido en parte al uso de antibióticos en la cría intensiva de ganado para promover el crecimiento y mejorar la conversión alimenticia. Se ha establecido que la administración de antibióticos a los animales a través de los piensos, se realiza con un doble fin: como terapia antibiótica donde se administra el fármaco en concentraciones relativamente elevadas, lo cual no se hace en forma adecuada; o bien, como aditivo para promover el crecimiento animal en concentraciones subterapéuticas, para favorecer el control de la microbiota bacteriana y con ello lograr una mayor aprovechamiento de los nutrientes y aumento considerable del peso (APUA, 2010; Cancho Grande, 2000; WHO, 1997). Desafortunadamente la mayoría de los antibióticos usados en alimentos para animales también son usados para tratar enfermedades humanas, ejemplos de ellos son: las tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas, macrólidos, fluoroquinolonas, cefalosporinas, aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina), cloranfenicoles y estreptograminas (Alcaine et al., 2007; IFT, 2006). La utilización de antibióticos en la crianza animal con naturaleza química similar a los usados en humanos, con desarrollo potencial de resistencia a los antibióticos de uso humano (WHO, 2002). Además, está bien establecido que el uso prolongado de antimicrobianos en bajas concentraciones presenta el riesgo de no destruir completamente a las bacterias patógenas y por consecuencia, promover la selección de poblaciones resistentes. Los genes de resistencia pueden transmitirse de una bacteria a otra (Mathew et al., 2007) y la preocupación aumenta en aquellos casos en donde existen pocos antimicrobianos disponibles para el tratamiento de patógenos resistentes. Con todo esto, se ha favorecido la liberación al medio ambiente de bacterias resistentes con potencial zoonótico como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Enterococcus* spp., además de que en los piensos medicados se puede originar la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano, con

consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas e incluso la muerte (Cancho Grande, 2000; WHO, 2008).

La información disponible en México sobre patrones de resistencia a antimicrobianos en cepas de Salmonella aún es limitada. Flisser et al (Flisser et al., 2002) reportaron un incremento en el porcentaje de aislamientos multirresistentes de *S. Typhimurium* de 1990 a 1999 en nuestro país. Por otro lado, se realizó un estudio con 17 diferentes serotipos de Salmonella aislados de carnes crudas y muestras clínicas en Yucatán en donde se encontró resistencia a estreptomycin (73.6%), tetraciclina (72.1%), sulfisoxazol (45.9%), ácido nalidíxico (26.9%), trimetoprim-sulfametoxazol (19.7%), ampicilina (14.6%) y cloranfenicol (14%) (Zaidi et al., 2006).

De acuerdo con recomendaciones emitidas por la OMS (WHO, 2001), es necesario implementar programas para monitorear la resistencia antimicrobiana de patógenos como Salmonella y Campylobacter aislados de animales, alimentos y humanos debido a que los datos derivados de estos estudios juegan un papel clave en el desarrollo de políticas para reducir el problema del incremento de la resistencia antimicrobiana en estos microorganismos.

### **5.5. Contaminación de la carne por Salmonella**

La carne cruda y los productos cárnicos históricamente han sido importantes vehículos de patógenos como Salmonella, Escherichia coli O157:H7, Campylobacter y Listeria monocytogenes. Según el Departamento de Agricultura de EUA (USDA, por sus siglas en inglés), se estima que la contaminación de la carne con estos patógenos genera 5 millones de casos de enfermedad y 4,000 muertes cada año en ese país (USDA, 1996). De acuerdo con el CDC, la carne de bovino es uno de los vehículos más comunes de ETA y durante el periodo 1993-2002 se relacionó con 274 brotes, 7,394 casos y 9 muertes, destacando la participación de Salmonella en 23 de estos brotes (CDC, 2000, 2006).

El sistema de vigilancia epidemiológica en nuestro país no identifica de manera sistemática los brotes de ETA y sus agentes etiológicos, por lo tanto no existen estadísticas al respecto. A través de reportes aislados en la literatura se conocen brotes de salmonelosis por consumo de birria de ternera, puré de papa, tortas y pastel de tres leches (Fernández-Escartín, 2008).

Las bacterias patógenas se transfieren a la carne durante el proceso de sacrificio en los rastros. La contaminación de las canales puede ocurrir por contacto con el contenido intestinal o la piel del animal, o bien, por contacto con canales contaminadas adyacentes, equipo contaminado o trabajadores. Son muchos los estudios que señalan a la piel contaminada y su correlación con la contaminación de las canales durante el proceso (Arthur et al., 2007; Elder et al., 2000; McEvoy et al., 2000). En un estudio realizado por Stephens et al (Stephens et al., 2007) en la piel de novillos encontraron que la distribución de *Salmonella* en las diferentes áreas fue: espalda (76%), flanco (74%), corvejón (94%), cuello (76%), perineo (88%), área ventral (86%), cavidad oral (94%), hisopos de la juntura rectal-anal (64%) y 50% para muestras fecales. En otro estudio se reportó la prevalencia de *Salmonella* en la piel de los animales en diferentes etapas del proceso de sacrificio, 87.5% en el área de pesado durante el arribo de los animales, 71.4% en los corrales de descanso y 75% en el área de insensibilización (Arthur et al., 2008).

Las canales pueden contaminarse con *Salmonella* durante el sacrificio. Para poder diseñar controles efectivos para *Salmonella* es necesario entender como el patógeno es transportado por el ganado y su transferencia durante la transformación de las canales (Fegan et al., 2005). La prevalencia en las canales del ganado bovino varía dependiendo del país, el número de muestras analizadas, el método empleado, la época del año, el apego a las buenas prácticas higiénicas, la aplicación o no de intervenciones antimicrobianas, etc. (Tabla 1). De acuerdo con datos del USDA, la prevalencia de *Salmonella* en canales de bovino muestreadas en las cámaras de enfriamiento de rastros fue del 1.0% y 1.2%, durante 1992-1993 y 1997-1998 respectivamente (USDA, 1994, 1999). En su reporte anual de monitoreo el USDA reportó en 2009 la prevalencia de

Salmonella en carne de bovino: vacas/toros (0.6%), novillos/vacas (0.2%), carne molida de res (1.9%). Para 2010 su prevalencia fue: vacas/toros (0.5%), novillos/vacas (0.1%), carne molida de res (2.2%) (USDA, 2010, 2011a). En otros estudios de ese país, Salmonella fue aislada del 12.7, 23.3 y 26.8% de las canales de bovino muestreadas antes de la evisceración y del 0.8% de las canales antes de entrar en las cámaras de refrigeración (Tabla 1) (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Rivera-Betancourt et al., 2004). La menor frecuencia observada en las canales refrigeradas se debe a la aplicación de tratamientos antimicrobianos en las canales entre los que se incluyen lavados con agua caliente, pasteurización con vapor y/o enjuagues con ácidos orgánicos, entre otros (Arthur et al., 2008; Carlson et al., 2008; Castillo et al., 1998b).

Aunque no ha sido investigada ampliamente, la prevalencia de Salmonella en el contenido intestinal de bovinos en nuestro país, ha sido reportada en un 20.9% (Zaidi et al., 2008). Con esta elevada prevalencia y debido a que no es común la aplicación de tratamientos antimicrobianos, podría esperarse una alta prevalencia de Salmonella en las canales de bovinos, punto de ingreso del patógeno a la cadena de producción de alimentos. Estudios al respecto han mostrado que Salmonella ha sido aislada hasta en un 65% de las muestras de carne de bovino recolectadas en carnicerías de la ciudad de Guadalajara (Fernández-Escartín, 2008), mientras que en Guerrero el patógeno fue aislado entre el 25.7 y 40.7% de diferentes tipos de carne cruda expendida en ese estado (Bello-Perez, Abarca-Mateos, 1991). En Yucatán, Salmonella fue aislada en el 58.1, 54.0 y 39.7% de las muestras recolectadas en expendios de carne de cerdo, bovino y pollo, respectivamente (Zaidi et al., 2006).

Es posible que la frecuencia de Salmonella en carne cruda en puntos de venta esté relacionada con las prácticas higiénicas durante el proceso de obtención de la carne, sin embargo, puede también obedecer a las diversas fuentes y mecanismos de contaminación que operan durante su distribución y comercialización (Fernández-Escartín, 2008). De cualquier manera, la alta prevalencia de Salmonella observada en carne cruda en nuestro país pone de manifiesto un problema de inocuidad que posiblemente inicia con la contaminación de las canales durante el proceso de sacrificio.

Diagnosticar la problemática de Salmonella en la carne en rastros, como una parte de la cadena de producción de este alimento, permitirá identificar los mecanismos de contaminación que operan y proponer medidas de control más adecuadas. Así mismo mantener actividades de monitoreo a lo largo del tiempo permite evaluar el impacto de las medidas de control implementadas e identificar nuevos factores que afectan la presencia y distribución del patógeno.

## **5.6 Bacterias indicadoras de calidad sanitaria**

La calidad microbiológica de la carne puede estudiarse a través de microorganismos indicadores, los cuales se asocian con antecedentes que comprometen la calidad sanitaria de los alimentos, principalmente relacionados con violaciones a las buenas prácticas higiénicas (Fernández-Escartín, 2008). Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran las bacterias mesófilas aerobias (BMA), los organismos coliformes y Escherichia coli genérica. Las BMA son un grupo muy heterogéneo de bacterias cuyas cifras elevadas ponen de manifiesto la exposición a fuentes de contaminación, las condiciones higiénicas durante el proceso de obtención de la carne y su calidad microbiológica. Una población bacteriana elevada en las canales, es propia de rastros que operan con deficientes prácticas higiénicas.

Así mismo, números elevados de coliformes son indicadores de operaciones sanitarias objetables, mientras que la presencia de E. coli indica la posibilidad de que ha ocurrido la contaminación fecal y que otros microorganismos de origen fecal incluyendo patógenos, puedan estar presentes (Fernández, 2000, 2008). Ghafir et al (Ghafir et al., 2008) realizaron la determinación de bacterias indicadores para evaluar la higiene durante el proceso de sacrificio de bovinos, cerdos y pollos y encontraron que la prevalencia de Salmonella en muestras de cerdo y bovino que contenían E. coli ( $\geq 75\%$  de las muestras), fue significativamente más alta ( $P < 0.01$ ) que en las muestras con E. coli por debajo de este porcentaje, confirmando la utilidad de E. coli como indicador de malas prácticas higiénicas que pueden determinar condiciones favorables para la presencia de otros patógenos entéricos.

Tabla 1. Prevalencia de Salmonella en canales de bovino en establecimientos de sacrificio

Referencia	País	No. de establecimientos	No. de muestras analizadas	Punto del proceso	Prevalencia (%)
(USDA, 1994)	EUA	100	2,089	Cámaras de enfriamiento	1.0
(USDA, 1999)	EUA	2,035	1,881	Cámaras de enfriamiento	1.2
(Sofos et al., 1999a)	EUA	7	3,780	Pre evisceración	1.6 – 1.4 2.7 – 4.7
(Sofos et al., 1999b)	EUA	7	3,780	Pre evisceración	3.6 – 2.5 5.2 – 2.5
(Beach et al., 2002)	EUA	---	100 96	Pre intervenciones	19.0 54.2
(Barkocy-Gallagher et al., 2003)	EUA	3 grandes	1,060 1,016	Pre evisceración Post evisceración	12.7 0.01
(Rivera-Betancourt et al., 2004)	EUA	2	511, 522 499, 520	Pre evisceración Post evisceración	23.3 y 26.8 0.0 y 0.8
(Brichta-Harhay et al., 2008)	EUA	4	3,040 3,040	Pre intervenciones Post evisceración	50.2 0.80
(Bosilevac et al., 2009)	EUA	7 pequeños	1,995	Pre evisceración	58.0
(USDA, 2010)	EUA	---	1764	Cámaras de enfriamiento	0.5 y 0.1
(Fluckey et al., 2007)	Canadá	1	60	Pre intervenciones	8.3
(Ruby et al., 2007)	Canadá	3	5,228	Pre intervenciones Post enfriamiento	45.2 0.47
(Van Donkersgoed et al., 2009)	Canadá	21	---	---	0
(Meyer et al., 2010)	Alemania	7	841	Cámaras de enfriamiento	0.1
(Ghafir et al., 2005)	Bélgica	40	160	2-4 h después del sacrificio	2.5
(McEvoy et al., 2003)	Reino Unido	1	250	Pre evisceración	7.6
(Small et al., 2006)	Reino Unido	5	330 330 80	Post evisceración	12.7 0 20.0
(Phillips et al., 2001)	Australia	28	80	12 h enfriamiento	0.2
(Fegan et al., 2005)	Australia	1	200	Pre enfriamiento En cámaras enfriamiento	2.0 3.0
(Phillips et al., 2006)	Australia	27	1,155	12-24h	0
(Bouchrif B et al., 2008)	Marruecos		2,122	Pre evisceración	71
(Stevens et al., 2006)	Senegal	1	236	Pre enfriamiento	42.8
(Hernández-San Juan et al., 2007)	México	1	36	Línea de sacrificio	14.0

La investigación de *E. coli* como microorganismo indicador es la medida más efectiva para determinar si el proceso de sacrificio está siendo realizado adecuadamente y está libre de la contaminación fecal. La sola presencia de *E. coli* es importante más que su número ya que evidencia la contaminación con materia fecal, la cuál es inaceptable en algunos países. El USDA utiliza la cuantificación de *E. coli* como un indicador del control de procesos y establece que el control de la contaminación fecal en las canales de bovino es aceptable cuando hay ausencia de *E. coli* /cm<sup>2</sup>, como marginal cuando la cuenta de *E. coli* no rebasa más de 100 UFC/cm<sup>2</sup> e inaceptable cuando el recuento está por arriba de éste límite (USDA, 1996).

### **5.7 Adhesión de microorganismos a la superficie de la carne**

La adhesión de bacterias patógenas a la superficie de alimentos y equipo representa un problema muy importante para la industria alimentaria. Inicialmente las bacterias se adhieren débilmente (reversiblemente) y en función del tiempo puede evolucionar a una adhesión irreversible (Vu et al., 2009). Este proceso inicia con una etapa dirigida por fuerzas electrostáticas y de atracción, interacciones hidrofóbicas, seguida por una etapa de estabilización por interacciones a través de fimbrias o polisacáridos bacterianos, y posteriormente multiplicación y formación de biopelículas, que resultan difíciles de remover (Young, 2006). Una biopelícula se define como una comunidad de bacterias estructurada y encerrada en una matriz y adherida a una superficie inerte o viva (Costerton, 1999). La formación de la biopelícula incluye las etapas de depósito, adhesión, colonización de la superficie y formación del exopolisacárido hasta su maduración (Stanley and Lazazzera, 2004; Palmer et al., 2007; Cloete et al., 2009). Durante el procesamiento de alimentos se incrementa la resistencia de las bacterias al estrés ambiental, protegiéndolas de los procedimientos de limpieza e higienización (Jensen, 2010). Las biopelículas pueden influir en la persistencia de las bacterias durante el procesamiento de alimentos y servir como fuentes potenciales de contaminación y conllevar al deterioro o transmisión de enfermedades (Poulsen, 1999).

Algunas propiedades de la superficie bacteriana como la carga eléctrica y la hidrofobicidad han sido relacionadas con la capacidad de adhesión a superficies inertes y

de alimentos (Liu et al., 2004). Diversos estudios han reportado una correlación entre la hidrofobicidad y la fuerza de adhesión a la superficie de alimentos (Dickson, Koohmaraie, 1989; Ukuku, Fett, 2002), sin embargo, otros estudios no han podido establecer tal correlación (Bouttier et al., 1997; Dickson, Koohmaraie, 1989; Rivas et al., 2006).

Actualmente existe gran interés por estudiar las propiedades de adhesión de bacterias patógenas a la superficie de alimentos para encontrar la manera de reducir el grado de adhesión y de facilitar la remoción de las bacterias una vez adheridas. En algunos estudios se ha probado la aplicación de compuestos para bloquear sitios de adhesión (Medina, 2001; Sawyer et al., 2008), mientras que en otros se han aplicado agentes surfactantes para favorecer la remoción de los microorganismos (Calicioglu et al., 2002). La topografía superficial de los alimentos juega un papel importante en la adhesión bacteriana. A mayor rugosidad, mayor superficie de contacto y más posibilidades de que las bacterias queden atrapadas en grietas, dificultando su remoción o el contacto con agentes antimicrobianos. Las canales de bovino tienen una superficie muy irregular, cuya topografía y composición varía según el tejido que compone las diferentes áreas de la misma. Se observan áreas compuestas por tejido graso, muscular, conectivo (fascia), tendones y hueso. Al parecer el tejido al que las bacterias se unen con mayor facilidad es el músculo (Bouttier et al., 1997; Dickson, Koohmaraie, 1989). Medina (2004) encontró que con respecto a las proteínas del músculo, las fibras de colágeno I y miosina tuvieron más alta respuesta de unión a la superficie de *S. Typhimurium*, mientras que la lamina, actina y fibronectina mostraron una respuesta más baja. Por lo anterior, encontrar métodos para reducir la adhesión, remover y destruir las bacterias patógenas adheridas a la superficie de canales representa un reto muy importante para lograr la inocuidad de la carne de bovino.

## **5.8 Microorganismos sustitutos**

En microbiología de alimentos se denomina “microorganismos sustitutos” a aquellos organismos no patógenos que responden a un tratamiento de manera similar a un patógeno de interés (FDA, 2000). Los microorganismos sustitutos se han empleado

para validar la eficacia de tratamientos utilizados para el control de patógenos en los sistemas de producción de alimentos. La utilización de estos microorganismos presenta diversas ventajas: no son patógenos, son fáciles de propagar, de identificar y enumerar con técnicas sencillas y de bajo costo. Además, es posible diferenciarlos del resto de la microbiota normal del alimento y se pueden inocular en altas concentraciones facilitando el seguimiento de su inactivación (Busta et al., 2003).

Ejemplos de microorganismos sustitutos que se usan actualmente en la industria de alimentos son *Clostridium sporogenes* y *Bacillus stearothermophilus* como sustitutos de *C. botulinum* para validar procesos térmicos en la industria de enlatados (FDA, 2000); colifagos como sustitutos de virus entéricos en la validación de tratamientos de aguas (Payment, Franco, 1993; Tree et al., 2005); *Listeria innocua* como sustituto de *L. monocytogenes* para validar tratamientos de altas presiones en jugos y leche (Brinez et al., 2006); *Enterococcus faecium* como sustituto de *Salmonella* para validar tratamientos térmicos en carne molida (Ma et al., 2007).

En años más recientes se han propuesto otros microorganismos como sustitutos, tales como *E. coli* no patógena como sustituto de *E. coli* O157:H7 para validar tratamientos de tolerancia al frío y adhesión a lechuga (Kim, Harrison, 2009). Cepas de coliformes diferentes a *E. coli*, *E. coli* biotipo I y *Pediococcus pentosaceus* para validar tratamientos con ácido acético y ácido láctico en canales de bovino (Ingham et al., 2010), *E. coli* no patógena como sustituto de *E. coli* O157:H7 para validar tratamientos con campos eléctricos pulsados en jugo de naranja (Gurtler et al., 2010), *Pediococcus* como sustituto de *Salmonella* para validar el calentamiento por convección con aire húmedo de almendras (Jeong et al., 2011).

Se ha encontrado que algunas cepas de *E. coli* biotipo I poseen propiedades de resistencia térmica y al ácido láctico similares a *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 e incluso que son capaces de representar la reducción de los patógenos más efectivamente que los indicadores que actualmente se usan (coliformes y BMA) en estudios de validación bajo condiciones de operación comercial (Cabrera-Díaz et al., 2009; Marshall et al., 2005).

Las mismas cepas también resultaron ser buenos sustitutos para la validación de tratamientos en frío o procesos de fermentación de embutidos (Keeling et al., 2009; Niebuhr et al., 2008).

Para validar la eficacia de este tipo de tratamientos en instalaciones comerciales es conveniente contar con organismos sustitutos que posean propiedades de adhesión similares a los patógenos de interés. En un estudio reciente se encontró que algunas cepas no patogénicas de *E. coli* utilizadas como sustitutos de *S. enterica* mostraron igual o menor reducción de su población que el patógeno cuando se aplicaron diversas combinaciones de tratamientos de lavado con agua y ácido láctico al 2%, cloro 20 ppm y fosfato trisódico al 10% a diferentes temperaturas en carne obtenida de canal, en donde se estudió su sobrevivencia durante la refrigeración y congelación en carne molida, así como en embutidos fermentados (Niebuhr et al., 2008). Los estudios con microorganismos sustitutos aun son limitados y representan un área de oportunidad para proveer a la industria de la carne de herramientas para validar más eficientemente sus procesos para el control de patógenos.

## **5.9 Disminución de la carga microbiana de canales de bovino**

Se han aplicado numerosos métodos (o intervenciones antimicrobianas) tanto físicos como químicos para remover o reducir los microorganismos presentes en las canales (Castillo et al., 1998a; Sofos, Smith, 1998). Los métodos químicos consisten en aplicar sustancias con actividad antimicrobiana. Los surfactantes son una clase de compuestos químicos que han sido utilizados para remover o destruir a las bacterias de alimentos o superficies de contacto y se han aplicado en una variedad de alimentos solos o en combinación con otros compuestos antimicrobianos (Byelashov et al., 2008; Calicioglu et al., 2002; Raiden et al., 2003; Restaino, 1994; Takeuchi and Frank, 2001; Zhao et al., 2009).

Dentro de la clasificación de detergentes (Forsythe, Hayes, 2002), los surfactantes o agentes de superficie activa son sustancias que cuando están presentes en baja concentración en un sistema, tienen la propiedad de adsorberse dentro de las superficies

o interfaces del sistema y alterar en grado marcado la superficie o energía libre interfacial de esas superficies (o interfaces). Siendo la interface la frontera entre dos fases inmiscibles, la superficie denota una interface donde una fase es usualmente un gas como el aire (Rosen, 2004); en el proceso de limpieza disminuyen la tensión superficial del agua facilitando el mojado (Forsythe, Hayes, 2002).

Los surfactantes contienen un grupo polar o hidrófilo y otro no polar o hidrófobo y se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas: aniónicos, catiónicos, no iónicos y compuestos anfóteros. Los aniónicos son aquellos compuestos que en solución acuosa se disocian en un anión (anfífilo) y un catión (generalmente un metal alcalino). A este tipo pertenecen los surfactantes de mayor producción: detergentes como alquilbenceno sulfonatos, jabones o sales de ácidos carboxílicos grasos, espumantes como el lauril éster sulfato etc. Los surfactantes catiónicos son aquellos que se disocian en un catión anfífilo y un anión generalmente de tipo halogenado. En la mayoría de los casos corresponden a un grupo amonio cuaternario. Los surfactantes no iónicos no forman iones en solución acuosa, ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como: alcohol, tiol, éter o éster. Al no ionizarse en agua, no forman sales con los iones metálicos y son igualmente efectivos en agua blanda o dura, el grupo hidrofóbico está formado por una cadena larga que tiene grupos débilmente solubilizantes, por ejemplo enlaces etéreos y grupos hidroxilo. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados (lavaplatos, champús). Ciertos derivados del sorbitol producen surfactantes no-tóxicos para uso farmacéutico o alimenticio. Los surfactantes anfóteros presentan en su molécula grupos aniónicos y catiónicos, formados por una cadena grasa y un nitrógeno cuaternario, conteniendo un radical aniónico, son productos estables en sistemas ácidos y alcalinos, básicos en el área cosmética, por su buena tolerancia cutánea y en la formulación de limpiadores alcalinos e inhibidores de corrosión (Considine, 1999; Salager, Fernandez, 2004). La actividad bactericida de los surfactantes aniónicos y no iónicos es baja, mientras que la de los catiónicos es alta (Forsythe, Hayes, 2002).

El lauril sulfato de sodio (SLS) ó dodecil sulfato de sodio (SDS) es un surfactante ácido aniónico aprobado por la FDA como un aditivo multipropósito (emulsificante, agente humectante en una variedad de alimentos, o surfactante) (21 CFR172. Subparte I) (FDA, 2012). Su fórmula química condensada es  $C_{12}H_{25}NaSO_4$ . El Tween 20 (polioxietilén-20 sorbitán monolaurato; polisorbato-20; POE monolaurato de sorbitan; E-432) es un surfactante no iónico aprobado para uso como aditivo indirecto en alimentos como adyuvante, ayudante en la producción y sanitizante, específicamente como emulsificante o agente de superficie activa (21 CFR178. Subparte D)(FDA, 2011). Su fórmula química condensada es  $C_{58}H_{114}O_{26}$ . Ninguno de los dos compuestos está incluido en la lista de ingredientes seguros y aceptables usados en la producción de productos de carne y aves (USDA-FSIS, 2012).

El SLS ó SDS se ha aplicado en alimentos sólo o en combinación con otros antimicrobianos y ha demostrado tener propiedades antimicrobianas (Byelashov et al., 2008; Raiden et al., 2003; Restaino, 1994; Takeuchi and Frank, 2001; Zhao et al., 2009). El mecanismo de acción implica lisis de la célula bacteriana, desnaturalización de proteínas y enzimas, daño de la membrana celular y cambio en la permeabilidad celular (Alakomi et al., 2000). Su efecto antimicrobiano se incrementa a valores de pH por debajo de 4.0 con un óptimo entre 1.5 y 3.0 (Cords et al., 2005). Como surfactante puede incrementar el desprendimiento de las bacterias de las superficies interrumpiendo los puentes hidrofóbicos y cambiando la conformación de la superficie celular (McEldowney, Fletcher, 1986; Nesbitt et al., 1982). Entre otros factores, la eficiencia del surfactante depende del tipo de superficie y concentración del surfactante (McEldowney, Fletcher, 1986). El SDS se ha incluido en fórmulas sanitizantes para aplicación en productos vegetales (Takeuchi and Frank, 2001) o en superficies de contacto con alimentos (Restaino, 1994).

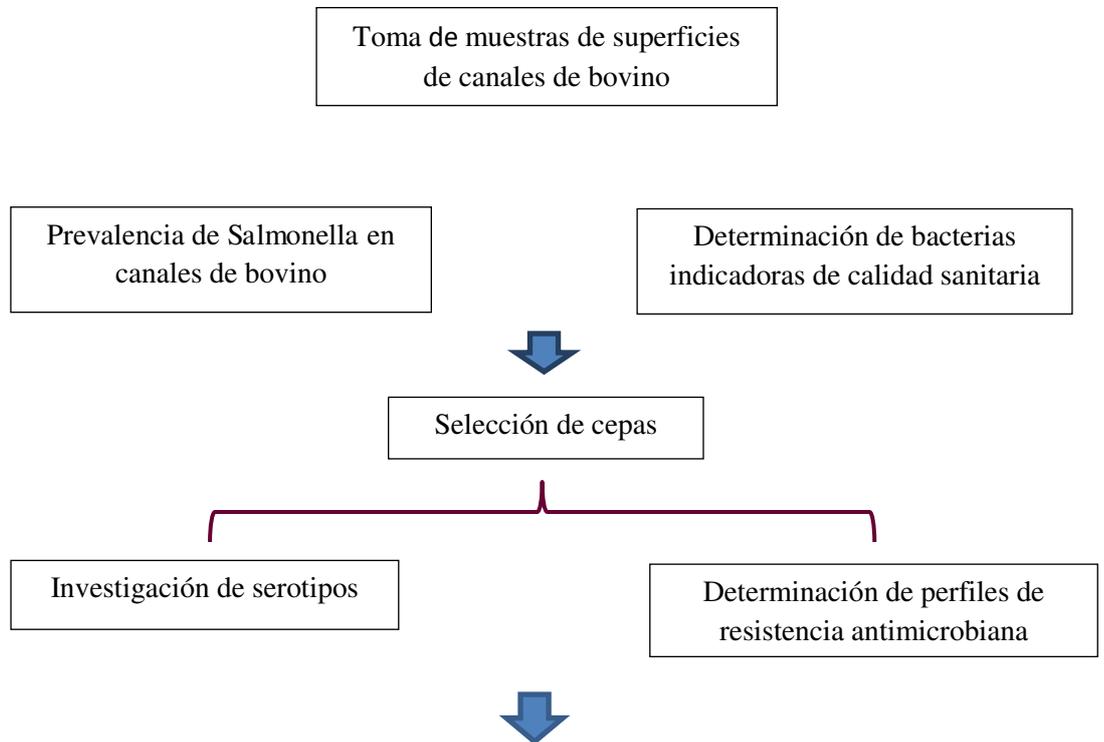
El Tween 20 se ha utilizado como emulsionantes en algunos productos farmacéuticos y la preparación de alimentos, en cosméticos para solubilizar aceites esenciales dentro de productos a base de agua, y al aplicarlo por aspersión previo a la aplicación de ácido láctico en carne de bovino se mejoró la remoción de E. coli biotipo I

y *E. coli* O157:H7 (Calicioglu et al., 2002; Tamblyn, Conner, 1997). En este último estudio en donde fue empleado en tratamientos para facilitar la remoción de bacterias patógenas de la superficie de canales de bovino, y donde se obtuvieron reducciones significativas al asperjar ácido láctico (2%) en cuartos de canal y cortes de carne subprimarios cubiertos de grasa e inoculadas con 4-5 log UFC/cm<sup>2</sup> de *E. coli* O157:H7. Pero al realizar un pre-asperjado de los cortes con Tween 20 se incrementó significativamente la efectividad del asperjado con ácido láctico obteniéndose reducciones de 2.8 y 3.2 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> respectivamente y de ácido láctico con benzoato de sodio con reducciones de 2.6 y 3.3 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>. Los resultados demostraron que el tratamiento de las canales con ácido láctico reduce el número de células viables de *E. coli* O157:H7 y que su inactivación o remoción por el ácido láctico es mayor por el pre-asperjado de las canales con la solución de Tween 20 al 5%.

El empleo de microorganismos sustitutos de patógenos ya ha sido probado, en diversos estudios han demostrado tener propiedades de resistencia a tratamientos físicos y químicos similares a los patógenos de interés. Sin embargo es necesario realizar más estudios para investigar y comparar sus propiedades de adhesión en superficies inertes y en superficies de la carne de bovino, así como su remoción empleando agentes surfactantes y aprovechar todas las ventajas que representan el empleo de este grupo de compuestos para la remoción de bacterias de la superficie de la canal de bovino y finalmente poder proponer alternativas de tratamientos para su validación en condiciones de operación empleando microorganismos sustitutos de patógenos.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### Objetivos 1 y 2:



### Objetivos 3, 4 y 5:

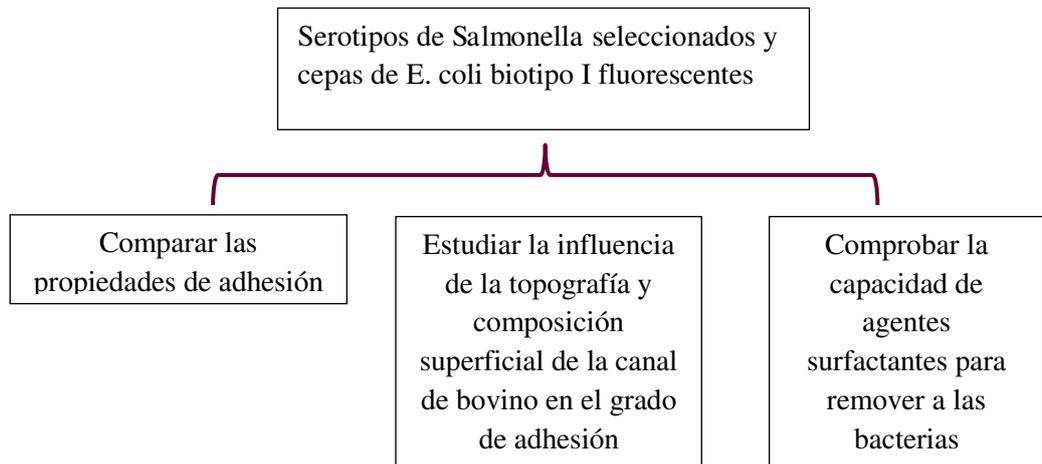


Figura 1. Esquema general de la metodología

## **6.1 Determinación de la prevalencia de Salmonella en canales de bovino**

### **6.1.1 Universo de estudio**

Durante un período de 10 meses que comprendió de diciembre de 2008 a septiembre de 2009, se realizó la recolección de un total de 505 muestras de la superficie de medias canales de bovino en cuatro rastros municipales localizados en el estado de Jalisco, México. El número estimado de muestras por analizar se determinó estadísticamente con el programa Win Episcopo v2.0 considerando el número promedio de animales sacrificados mensualmente en cada establecimiento, la prevalencia esperada del patógeno, un nivel de error del 5% y un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ). Los rastros incluidos en el estudio fueron identificados como A, B, C y D para mantener su identidad en confidencialidad y tenían capacidades de sacrificio de 1065, 158, 138 y 106 cabezas de ganado por semana, con áreas de sacrificio de 1500, 1200, 1200 y 450 m<sup>2</sup>, y un número total de empleados por rastro en las áreas de sacrificio y faenado de 45, 18, 15 y 29, respectivamente. Los establecimientos están localizados en las regiones centro (A), sur (B), norte (C) y oeste (D) del estado, con una distancia aproximada entre ellos de 65 a 195 km. Todos los establecimientos seguían procedimientos similares de sacrificio y faenado y ninguno de ellos tiene implementado el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés).

### **6.1.2 Recolección de muestras**

Cada rastro fue visitado en seis ocasiones distintas y durante cada visita se recolectaron aproximadamente 21 muestras de la superficie de medias canales. Para el muestreo, las medias canales fueron seleccionadas al azar después del lavado con agua y antes del enfriamiento o transporte según fuera el caso. En cada establecimiento el lavado con agua consistía en asperjado de agua a temperatura ambiente sin la aplicación de tratamientos para descontaminación. Las muestras de la superficie de la canal se tomaron a partir de tres sitios: pecho, falda y pulpa (100cm<sup>2</sup> de cada una, 300 cm<sup>2</sup> en total) por frotación con una esponja estéril (Speci-Sponge, Nasco Whirl-Pak, Modesto, CA) humedecida con 20 ml de agua peptonada amortiguada (APA) (BD, Franklin

Lakes, NJ) de acuerdo con la metodología descrita por el USDA (1996) (Figuras 2 y 3). Cada esponja fue regresada a su bolsa estéril y todas las muestras fueron colocadas en hieleras con refrigerantes para su transporte al laboratorio de Inocuidad de Alimentos de la Universidad de Guadalajara y analizadas dentro de las 24 h posteriores a su recolección.

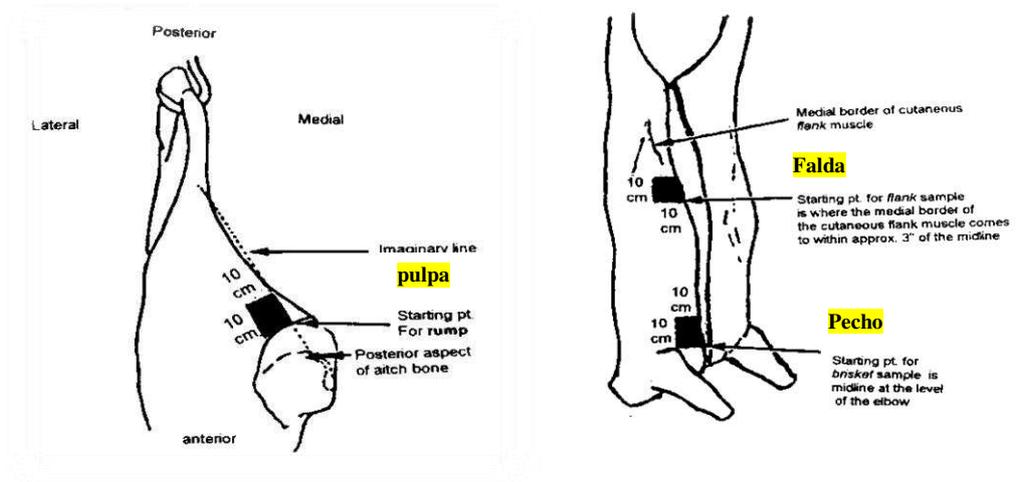


Figura 2. Áreas de muestreo superficial de la canal de bovino en el rastro para el aislamiento de Salmonella (USDA, 1996)



Figura 3. Toma de muestra superficial mediante frotación con esponja (USDA, 1996)

### **6.1.3 Aislamiento e identificación de Salmonella**

#### **6.1.3.1 Pre-enriquecimiento y enriquecimiento de las muestras.**

Esta etapa se realizó mediante la técnica descrita por el USDA (USDA, 2008) con algunas modificaciones como las propuestas por Hughes et al. (2003), así como la inclusión de un medio selectivo adicional (agar sulfito de bismuto, Bioxon). Cada esponja utilizada para muestrear la canal de bovino fue adicionada de 40 ml de APA para completar un volumen total de 60 ml, homogeneizada por 2 min utilizando un BagMixer (Interscience, Mourjou, France) y se continuó con incubación a 35°C por 18 a 22 h. Después de la incubación se transfirieron alícuotas de 1.0 y 0.1 ml de este pre-enriquecimiento a 9.0 y 9.9 ml de caldo tetracionato (TT; BD) y Rappaport-Vassiliadis-10 (RV10; BD), respectivamente. Ambos caldos fueron incubados a 42°C por 16 a 20 h.

#### **6.1.3.2 Post-enriquecimiento y prueba de ELISA.**

Con la finalidad de descartar muestras negativas a partir del enriquecimiento selectivo, se incluyó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la metodología descrita por Hughes et al (2003). Al término de la incubación de los caldos de enriquecimiento selectivo, se realizó un post-enriquecimiento transfiriendo alícuotas de 1 ml de caldo TT y RV10 en forma individual a tubos con 10 ml de caldo M (BD, BD, Franklin Lakes, NJ) precalentado a 35-37°C, seguido de incubación a 35°C por 6-8 horas. Después de este paso se continuó con la prueba de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Salmonella VIA, TECRA International Pty. Ltd., Bringelly New South Wales, Australia). Después de atemperar todos los componentes del kit a temperatura ambiente, se combinaron alícuotas de 0.5 ml de cada tubo de post-enriquecimiento de cada muestra en un tubo estéril y se aplicó un calentamiento a ebullición en baño maría por 15 minutos (el caldo M restante se conservó en refrigeración) con posterior enfriamiento a temperatura ambiente.

A continuación, se transfirieron 200µl de los controles positivo y negativo del kit y de cada muestra en pozos individuales. La canastilla con los pozos se cubrió con

plástico adherible e incubó a 35°C por 30 min. Posteriormente, asegurándose de que todos los pozos de la canastilla estuvieran fijos, se invirtió rápidamente la canastilla sobre un contenedor con solución de cloro para desechar el contenido, los residuos de líquido se removieron golpeando bocabajo sobre papel absorbente desechable. Utilizando una piseta se distribuyó la solución de lavado en cada pozo sin dejar burbujas en ellos, vaciando completamente y repitiendo este procedimiento tres veces. Enseguida se adicionaron 200µl del conjugado en cada celda, asegurándose de que los pozos estuvieran completamente vacíos y sin burbujas, se cubrió la canastilla con los pozos con plástico adherible y se incubó a 35°C por 30 min. Después de la incubación se realizaron cuatro lavados como se describió anteriormente. El siguiente paso consistió en asegurarse de que los pozos estuvieran completamente vacíos y sin burbujas y se agregaron 200µl de substrato en cada pozo, los cuales se cubrieron con plástico adherible, y se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C) por 10 min. Al término de la incubación se leyeron los resultados por comparación visual con la carta de color incluida en el kit.

### **6.1.3.3 Aislamiento y pruebas bioquímicas presuntivas.**

A partir de las muestras que resultaron positivas en la prueba de ELISA se tomó una alícuota de cada caldo (TT o RV10) la cual fue estriada individualmente en placas de agar xilosa lisina tergitol™4 (XLT4; BD), verde brillante sulfa (VBS; BD) y sulfito de bismuto (SB; Bioxon, México) y las placas fueron incubadas a 35°C por 24 a 48 h. De cada placa de agar selectivo se seleccionaron al menos tres colonias bien aisladas con características típicas para Salmonella (en XLT4, negras o rojas con o sin centro negro, en el VBS son rosas y opacas con apariencia suave y borde entero en el medio color rojo y en el agar SB son de color café, gris o negro con o sin brillo metálico, con un halo café que se torna a negro). Las colonias seleccionadas se transfirieron a medios para pruebas bioquímicas presuntivas: fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa (agar de hierro y triple azúcar, TSI; BD) y descarboxilación de la lisina (agar de lisina hierro, LIA; BD) los medios se incubaron a 35°C por 24 h. En el agar TSI el vire del indicador a amarillo en el fondo del tubo es debido a la fermentación de glucosa; mientras que un color rojo más intenso en la superficie debido a la ausencia de

fermentación de la lactosa o de la sacarosa y una coloración negra a lo largo de la picadura debido a la producción de ácido sulfhídrico. La descarboxilación de la lisina se observa como una intensificación del color púrpura del medio de cultivo, así como producción de ácido sulfhídrico observada por ennegrecimiento a lo largo de la picadura.

#### **6.1.3.4 Aglutinación somática.**

Los aislamientos con reacciones bioquímicas típicas para *Salmonella* fueron transferidos a tubos de agar soya tripticaseína inclinado (AST; BD) y se incubaron a 35°C por 24 h. La reacción antígeno-anticuerpo para la caracterización del serogrupo O de *Salmonella* spp. se realizó en una lámina portaobjetos a partir del cultivo en AST. Se dibujaron dos óvalos en secciones separadas del portaobjetos con lápiz de cera. En cada óvalo se colocó con una gota de solución salina estéril (0.85%, SS), se suspendió en cada gota una porción del cultivo desarrollado en AST y se mezcló. En el caso de no observar aglutinación con la SS, se agregó a una de las suspensiones del cultivo una gota del antisuero polivalente somático (O) mezclándose con el canto del asa. La lámina se agitó inclinándola hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente 1 min. Se observó bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro y se consideró cualquier grado de aglutinación como positiva. Se verificó siempre que el cultivo estuviera en forma lisa por ausencia de autoaglutinación con solución salina al 0.85%. La prueba se consideró positiva cuando se presentó aglutinación en la mezcla del cultivo con el antisuero y cuando no hubo aglutinación en la mezcla del cultivo con la SS (Andrews, Hasmmack, 2007).

#### **6.1.3.5 Pruebas bioquímicas complementarias.**

En aquellos aislamientos que produjeron reacciones no típicas en agar TSI y LIA y/o reacción serológica negativa se realizaron reacciones bioquímicas adicionales en los medios rojo de metilo Voges Proskauer (MRVP), citrato de Simmons, caldo ureasa de Rustigian y Stuart, medio SIM para sulfuro, indol y movilidad así como en caldo rojo de fenol para fermentación de salicina y dulcitol (USDA, 1996). Todos los medios utilizados fueron de la marca Bioxon y los reactivos para lectura de las pruebas de la marca Sigma-Aldrich.

#### **6.1.3.6 PCR múltiple.**

Los aislamientos que presentaron perfiles bioquímicos típicos para *Salmonella* en las pruebas bioquímicas adicionales, así como los aislamientos que no aglutinaron con el suero somático O fueron adicionalmente confirmados mediante una prueba de PCR múltiple para la detección de los genes *invA* (544pb) y *fimA* (686pb). El DNA fue obtenido mediante lisis celular a 90°C por 15 min. La PCR multiplex fue realizada usando los iniciadores (primers) no reportados previamente *invA*-F (5'-CGT TGA CCA CCA TAT CAA CAT AGA-3'), *invA*-R (5'-CAA AGA GCT GAT AGG CGT TT-3'), *fimA*-F (5'-CCT CGC TGT CAG TTA ACG-3') y *fimA*-R (5'-CGT AAA GCC GGC GGT AC-3'). Los oligonucleótidos (0.5 mM) y la Taq polimerasa (0.6 U) fueron usados en la reacción bajo las siguientes condiciones estandarizadas para esta prueba: un ciclo de 95°C por 10 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 50 segundos y 72°C por 1 min y un ciclo de 72°C por 10 min (Thermocycler ESCO Swift MiniPro, Hatboro, PA). Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% (Promega, Madison, WI), teñidos con bromuro de etidio (7 mg/ml; AMRESCO Inc., Solon, OH) y visualizados bajo transiluminación UV (Gel Logic 100 Imaging System, Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Se utilizaron estándares de 0.1 a 10 Kb (2-log), New England Biolabs, Ipswich, MA) para confirmar el tamaño de los productos amplificados. Una cepa de *Salmonella* Montevideo fue usada como control positivo.

Los aislamientos confirmados como *Salmonella* spp. se almacenaron en CST con glicerol al 15% (BD; Hycel, México) a -18°C y los cultivos de trabajo fueron mantenidos en AST inclinado a 4°C. Un aislamiento de cada muestra positiva fue seleccionado para pruebas de serotipificación y susceptibilidad antimicrobiana.

#### **6.1.4 Serotipificación de los aislados**

Previo a ser enviados para su serotipificación, los aislamientos confirmados como *Salmonella* spp. fueron reactivados en CST e incubados a 35°C por 24 h y estriados

individualmente en placas de agar VBS. Una colonia típica de Salmonella fue inoculada en tubos de agar AST inclinado los cuales fueron incubados a 35°C por 24 h. Después de la incubación fueron re-confirmados bioquímica y serológicamente como se describió anteriormente. Los aislamientos fueron enviados para su tipificación serológica (al menos un aislamiento por cada muestra positiva) al Laboratorio del Departamento de Enterobacterias del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en donde se realizaron la aglutinación con el antisuero polivalente y los antisueros somáticos o de grupo (D, C1, C2, E1, E2, E3, E4, G), además de la aglutinación flagelar e inducción flagelar y determinación del serotipo de acuerdo al esquema Kauffman-White.

### **6.1.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de Salmonella serotificados (al menos un aislamiento por cada muestra positiva) fue determinada de acuerdo al método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI, 2006). Se usaron sensidiscos (BBL, BD, Sparks, MD) de los siguientes antimicrobianos de importancia veterinaria y humana: ampicilina (AMP, 10 mg), gentamicina (GEN, 10 mg), tetraciclina (TET, 30 mg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 1.25 y 23.75 mg), cloranfenicol (CHL, 30 mg), ceftriaxona (CRO, 30 mg), ciprofloxacina (CIP, 30 mg), kanamicina (KAN, 30 mg), ácido nalidíxico (NAL, 30 mg), estreptomomicina (STR, 10 mg) y cefalotina (CEP, 30 mg). Escherichia coli ATCC 25922 fue usada como control. Los aislamientos de Salmonella y la cepa control fueron inoculados en CST e incubados a 35°C por 24 h. La suspensión bacteriana resultante se ajustó a una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) con CST. Utilizando un hisopo humedecido con la suspensión estandarizada, cada aislamiento fue estriado en forma individual en placas de agar Mueller-Hinton rotando la placa tres veces (60° cada vez) y realizando un pase final en el borde del agar. Sobre el agar inoculado se colocaron los discos con los antibióticos utilizando un dispensador automático (BBL, BD, Sparks, MD) y las placas se incubaron a 35°C por 16 a 18 h. Las

zonas de inhibición fueron medidas con la ayuda de una regla tipo escalímetro (vernier) e interpretadas como concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés). Los aislamientos se clasificaron como susceptibles (S), intermedios (I) y resistentes (R), de acuerdo al suplemento informativo XVIII (CLSI, 2008). Los aislamientos fueron clasificados como multirresistentes cuando presentaron resistencia a tres o más antimicrobianos tal como también fue referido por Miranda et al (2009).

### **6.1.6 Análisis estadístico**

La frecuencia de aislamiento de Salmonella por rastro (A, B, C y D) y época (seca y húmeda), así como la frecuencia de serotipos y aislamientos de Salmonella resistentes a los antimicrobianos probados fue comparada para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) mediante la prueba de Chi cuadrada utilizando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS Inc., 2006).

## **6.2. Determinación de bacterias indicadoras de calidad sanitaria**

### **6.2.1 Muestras**

A partir de las muestras de esponjas recolectadas de la superficie de canales de bovino en los cuatro rastros del estado para la investigación de Salmonella, se realizó adicionalmente la determinación de bacterias indicadoras de calidad sanitaria.

### **6.2.2 Análisis microbiológicos**

Los grupos indicadores que se investigaron fueron bacterias mesófilas aerobias (BMA, n=499 muestras), coliformes totales (CT, n=501 muestras) y E. coli (n=498 muestras). Las muestras fueron obtenidas a partir de la esponja humedecida con los 20 ml de APA (adicionados durante el muestreo de las canales) y antes de adicionar los 40 ml restantes para la investigación de Salmonella. Después de homogeneizar las esponjas en un BagMixer por 1 min se transfirieron volúmenes de 1 ml a 9 ml de diluyente de peptona 0.1% (DP) y se realizaron diluciones decimales sucesivas a partir de las cuales

se inocularon alícuotas de 1 ml en placas Petrifilm™ (para el recuento de aerobios y para E. coli y coliformes). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas para el recuento de CT, E. coli y por 48 horas para el recuento de BMA según las recomendaciones del fabricante. La cuenta final se reportó como el logaritmo de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (Log UFC/cm<sup>2</sup>).

Con la finalidad de verificar la potabilidad del agua utilizada en el lavado de las canales y su participación como fuente de contaminación hacia las mismas, se tomaron de 4 a 5 muestras (aproximadamente 200 ml de cada muestra) por rastro en frasco estéril (en promedio una por cada visita) y se realizó la determinación de organismos coliformes mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) en tubos de caldo lactosado con confirmación en caldo- lactosa- bilis- verde brillante, ambos con incubación a 35°C por 24-48 horas como lo establece la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1-2000. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles (Secretaría de Salud, 2000).

### **6.2.3 Análisis estadístico**

Se aplicó estadística descriptiva y se elaboraron tablas de frecuencia. Las diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los recuentos de bacterias indicadoras entre los rastros y estaciones del año se determinaron mediante un análisis de varianza univariado y las pruebas de comparación de medias mediante la prueba de Tukey con el paquete estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 17 para Windows (SPSS Inc., 2006).

## **6.3 Comparación de las propiedades de adhesión entre serotipos de Salmonella y cepas de E. coli biotipo I previamente propuestas como organismos sustitutos**

### **6.3.1 Cultivos de bacterias**

Para el estudio de las propiedades de adhesión se seleccionó una cepa de Salmonella por cada muestra positiva de canales de bovino, de tal forma que se

incluyeron en este estudio un total de 78 cepas (Tabla 2). Se incluyó adicionalmente una cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 como control ya que se trata de una cepa aislada de carne que ya ha sido utilizada como control en otros estudios de adhesión (Dickson, 1991; Medina, 2004) y también se utilizaron cuatro cepas de *E. coli* biotipo I (RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66) marcadas para producir una proteína fluorescente y expresar resistencia a ampicilina. Estas cepas fueron previamente propuestas como sustitutos de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 para la validación de tratamientos de descontaminación de carne en canal (Cabrera-Diaz et al., 2009) y fueron proporcionadas por la Universidad de Texas A&M. Todas las cepas se conservaron a temperatura ambiente en agar nutritivo (BD) semisólido sellado con petrolato (Hysel, México) y/o en CST (BD) con glicerol al 20% (Hysel, México) en congelación a -18°C. Triplicados de cada cepa en tubos de AST (BD) inclinado se mantuvieron en refrigeración para ser utilizados como cultivos de trabajo.

### **6.3.2 Determinación de la hidrofobicidad**

Se determinó la hidrofobicidad de cada aislamiento por el método de adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) descrito por Sweet et al (1987), para lo cual cada aislamiento fue inoculado de manera individual en 12 ml de CST e incubado a 35°C por 18 h. Cada cultivo fue centrifugado (SIGMA 2-GE, Alemania), lavado y resuspendido en dos ocasiones en 6 ml de buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.2). El paquete final fue resuspendido en 12 ml de PBS y distribuido en cuatro tubos de vidrio (BD) estériles que contenían 2 ml de PBS, el volumen final fue homogeneizado en un agitador tipo vortex (GENIE 2, Vermon Hills IL, USA). La suspensión obtenida fue ajustada a una densidad óptica de 1.0 a una longitud de onda de 520 nm (Jenway 6405 UV/Vis, Keison Products, UK) para obtener una concentración aproximada de  $3.0 \times 10^8$  UFC/ml. Uno de los cuatro tubos fue utilizado como control y a cada uno de los otros tres tubos (triplicado de ensayo) se les adicionó 1 ml de p-xileno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), que constituye la fase hidrocarburo a la cual se adhieren las bacterias en mayor o menor proporción de acuerdo con sus características de superficie hidrofóbicas. Cada tubo fue agitado por 30 s y reposado 30 min en baño de agua a 37°C para separar las fases. La fase acuosa fue removida con pipeta estéril mientras que la fase de

hidrocarburo se transfirió a un tubo limpio y se agitó en vortex por 30 s para remover los residuos de p-xileno por evaporación. Una alícuota de 1 ml fue transferida a una cubeta espectrofotométrica para medir la densidad óptica a 520 nm. La ABH se calculó como la relación entre la absorbancia de los tubos de prueba ( $A_p$ ) y la absorbancia del control ( $A_c$ ) expresada en % y fue calculada mediante la fórmula:  $\% ABH = \left[ (A_p - A_c) / A_c \right] \times 100$ . Se realizaron dos repeticiones por triplicado de cada aislamiento.

### **6.3.3 Determinación de la capacidad de Salmonella y E. coli biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes**

En esta etapa se estudió la capacidad para formar biopelículas en acero, látex y poliestireno en una selección de 40 de las cepas de Salmonella que mostraron los valores más elevados de ABH, así como de las cuatro cepas de E. coli biotipo I (RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66) y la cepa de S. Typhimurium ATCC 14028 como control.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos estériles con fondo plano (Falcon 35 3072, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), cupones de acero inoxidable calibre 22 tipo 304 de 2 X 2 cm y 0.1 mm de espesor, así como cupones de látex de 2 X 2 cm X 0.1 mm obtenidos a partir de guantes de hule natural (Derma Care® 56-450, Sri Lanka). Antes de su uso en cada experimento los cupones de acero y látex fueron acondicionados mediante procedimientos diferentes. Los cupones de acero fueron lavados con detergente y secados, posteriormente se cubrieron con acetona (Fermont, Monterrey, N.L., México) durante 30 min. En seguida se colocaron en una solución al 10% de un detergente alcalino (Extran MA 01, Merck, USA) a 70-90°C durante 1 h y se agitaron en un agitador recíproco (Eberbach, MI, USA) a 150 rpm durante 30 min. La solución del detergente fue desechada y se realizaron 4 a 5 lavados con agua destilada. Los cupones de látex fueron lavados, secados y tratados con el detergente alcalino sin calentamiento y frotados en forma manual utilizando guantes de látex. Al finalizar los tratamientos ambos cupones se secaron al aire y esterilizaron en autoclave a 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 15 min.

Tabla 2. Relación y origen de cepas de Salmonella utilizadas en los estudios de hidrofobicidad<sup>a</sup> y de formación de biopelículas<sup>b</sup>

No.	Cepa	Serotipo	Rastro	No.	Cepa	Serotipo	Rastro
1	104 <sup>a</sup>	Give	D	40	1736 <sup>a</sup>	Give	C
2	110 <sup>ab</sup>	Montevideo	D	41	1763 <sup>a</sup>	Give	C
3	125 <sup>ab</sup>	Give	D	42	1778 <sup>a</sup>	Give	C
4	166 <sup>a</sup>	Give	D	43	1796 <sup>ab</sup>	Montevideo	C
5	198 <sup>a</sup>	Give	D	44	1801 <sup>a</sup>	Give	C
6	215 <sup>a</sup>	Give	D	45	1821 <sup>ab</sup>	Give	C
7	251 <sup>ab</sup>	B rugoso	A	46	1834 <sup>a</sup>	Give	C
8	410 <sup>ab</sup>	Oranienburg	B	47	1850 <sup>a</sup>	Give	C
9	487 <sup>ab</sup>	Bovismorbificans	C	48	1883 <sup>a</sup>	Give	C
10	582 <sup>ab</sup>	Give	D	49	1893 <sup>a</sup>	Give	C
11	625 <sup>a</sup>	Give	D	50	1913 <sup>ab</sup>	E1	A
12	727 <sup>ab</sup>	Enteritidis	D	51	1939 <sup>ab</sup>	Havana	A
13	731 <sup>ab</sup>	Montevideo	C	52	1945 <sup>ab</sup>	Infantis	A
14	745 <sup>a</sup>	Anatum	C	53	1961 <sup>a</sup>	Infantis	A
15	920 <sup>ab</sup>	Anatum	C	54	1979 <sup>ab</sup>	Give	A
16	947 <sup>ab</sup>	G2 rugoso	A	55	1993 <sup>ab</sup>	Infantis	A
17	977 <sup>ab</sup>	Livingstone	A	56	2000 <sup>a</sup>	Infantis	A
18	1017 <sup>ab</sup>	E1	A	57	2012 <sup>a</sup>	Infantis	A
19	1151 <sup>ab</sup>	E1 monofásico	B	58	2039 <sup>a</sup>	Infantis	A
20	1161 <sup>a</sup>	B rugoso	C	59	2080 <sup>ab</sup>	sin tipificar	B
21	1190 <sup>ab</sup>	B rugoso	C	60	2116 <sup>ab</sup>	B rugoso	B
22	1205 <sup>a</sup>	B rugoso	C	61	2147 <sup>a</sup>	B rugoso	B
23	1209 <sup>ab</sup>	B rugoso	C	62	2156 <sup>a</sup>	B rugoso	B
24	1230 <sup>a</sup>	B rugoso	C	63	2199 <sup>ab</sup>	Panama	D
25	1260 <sup>ab</sup>	Anatum	C	64	2272 <sup>ab</sup>	Typhimurium	D
26	1309 <sup>a</sup>	B rugoso	C	65	2306 <sup>ab</sup>	Infantis	D
27	1333 <sup>a</sup>	B rugoso	C	66	2350 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
28	1376 <sup>ab</sup>	Sinstorf	D	67	2360 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
29	1399 <sup>ab</sup>	sin tipificar	D	68	2388 <sup>ab</sup>	Typhimurium	C
30	1446 <sup>a</sup>	Muenster	A	69	2397 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
31	1512 <sup>ab</sup>	Muenster	A	70	2423 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
32	1528 <sup>ab</sup>	Anatum	A	71	2430 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
33	1542 <sup>ab</sup>	E1	A	72	2483 <sup>ab</sup>	Infantis	C
34	1606 <sup>ab</sup>	Bovismorbificans	B	73	2504 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
35	1623 <sup>a</sup>	Bovismorbificans	B	74	2514 <sup>ab</sup>	Give	C
36	1640 <sup>a</sup>	Typhimurium	D	75	2540 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
37	1650 <sup>ab</sup>	Typhimurium	D	76	2568 <sup>a</sup>	Typhimurium	C
38	1673 <sup>a</sup>	Typhimurium	D	77	2598 <sup>ab</sup>	Typhimurium	C
39	1717 <sup>a</sup>	Give	C	78	2606 <sup>ab</sup>	B monofásico	C

<sup>a</sup> Hidrofobicidad

<sup>b</sup> Biopelículas

### **6.3.3.1 Experimentos preliminares.**

Para llevar a cabo la investigación fue necesario realizar algunos experimentos para definir las mejores condiciones para la determinación de las biopelículas.

**6.3.3.1.1 Recuperación de la biopelícula mediante hisopado versus agitación en vortex.** Este experimento preliminar se realizó con el propósito de encontrar la mejor forma de recuperar las biopelículas realizando una adaptación de los procedimientos reportados por Kim and Wei (2007) y por Giaouris et al (2005). Cultivos de 18 h de dos cepas de Salmonella y de dos cepas de E. coli biotipo I fluorescentes se inocularon por duplicado cada una en 15 ml de CST (concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/ml) en tubos cónicos de 50 ml (Falcon, BD). A continuación, se colocó en su interior un cupón de acero inoxidable y se incubaron a temperatura ambiente ( $26.6 \pm 2.2$  °C) durante 24 h. Los cultivos se desecharon y los cupones de acero se lavaron en tres ocasiones con 15 ml de DP estéril en un agitador recíproco (Eberbach) a 150 rpm durante 15 min. Los cupones fueron extraídos con pinzas estériles y un cupón de cada duplicado se colocó en placas de Petri estériles para realizar un tallado por ambos lados del cupón con un hisopo estéril humedecido con DP. El hisopo fue posteriormente suspendido en un tubo con 5 ml de DP para realizar diluciones decimales y recuento de los microorganismos. El otro cupón de cada duplicado se transfirió a un tubo estéril con 15 ml de agua destilada estéril, se agitó en un agitador tipo vortex (Genie) a la máxima velocidad durante 2 min y se realizaron diluciones decimales y recuento. En ambos casos el recuento se realizó en AST por la técnica de vaciado en placa después de incubación a 35°C por 24 h. Los resultados se expresaron como  $\log \text{UFC/cm}^2$ .

**6.3.3.1.2 Recuento de las biopelículas formadas a diferentes tiempos de incubación.** Para determinar el tiempo de incubación idóneo para obtener la mayor formación de biopelícula, se utilizaron seis cepas de Salmonella. Cada cepa se inoculó por duplicado en ocho tubos cónicos (Falcon, BD) que contenían 15 ml de CST para tener una concentración aproximada de  $1.0 \times 10^6$  UFC/ml. Después de homogeneizar los

cultivos, se introdujeron los cupones de acero (uno por cada tubo) utilizando pinzas estériles y se incubaron a  $26.6 \pm 2.2^{\circ}\text{C}$  por 6, 12, 24 y 48 h. Al completarse los tiempos de incubación, se desecharon los cultivos y cada cupón de acero fue lavado con 15 ml de PBS en un agitador recíproco (Eberbach) a 150 rpm durante 15 min, este paso se repitió en dos ocasiones. El PBS fue descartado y los cupones fueron transferidos a tubos cónicos estériles con 15 ml de DP y agitados en un vortex (Genie) a máxima velocidad por 2 min. Se realizaron diluciones decimales tal como está especificado en el punto anterior.

**6.3.3.1.3 Comparación entre la utilización del caldo de cultivo con y sin reemplazo.** Para estudiar la formación de biopelículas en superficies inertes durante un periodo de 7 días, se evaluó si había diferencia en la formación de las biopelículas cuando el CST era o no reemplazado a lo largo del periodo de incubación a temperatura ambiente ( $26.6 \pm 2.2^{\circ}\text{C}$ ). El CST en donde fueron sumergidos los cupones fue descartado y reemplazado con CST estéril cada 48 h de forma similar a los experimentos de Giaouris et al (2006). Al final de los 7 días de incubación se realizaron los mismos procedimientos para el lavado de los cupones y el recuento de UFC descritos en la sección anterior (6.3.3.1.2). Los recuentos obtenidos se expresaron como  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ .

#### **6.3.3.2 Preparación del inóculo.**

Las 40 cepas de *Salmonella* seleccionadas para los experimentos de adhesión (Tabla 2), la cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 utilizada como control y las cuatro cepas de *E. coli* biotipo I marcadas con fluorescencia fueron mantenidas en tubos de AST y AST-Amp inclinado, según corresponda, en refrigeración (cultivos de trabajo). A partir de los cultivos de trabajo se realizaron dos resiembras sucesivas en CST (BD) e incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 h y posteriormente se inocularon por estría en placas de AVB (BD) para *Salmonella* y AST con ampicilina (AST-Amp,  $100 \mu\text{l}/\text{ml}$ ; Sigma-Aldrich) para *E. coli* biotipo I fluorescentes y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Se seleccionaron 3 a 5 colonias típicas de cada cepa y se inocularon individualmente en tubos cónicos (Falcon, BD) con 10 ml de CST e incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 h. Para los experimentos de formación de biopelículas en acero inoxidable, se estimó la

concentración de células mediante recuento por vaciado en placa de los cultivos frescos en AST para Salmonella y en AST-Amp para las cepas de E. coli biotipo I fluorescentes incubadas a 35°C durante 24 h. El recuento de UFC de las cepas de E. coli se realizó en un gabinete UV a 254 nm (Chromato-Vue C-65, UVP, Ca., EUA). Para los experimentos en poliestireno y látex los cultivos frescos en CST fueron ajustados al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) de la misma forma que se describió en la sección de resistencia antimicrobiana. La concentración de bacterias también fue confirmada mediante recuento en placa.

### **6.3.3.3 Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable y látex.**

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los métodos descritos por Pawar et al (2005), Kim and Wei (2007), Rivas et al (2007b), Stepanovic et al (2003), así como Giaouris et al (2005; Giaouris and Nychas, 2006). Se prepararon las suspensiones bacterianas de igual manera que en el punto 8.3.3.2. Se tomaron alícuotas de 150  $\mu$ l y fueron inoculadas individualmente en 15 ml de CST estéril en tubos cónicos (Falcon, BD) para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de cada cepa. Utilizando pinzas estériles se introdujo un cupón de acero o látex en cada suspensión bacteriana. Se incluyeron tubos con CST sin inocular como controles negativos dentro de los cuales también se colocaron cupones estériles. Todos los tubos fueron incubados  $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$  por 24 h y por 7 días. Al término de la incubación se desecharon los cultivos y se realizaron dos lavados de los cupones con 15 ml de PBS agitando en un agitador recíproco (150 rpm/min) durante 15 min para desprender las células débilmente adheridas. Al finalizar la agitación el PBS fue descartado y los cupones fueron transferidos a tubos cónicos estériles con 15 ml de DP y agitados en un vortex (Genie) a máxima velocidad por 2 min para desprender las células de la biopelícula formada sobre el cupón. Se prepararon diluciones decimales en tubos con DP y se realizó el recuento de las bacterias en AST (Salmonella) y en AST-Amp (E. coli biotipo I fluorescentes) por vaciado en placa con incubación a 35°C durante 24 h. Las colonias de E. coli biotipo I fluorescentes se contaron en gabinete UV (UVP) a 254 nm. Se realizaron 6 repeticiones de cada experimento en diferentes días.

#### **6.3.3.4 Cuantificación de biopelículas en poliestireno.**

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los métodos descritos por Pawar et al (2005), Kim et al (Wei, 2007), Rivas et al (2007a) y Stepanovic et al (2003). A partir de los cultivos ajustados a  $1 \times 10^8$  UFC/ml se realizó una dilución 1:100 en CST para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Se transfirieron 230  $\mu$ l de la suspensión celular de cada cultivo (por duplicado) de Salmonella, de la cepa de S. Typhimurium ATCC 14028 utilizada como control y de cada cepa de E. coli biotipo I en pozos de dos microplacas de poliestireno de 96 pozos, así como dos pozos con CST sin inocular como control negativo. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente  $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$  durante 24 h y a la misma temperatura por 7 días. Al término de la incubación los cultivos fueron desechados y se realizaron tres lavados de cada pozo con agua destilada estéril. A continuación, las microplacas se secaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 1 h en incubadora (Felisa, Chalco, México) y se fijaron pasándolas varias veces por la flama de un mechero. Se adicionaron 230  $\mu$ l de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Alemania) al 1% (peso/volumen), se incubó a temperatura ambiente por 30 min, se desechó el colorante y se lavó con agua destilada estéril hasta que el colorante no fuera visible. Los pozos se secaron a  $60^\circ\text{C}$  por 1 h y el cristal violeta unido a la biopelícula formada en el fondo de cada pozo fue solubilizado con 230  $\mu$ l de una mezcla de alcohol-acetona (80:20, Hycel, México-Fermont, N.L., México). La concentración del colorante adsorbido por las células de la biopelícula y solubilizado fue determinada a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). Los experimentos fueron realizados por sextuplicado.

#### **6.3.3.5 Diseño experimental y análisis estadístico.**

El diseño de la investigación fue experimental y multifactorial. Los valores de ABH entre microorganismos fueron comparados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ). Se aplicaron las pruebas de correlación de Pearson, Kendall y Spearman (con niveles de significancia de 0.01 y 0.05) entre los valores de ABH y los recuentos de biopelículas

usando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 17 para Windows (SPSS Inc., 2008).

## **6.4 Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I**

### **6.4.1 Preparación de cepas e inóculo.**

Para esta etapa se realizó una selección de diez cepas de Salmonella con diferente capacidad para formar biopelículas de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de la sección 8.3. Estas cepas fueron marcadas con resistencia a rifampicina de acuerdo a la metodología descrita por Kaspar y Tamplin (1993). Cada cepa fue inoculada en un microtubo cónico (Eppendorf, Alemania) con 1 ml de CST e incubada a 35°C por 24 h. Posteriormente se centrifugó a 5,167 X g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de SS y se homogeneizó en un vortex (Genie) hasta re-suspender el paquete celular. Se inocularon 0.1 ml del cultivo homogeneizado en la superficie de AST con rifampicina (AST-Rif, 100 µl/ml; Sigma-Aldrich, Alemania), se extendió con varilla estéril e incubó a 35°C durante 24 h. A partir del AST-Rif se seleccionó una colonia típica (1-2 mm, cremosa, cóncava) y se inoculó nuevamente en AST-Rif con incubación a 35°C por 24 h en dos ocasiones sucesivas. La cepa seleccionada con resistencia natural a la rifampicina se inoculó en los medios de TSI y LIA para su confirmación bioquímica, se aglutinó con antisuero polivalente O y se inoculó en AST-Rif inclinado por quintuplicado para su conservación en refrigeración (cultivos de trabajo), así como en microtubos con CST-Rif-glicerol para su conservación en congelación.

Se seleccionaron cinco cepas de Salmonella consistentes en aquellas cepas que tuvieron mejor crecimiento en AST-Rif y que correspondieron a Salmonella Panama, Salmonella Grupo B rugoso, Salmonella Bovismorbificans (dos cepas) y Salmonella Give. También se incluyeron las cuatro cepas de E. coli biotipo I marcadas con fluorescencia y resistencia a ampicilina (RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66), así como la cepa de control de S. Typhimurium ATCC 14028. A partir de los cultivos de trabajo se

realizaron dos inoculaciones sucesivas en tubos con CST con rifampicina o ampicilina e incubaron a 35°C por 18-24 h, posteriormente se estriaron en placas de agar lactosa sulfito rojo de fenol rifampicina (LSPR) preparado conforme las indicaciones de Castillo et al (1998b) y AST-Amp; se seleccionaron de 3 a 5 colonias de cada microorganismo e inocularon en CST-Rif y CST-Amp respectivamente y se incubaron a 35°C durante 18 h. A continuación, cada cepa fue centrifugada (Sigma) a 5,167 X g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con el 10 ml de PBS, después del segundo lavado los cultivos fueron homogeneizados en un vortex hasta disolución completa del paquete celular. De esta manera se estandarizó el procedimiento para obtener concentraciones constantes de cada bacteria. Posteriormente, volúmenes iguales de cada cepa se transfirieron a una botella estéril para obtener una concentración entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC/ml de la mezcla. En todos los experimentos se comprobó la concentración del inóculo de cada cepa por recuentos en superficie en agar LSPR y AST-Amp, según correspondiera.

## **6.4.2 Experimentos preliminares**

### **6.4.2.1 Influencia del diluyente en la cantidad de bacterias recuperadas del músculo.**

Estos experimentos se realizaron con el objeto de saber si el tipo de diluyente influía en la cantidad de bacterias recuperadas de los tejidos de la canal. Los experimentos se realizaron en cortes de tejido muscular magro recién cortados obtenidos del área conocida como “tapa de paloma” de carne de bovino obtenida en la carnicería de un supermercado local y únicamente se utilizaron las cepas de Salmonella para hacer esta evaluación. Se realizaron cortes del tejido de 1.5 X 1.5 X 0.5 cm utilizando un sacabocados estéril. Con la ayuda de pinzas estériles los tejidos se colocaron dentro de tubos cónicos con 5 ml de DP y PBS cada uno por duplicado conteniendo el inóculo (coctel de 5 cepas de Salmonella) con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml y fueron mantenidos en dos condiciones de almacenamiento para permitir la adhesión de las bacterias: 1) temperatura ambiente (TA,  $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$ ) por 30 min y 2) temperatura alternada (TA-R-TA) que consistió en una combinación de almacenamiento a

temperatura ambiente ( $26.6 \pm 2.2^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min, seguido de refrigeración ( $4.8 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ ) por 24 h y de temperatura ambiente por 30 min. Después del almacenamiento se retiraron los tejidos y se homogeneizaron en 50 ml de DP y 50 ml de PBS en un Bag Mixer. Se realizó el recuento de UFC en agar LSPR mediante la técnica de recuento en superficie. Los resultados se expresaron en  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ .

Para determinar si el volumen del diluyente empleado influía en la cantidad de bacterias débilmente adheridas (BDA) y fuertemente adheridas (BFA) recuperadas al final de los enjuagues se realizó un experimento que consistió en colocar 3 ml del inóculo como se especificó en el punto anterior y los trozos de tejido muscular (por duplicado) en pozos de placas de poliestireno de 12 pozos (Costar, Corning Inc., NY, USA); además se incluyó un control positivo y un control negativo, asegurándose que las muestras de tejido quedaran sumergidas en el líquido. Las placas fueron mantenidas en las dos condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente, TA y TA-R-TA. El control positivo consistió en el tejido inoculado sin ningún tratamiento y el control negativo consistió en el tejido sin inocular y sin tratamiento. El tratamiento consistió en realizar enjuagues del tejido en 50 ó 100 ml de PBS. Las muestras de los controles positivo y negativo fueron retiradas con pinzas estériles y homogeneizadas en 50 ó 100 ml de PBS durante 2 min en un Bag Mixer para realizar diluciones decimales seriales y recuento en agar LSPR. Las muestras de tejido inoculadas fueron transferidas dos veces a pozos con 3 ml de PBS por 2-3 s para eliminar el exceso de bacterias no adheridas a la superficie y luego colocadas en tubos con 50 ó 100 ml de PBS y agitadas suavemente con 15 movimientos de vaivén para desprender las BDA cuyo recuento se realizó a partir del enjuague. Posteriormente las muestras fueron transferidas a bolsas de polietileno con 50 ml ó 100 ml de PBS y homogeneizadas en el Bag Mixer por 2 min para realizar el recuento de las BFA a partir del homogeneizado. Para los recuentos de BDA y BFA se realizaron diluciones decimales en DP y se inocularon alícuotas de 0.1 ml en placas de agar LSPR. En todos los casos las placas se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24-48 h para el recuento de UFC y los resultados se expresaron en  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ . Se realizaron dos réplicas de estos experimentos preliminares.

#### **6.4.2.2 Influencia del método de agitación en la recuperación de las bacterias adheridas al músculo.**

Algunos investigadores han empleado métodos de agitación mecánicos para desprender las BDA (Kim and Wei, 2007), por lo que este experimento se realizó para determinar si había una ventaja al agitar las muestras de tejido mecánicamente contra un método manual. Se realizó un experimento similar al descrito en el párrafo anterior utilizando las 5 cepas de Salmonella y las 4 cepas de E. coli fluorescentes para cuantificar las BDA y las BFA usando almacenamiento a TA por 30 min, enjuague en 50 ml de PBS, y dos variantes de agitación. La agitación manual consistió en 15 movimientos suaves de vaivén y la agitación mecánica consistió en agitación en un agitador recíproco (Eberbach) a 150 rpm/min durante 7 min. Los recuentos de BDA y de BFA se realizaron en agar LSPR y AST-AMP como se describió en experimentos anteriormente descritos.

#### **6.4.2.3 Determinación de la etapa del crecimiento de las bacterias.**

La adhesión de las bacterias a la superficie de alimentos y equipo se presenta de manera secuencial hasta la formación de biopelículas, e incluye las etapas de depósito, adhesión, colonización de la superficie y formación del exopolisacárido hasta su maduración (Stanley and Lazazzera, 2004; Palmer et al., 2007). Este experimento se realizó para conocer en cuál de éstas etapas se encontraban las bacterias durante las condiciones de almacenamiento de los tejidos. Se colocaron 3 ml del inóculo formado por una mezcla de 5 cepas de Salmonella y 4 de E. coli fluorescentes que contenía aproximadamente entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFC/ml en pozos de placas de poliestireno (Costar) de 12 pozos. En cada pozo se introdujo un trozo de músculo de 1.5 cm de diámetro. Los tejidos inoculados se mantuvieron en condiciones de TA y en TA-R-TA. Durante la primera condición de almacenamiento se retiraron los tejidos a los 0, 10, 20 y 30 min para realizar el recuento de UFC y en la segunda condición se retiraron los tejidos a los 0, 10, 20 y 30 min, 12, 18 y 24 h de refrigeración y a los 0, 10, 20 y 30 min de incubación a temperatura ambiente. Los tejidos se homogeneizaron con 50 ml de PBS en un Bag Mixer, se realizaron diluciones decimales en DP e inocularon en agar LSPR para el recuento de Salmonella y en agar AST-Amp para el recuento de E. coli.

Los resultados se expresaron en log UFC/cm<sup>2</sup>. Se realizaron dos réplicas del experimento.

### **6.4.3 Obtención de las muestras de tejidos de la canal de bovino**

Los tejidos de la canal de bovino que se estudiaron fueron músculo (sin fascia), conectivo (fascia), tendón, grasa y hueso. Las muestras fueron obtenidas a partir de canales de bovino en un rastro en la línea de sacrificio después del lavado final con agua y antes de que las canales fueran sometidas a refrigeración. Las muestras de músculo, fascia y hueso se tomaron del área del cuello realizando el corte en la última vértebra de las dos mitades de una misma canal. El tendón se obtuvo de la parte del brazuelo y la grasa fue obtenida del área que recubre los riñones. Las áreas de corte se muestran en la Figura 4. Los cortes se realizaron usando cuchillos y ganchos higienizados con alcohol al 70%. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas y transportadas en hielera refrigerada hasta su llegada al laboratorio en un periodo máximo de 30 min.

Se obtuvieron cortes de cada tejido usando utensilios estériles o higienizados con alcohol al 70% como pinzas, navajas de bisturí, sacabocados, tablas de picar, cuchillos, tijeras, pinzas de presión, charolas y una sierra de corte eléctrica. Se obtuvieron cortes de músculo, tendón y grasa de 1.5 cm de diámetro por 0.5 cm de espesor con la ayuda de un sacabocados. La fascia fue obtenida de la superficie de músculo, de tendón y grasa y cortada en trozos de 1.5 cm de diámetro usando también un sacabocados. El hueso consistió en cortes de 1.0 X 1.0 cm X 0.5 cm de grosor utilizando una sierra eléctrica (Jig Saw 7504 Type 5, Black & Decker, EUA) con la ayuda de pinzas de presión como se muestran en la Figura 5. Los cortes fueron colocados en bolsas de polietileno y mantenidos en refrigeración por un periodo no mayor a 2 h para protegerlos de la deshidratación y contaminación en tanto se utilizaban para los experimentos correspondientes.

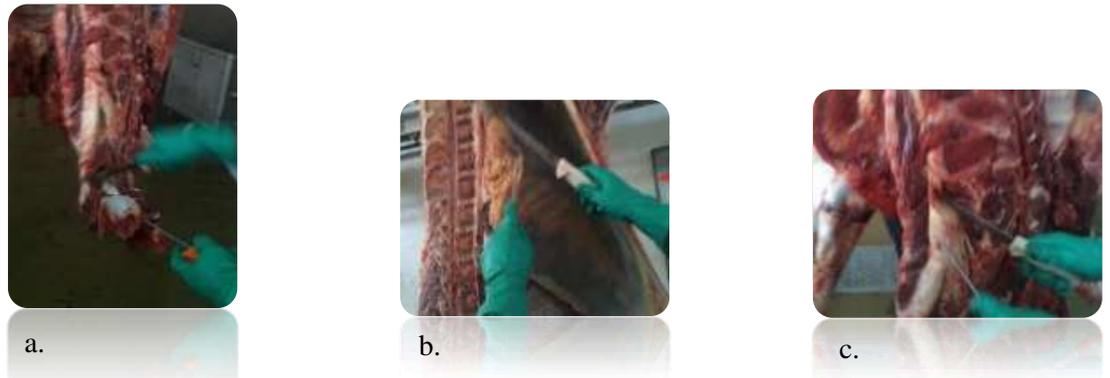
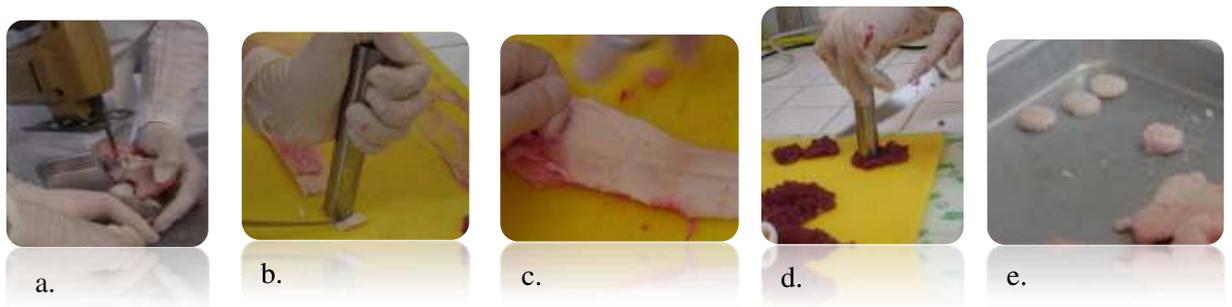


Figura 4. Toma de muestras de tejidos de la canal de bovino en el rastro: a) área de la última vértebra, b) área del riñón y c) área del brazo



Figuras 5. Obtención de los cortes de tejidos de la canal de bovino: a) hueso, b) tendón, c) fascia, d) músculo y e) grasa)

#### 6.4.4 Adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I a la superficie de tejidos de la canal de bovino

El inóculo fue preparado de la manera como se describió en el punto 6.4.1 y consistió en una mezcla de 5 cepas de Salmonella y 4 cepas de E. coli biotipo I fluorescentes a partir de cultivos individuales en CST, lavados, resuspendidos en PBS y mezclados en volúmenes iguales para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Volúmenes de 3 ml del inóculo fueron depositados en pozos de placas de poliestireno de 12 pozos (Corning, Inc.). Se utilizaron dos cajas de poliestireno de 12 pozos para cada tejido, una para el almacenamiento de los tejidos a temperatura ambiente (TA) por 30 min y la otra para el almacenamiento a temperatura alternada

(TA-R-TA). Los tejidos fueron colocados por duplicado en los pozos que contenían el inóculo asegurándose de que quedaran completamente sumergidos. Se incluyeron un control positivo y un control negativo en cada placa. El control positivo consistió del tejido inoculado sin tratamiento, mientras que el control negativo consistió en el tejido sin inocular y sin tratamiento.

A continuación, los tejidos fueron mantenidos bajo las dos condiciones de almacenamiento mencionadas para permitir la adhesión de las bacterias. Los tejidos de los controles positivo y negativo fueron retirados con pinzas estériles y homogeneizados en 50 ml de PBS durante 2 min usando un Bag Mixer. Por otra parte, los tejidos inoculados fueron transferidos al término del almacenamiento a pozos conteniendo 3 ml de PBS por 2-3 s en dos ocasiones sucesivas para eliminar el exceso de bacterias no adheridas y posteriormente fueron colocados en tubos con 50 ml de PBS y agitados suavemente con 15 movimientos de vaivén para desprender las bacterias débilmente adheridas a la superficie (BDA) cuyo recuento se realizó a partir de este enjuague. A continuación, los tejidos fueron transferidos a una bolsa de polietileno con 50 ml de PBS y homogeneizados en un Bag Mixer durante 2 min para realizar el recuento de las bacterias fuertemente adheridas (BFA). Para realizar los recuentos de BDA y BFA se realizaron diluciones decimales en DP y se inocularon alícuotas de 0.1 ml en placas de agar LSPR para el recuento de Salmonella y de AST-Amp para el recuento de E. coli. Las placas se incubaron a 35°C durante 18-24 h y se realizó el recuento de UFC de Salmonella (colonias rosas con centro negro) y de E. coli biotipo I. Los resultados se expresaron como  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ . Los experimentos se realizaron por triplicado. La fuerza de adhesión ( $S_R$ ) a los diferentes tejidos se calculó como:

$$S_R = (\# \text{ células no adheridas físicamente} - \# \text{ células físicamente adheridas}) / (\# \text{ células físicamente adheridas})$$
 (Dickson, Koohmaraie, 1989). En la Figura 6 se resume este procedimiento.

#### **6.4.5 Determinación de la actividad de agua de los tejidos y humedad relativa durante la experimentación**

Debido a que las muestras fueron sumergidas en el inóculo, esta condición podría modificar algunas características de la carne como es la actividad de agua (Aa) o la humedad relativa del microambiente donde se colocaron los tejidos durante los experimentos. Con el propósito de determinar la Aa y HR bajo las condiciones de los experimentos se colocaron 3 ml de PBS en placas de poliestireno de 12 pozos y los tejidos correspondientes bajo las dos condiciones de almacenamiento, TA por 30 min y temperatura alternada (TA-R-TA). La medición de la humedad relativa (HR) se realizó colocando un sensor (Dickson, Mod TH 300, USA) en la parte interna de la tapa de la placa de poliestireno. Para la medición de la actividad de agua (Aa), los tejidos se retiraron y se colocaron dentro de la cámara del medidor de Aa (Decagon, Pawkit water activity meter. Washington, USA). Las determinaciones se realizaron para las muestras almacenadas a TA a los 0 y 30 min y para las muestras almacenadas a TA-R-TA a los 0 y 30 min, a las 24 h y a los 30 min posteriores a las 24 h de incubación.

#### **6.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño de la investigación fue experimental y multifactorial. La cantidad de bacterias adheridas en los diferentes tejidos fueron comparados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), además se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), mediante el paquete estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 17 para Windows (SPSS Inc., 2008).



## **6.5 Comparación de la capacidad de agentes surfactantes para remover Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a superficies de la canal de bovino**

Se aplicaron tratamientos con los agentes surfactantes, Tween 20 (Hycel, México) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Promega Corporation, USA) ó también conocido como lauril sulfato de sodio, los cuales son sustancias GRAS (generalmente reconocidas como seguras, por su siglas en inglés) aprobadas para uso en alimentos, para evaluar y comparar su efecto en la remoción de Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a tres tejidos (músculo, fascia y hueso) de la canal de bovino. Debido a que en los resultados de los experimentos de la etapa anterior (sección 7.4) no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos, la selección de los tejidos para esta etapa se basó en otras consideraciones. Se eligió el tejido muscular pues aunque es uno de los tejidos en donde se han realizado mayor cantidad de estudios de adhesión y reducción de bacterias patógenas, es el tejido que más se aprovecha para la alimentación humana y para poder comparar los resultados con estudios ya reportados; la fascia ya que es uno de los tejidos de mayor constitución en las canales de bovino; y el hueso pues no se encontraron estudios relacionados con este tejido.

### **6.5.1 Experimentos preliminares**

#### **6.5.1.1 Efecto del SDS y Tween 20 sobre Salmonella inoculada en CST con y sin inclusión de caldo neutralizante.**

Estos experimentos se realizaron con el propósito de probar el efecto de varias concentraciones y tiempos de contacto del SDS y Tween 20 en cultivos de Salmonella con y sin inclusión de caldo neutralizante. El inóculo consistió en una mezcla de las cinco cepas de Salmonella cultivadas individualmente a 35°C por 18-24 h. Los cultivos fueron centrifugados y después de descartar el sobrenadante, se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS y entonces se mezclaron volúmenes iguales de cada cepa para tener una concentración entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Se probaron diferentes concentraciones y tiempos de contacto, todas las concentraciones probadas se realizaron por duplicado (una serie sin incluir caldo neutralizante y la otra incluyó caldo neutralizante). En el caso del SDS probaron las concentraciones de 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0,

3.0, 4.0 y 5.0%, 7.0, 10.0, y 20.0% (con un tiempo de contacto de 30s); las concentraciones de 5.0, 7.0, 10.0, y 20.0% del SDS (con tiempos de contacto de 2 y 5 min) y tanto para el SDS como para el Tween 20 se probaron las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0% con 5 y 10 min de tiempo de contacto. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada estéril; para el SDS éstas fueron en peso/volumen y para el Tween 20 en volumen/volumen. Los valores de pH de las soluciones variaron para el SDS de 5.78 a 7.78 y para el Tween 20 de 4.49 y 4.72. Volúmenes de 50 µl de cada solución se adicionaron individualmente a tubos con 4.0 ml de CST y se homogeneizaron en un vortex. A continuación, en la primera serie de tubos (uno de los duplicados) se adicionaron 50 µl del inóculo a cada tubo y después de su respectivo tiempo de contacto, se transfirió una alícuota de 1 ml del primer tubo de cada concentración a tubos con 9 ml de DP para realizar diluciones decimales y recuento en superficie de agar LSPR después de incubación a 35°/18 a 24 h. En la segunda serie de los tubos se transfirió 1 ml de cada tubo a 1 ml de caldo neutralizante Dey Engley (DE; BD) a doble concentración (2X), se mezclaron y después de 30 s se realizaron diluciones decimales y recuento en superficie de agar LSPR para su recuento. Los resultados se expresaron en log UFC/ml.

#### **6.5.1.2 Efecto del SDS y Tween 20 sobre Salmonella adherida a la superficie del músculo con y sin aplicación de masajeo.**

Este experimento se realizó para probar el efecto de los detergentes en la remoción de Salmonella adherida al músculo después del almacenamiento de los cortes de músculo a TA/30 min, con o sin la aplicación de masajeo durante el tratamiento con los surfactantes y para determinar si el masajeo influía o no en el efecto de los surfactantes. Cortes de músculo de 1.0 cm de diámetro y 0.5 cm de grosor obtenidos con sacabocados estéril y por duplicado se introdujeron en tubos cónicos con 5 ml de un coctel de 5 cepas de Salmonella ( $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC/ml, 4.5 ml de PBS y 50 µl de la mezcla de cepas). Duplicados de los tejidos fueron mantenidos a TA por 30 min para permitir la adhesión de las bacterias, y luego fueron transferidos a tubos con 30 ml de soluciones de SDS (p/v) y Tween 20 (v/v) al 2.0% durante 10 min de contacto. Durante el tratamiento con los agentes surfactantes a uno de los duplicados se aplicó masajeo

manual intermitente (2 min masaje - 2 min reposo - 2 min masaje - 2 min reposo - 2 min masaje), mientras que al otro duplicado no se le aplicó masajeo. Se incluyeron controles positivos (inoculado) y negativos (sin inocular), ambos sin tratamiento con los surfactantes. Para la recuperación de las bacterias se transfirió 1 ml del líquido de suspensión para realizar diluciones decimales en DP y realizar el recuento de las bacterias a partir del enjuague en placas de agar LSPR. Los resultados se expresaron en log UFC/cm<sup>2</sup>.

Con la finalidad de comparar el masajeo del tejido durante el tiempo de contacto con los agentes surfactantes con otra forma de agitación, se realizó nuevamente el experimento. La variante consistió en incluir durante el tiempo de contacto con los agentes surfactantes, la agitación de los tejidos en tubos cónicos con 50 ml de la solución de SDS y TW20 al 2.0% en forma suave (15 movimientos de vaivén) e intermitente durante 10 min (de igual forma que en el masajeo) y compararla contra éste. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas para realizar el recuento de BDA. El tejido se transfirió a bolsa con 50 ml de PBS y homogeneizó en Bag Mixer para realizar el recuento de las BFA en placas de agar LSPR, reportando los resultados en log UFC/cm<sup>2</sup>.

### **6.5.2 Obtención de muestras y cortes de tejidos de la canal de bovino**

Los tejidos seleccionados para estos estudios (músculo, fascia y hueso) fueron obtenidos a partir de canales de bovino en un rastro en la línea de sacrificio después del lavado final con agua y antes de que las canales fueran sometidas a refrigeración de la misma forma como se explicó en el apartado 8.4. Los cortes de tejidos se obtuvieron utilizando utensilios estériles o higienizados con alcohol al 70%. Los cortes de tejidos se obtuvieron siguiendo los mismos procedimientos mencionados en la sección 6.4.4, con las siguientes dimensiones, músculo (1.5 cm de diámetro X 0.5 cm de espesor), fascia (1.5 cm de diámetro) y hueso (1.0 X 1.0 cm X 0.5 cm de espesor) y fueron colocados en bolsas de polietileno y mantenidos en refrigeración por un periodo no mayor a 2 h hasta su utilización en los experimentos correspondientes.

### **6.5.3 Preparación de los cultivos e inóculos**

Las cepas de Salmonella y de E. coli biotipo I y la cepa control de S. Typhimurium (3 a 5 colonias de cada cepa) fueron cultivadas en CST-Rif y CST-Amp e incubaron a 35°C por 18-24 h, centrifugadas a 5,167 X g durante 10 min y lavadas con 10 ml PBS, después del segundo lavado los cultivos fueron homogeneizados en un agitador tipo vortex hasta disolución completa del paquete celular. Se mezclaron volúmenes iguales de cada cepa para obtener una concentración entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC/ml de la mezcla. Se comprobó la concentración por recuentos en superficie en agar LSPR y AST-Amp.

### **6.5.4 Capacidad de SDS y Tween20 para remover a Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie de tejidos de la canal de bovino**

Se utilizaron dos cajas de poliestireno de 12 pozos para cada tejido estudiado. En cada placa se depositaron 3 ml del inóculo en pozos para cada tejido (por duplicado) y tratamiento y controles y sólo PBS para el control negativo. El control positivo consistió en el tejido inoculado sin ningún tratamiento, el control del tratamiento fue inoculado y fue tratado con PBS pero no con los surfactantes y el control negativo consistió en el tejido sin inocular y sin ningún tratamiento. A continuación se colocaron los tejidos en cada pozo y se almacenaron a TA por 30 min y a TA-R-TA. Al final del almacenamiento se retiraron los tejidos del control positivo y del control negativo con pinzas estériles y se colocaron en bolsas con 50 ml de PBS para ser homogeneizadas en el Bag Mixer durante 2 min y realizar el recuento de UFC. El control del tratamiento fue retirado y colocado en tubo cónico con 50 ml de PBS para posteriormente realizar el recuento de BDA a partir del enjuague y el tejido fue transferido a una bolsa de plástico con 50 ml de PBS para el recuento de BFA. Para el caso de los tratamientos, el tejido fue retirado de los pozos y colocado en tubos cónicos con 50 ml de soluciones de Tween 20 y de SDS al 2% (pH de 4.7 y 6.0, respectivamente) durante 10 min a temperatura ambiente ( $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$ ) y agitación intermitente (reposo y agitación hasta completar 15 movimientos en 10 min) como se describió en el punto 8.5.1.2. Posteriormente se transfirieron a tubos con 50 ml de PBS y agitaron suavemente para realizar el recuento

de BDA a partir del enjuague. Finalmente los tejidos fueron colocados en bolsa de plástico con 50 ml de PBS para su homogeneización en el Bag Mixer y recuento de BFA. Se realizaron diluciones decimales de las muestras en DP e inocularon 0.1 ml en placas de LSPR para Salmonella y AST-Amp para el recuento de E. coli biotipo I fluorescente en el gabinete UV (UVP). Los resultados se expresaron en log UFC/cm<sup>2</sup>. Los experimentos fueron realizados por triplicado. En la Figura 7 se describe el procedimiento.

### **6.5.5 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño de la investigación fue experimental y multifactorial. La cantidad de bacterias adheridas o removidas por los detergentes fueron comparados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), usando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales, SPSS versión 17 para Windows (SPSS Inc., 2008).



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Prevalencia y resistencia antimicrobiana de serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino

#### 7.1.1. Prevalencia de Salmonella

Salmonella fue aislada en 78 (15.5%) de las 505 muestras recolectadas de la superficie de canales de bovino por el método de frotación por esponja en los cuatro rastros municipales en el Estado de Jalisco incluidos en el estudio. La frecuencia de aislamiento de Salmonella fue 28.6, 13.5, 13.3 y 6.4% para los rastros C, D, A y B, respectivamente (Tabla 3) y fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) para el rastro C. La frecuencia de aislamiento de Salmonella fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) de mayo a septiembre (22.0%, Tabla 2) meses que corresponden a la estación húmeda en esta región por la presencia de precipitación pluvial, comparada con la prevalencia observada en los meses de diciembre a abril (5.5%) que corresponden a la estación seca. El patógeno fue más frecuentemente aislado en el mes de septiembre (31.9%).

Un total de 78 aislamientos de Salmonella recuperados de las muestras recolectadas de la superficie de las canales de bovino (un aislamiento por cada muestra positiva) fueron serotipificados. Se identificaron un total de 13 serotipos y 4 serogrupos (aislamientos serotipificados parcialmente) (Tabla 4). Salmonella Give fue el serotipo más predominante y fue recuperado del 24.4% de las muestras, seguido por Salmonella Typhimurium (17.9%), Salmonella Grupo B (14.1%), Salmonella Infantis (10.3%) y Salmonella Anatum (5.1%). Se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la frecuencia de aislamiento de esos serotipos durante el período de tiempo estudiado. Salmonella Give predominó en agosto (10 de 14 aislamientos recuperados durante ese mes), Salmonella Grupo B predominó en junio (7 de 11 aislamientos) mientras que Salmonella

Typhinurium (11 de 29 aislamientos) y Salmonella Infantis (8 de 29 aislamientos) fueron los más frecuentemente aislados en septiembre.

La distribución de los serotipos fue diferente entre los establecimientos (Tablas 4 y 5). En el rastro A, se identificaron seis serotipos y dos serogrupos, en donde S. Infantis (35.3%) fue el serotipo más comúnmente aislado. En el rastro B se encontraron dos serotipos y dos serogrupos y S. Grupo B (37.5%) fue el más común. S. Give predominó en los rastros C y D, donde ocho y siete diferentes serotipos fueron identificados, respectivamente. En general, S. Give, S. Grupo B y S. Infantis fueron los más ampliamente distribuidos y se encontraron en muestras de canales de bovino de tres diferentes rastros; S. Havana, S. Muenster y S. Livingstone fueron encontrados exclusivamente en muestras del rastro A. S. Enteritidis, S. Panama y S. Sinstorf fueron aisladas exclusivamente en muestras del rastro D.

Tabla 3. Frecuencia de *Salmonella* spp. en canales de bovino en cuatro rastros municipales en Jalisco, México

Rastro	n <sup>a</sup>	No. muestras positivas/No. muestras analizadas													
		Época seca						Época húmeda						Total	% positivas
		Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	% positivas	May	Jun	Jul	Ago	Sep	% positivas		
A	128	0/21	0/0	1/21	0/21	0/0	1.6	3/21	0/0	4/23	0/0	9/21	24.6	17/128	13.3 x <sup>b</sup>
B	125	0/0	0/21	1/22	0/0	0/21	1.6	0/0	1/18	2/22	0/0	4/21	11.5	8/125	6.4 y
C	126	0/0	0/20	1/21	0/0	0/0	2.4	3/21	8/21	0/0	11/25	13/18	41.2	36/126	28.6 z
D	126	0/0	6/11	0/0	2/21	0/0	25.0	1/21	2/22	0/0	3/20	3/31	9.6	17/126	13.5 x
Total	505	0/21	6/52	3/64	2/42	0/21	5.5	7/63	11/61	6/45	14/45	29/91	22.0	78/505	15.5
%		0.0	11.5	4.7	4.8	0.0		11.1	18.0	13.3	31.1	31.9			

<sup>a</sup>Número de muestras de la superficie de canales de bovino analizadas.

<sup>b</sup>Valores en la misma columna con diferentes letras (xyz) indican una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

Tabla 4. Serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino en cuatro rastros municipales en Jalisco, México

Serotipos de Salmonella	No. aislamientos (%)	Rastro(s)
S. Give	19 (24.4)	A, C, D
S. Typhimurium	14 (17.9)	C, D
S. Infantis	8 (10.3)	A, C, D
S. Anatum	4 (5.1)	A, C
S. Bovismorbificans	3 (3.8)	B, C
S. Montevideo	3 (3.8)	C, D
S. Havana	2 (2.6)	A
S. Muenster	2 (2.6)	A
S. Enteritidis	1 (1.3)	D
S. Livingstone	1 (1.3)	A
S. Oranienburg	1 (1.3)	B
S. Panama	1 (1.3)	D
S. Sinstrof	1 (1.3)	D
Parcialmente serotipificados		
S. Grupo B	11 (14.1)	A, B, C
S. Grupo E1	3 (3.8)	A
S. Grupo B monofásico	1 (1.3)	C
S. Grupo E1 monofásico	1 (1.3)	B
No tipificable	2 (2.6)	B, D
Total	78 (100)	

Tabla 5. Diversidad de serotipos de Salmonella aislados de canales de bovino por Establecimiento

Rastro (No. aislamientos)	Serotipo	No. aislamientos (%)
A (17)	S. Infantis	6 (35.3)
	S. Grupo E1 <sup>a</sup>	3 (17.6)
	S. Havana	2 (11.8)
	S. Muenster	2 (11.8)
	S. Anatum	1 (5.9)
	S. Give	1 (5.9)
	S. Grupo B <sup>a</sup>	1 (5.9)
	S. Livingstone	1 (5.9)
B (8)	S. Grupo B <sup>a</sup>	3 (37.5)
	S. Bovismorbificans	2 (25.0)
	S. Grupo E1 monofásico <sup>a</sup>	1 (12.5)
	S. Oranienburg	1 (12.5)
	No tipificable	1 (12.5)
C (36)	S. Give	11 (30.6)
	S. Typhimurium	10 (27.8)
	S. Grupo B <sup>a</sup>	7 (19.4)
	S. Anatum	3 (8.3)
	S. Montevideo	2 (2.6)
	S. Grupo B monofásico <sup>a</sup>	1 (2.8)
	S. Bovismorbificans	1 (2.8)
	S. Infantis	1 (2.8)
D (17)	S. Give	7 (41.2)
	S. Typhimurium	4 (23.5)
	S. Enteritidis	1 (5.9)
	S. Infantis	1 (5.9)
	S. Montevideo	1 (5.9)
	S. Panama	1 (5.9)
	S. Sinstorf	1 (5.9)
	No tipificable	1 (5.9)

<sup>a</sup>Aislamientos parcialmente serotipificados.

### 7.1.2 Resistencia antimicrobiana

La susceptibilidad de los 78 aislamientos de Salmonella fue probada contra 11 antimicrobianos incluyendo penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, quinolonas, inhibidores de la vía del folato y fenicoles. Las pruebas revelaron que 48.7% de los aislamientos (38/78) fueron resistentes al menos a un antimicrobiano y 16.7% (13/78) tuvieron resistencia intermedia al menos a un antimicrobiano. La resistencia a TET fue el perfil más común y se presentó en el 46.2% de los aislamientos (36/78), seguido por la resistencia a STR en 42.3% (33/78), a CHL en 23.1% (18/78), a SXT en 21.8% (17/78), a GEN en 19.2% (15/78), a NAL en 17.9% (14/78), a AMP en 9% (7/78), a CEP en 3.8% (3/78) y a KAN en 1.3% (1/78). No se observó resistencia a CRO ni a CIP en ninguno de los 78 aislamientos analizados.

En el presente estudio, el 33.3% (26/78) de los aislamientos de Salmonella fueron resistentes a tres o más antimicrobianos, por lo que son considerados como multirresistentes (MR). Entre los aislamientos MR se encontraron que 13 correspondieron a S. Typhimurium, 8 a S. Grupo B, 1 a S. Grupo B monofásico, 1 a S. Havana, 1 a S. Infantis y 2 fueron no tipificables (Tabla 6). Los aislamientos MR de S. Typhimurium y S. Grupo B constituyeron el 80% de todos los aislamientos multirresistentes. En general, el fenotipo de multirresistencia más común fue GEN-TET-SXT-CHL-STR, el cual fue encontrado en siete aislamientos de S. Typhimurium, 1 aislamiento de S. Grupo B monofásico y un aislamiento de S. Infantis. La frecuencia de aislamientos multirresistentes de Salmonella fue significativamente mayor en el rastro C (44.7%,  $P \leq 0.05$ ), seguido por los rastros D (13.2%), B (7.9%) y A (2.6%).

Tabla 6. Perfiles de multirresistencia de aislamientos de *Salmonella* recuperados de canales de bovinos

Serotipo de <i>Salmonella</i>	Perfil de multirresistencia <sup>a</sup>	No. aislamientos (n=26)
S. Typhimurium	GEN-TET-SXT-CHL-STR <sup>b</sup>	7
	GEN-TET-SXT-CHL-NAL-STR <sup>c</sup>	5
	GEN-TET-SXT-CHL-KAN-STR	1
S. Grupo B	TET-NAL-STR	5
	AMP-CHL-STR-SXT-TET-NAL-CEP	1
	TET-CHL-NAL-STR	1
	AMP-TET-STR-CHL <sup>d</sup>	1
S. Grupo B monophasic	GEN-TET-SXT-CHL-STR <sup>b</sup>	1
S. Infantis	GEN-TET-SXT-CHL-STR <sup>b</sup>	1
S. Havana	AMP-TET-SXT-STR <sup>e</sup>	1
No tipificable	AMP-TET-NAL-CEP	1
	AMP-NAL-CEP <sup>f</sup>	1

<sup>a</sup>AMP=ampicilina, CEP=cefalotina, CHL=cloranfenicol, GEN=gentamicina, KAN=kanamicina, NAL=ácido nalidíxico, SXT=trimetoprim-sulfametoxazol, STR=estreptomina, TET=tetraciclina

<sup>b</sup>Susceptibilidad intermedia a KAN

<sup>c</sup>Susceptibilidad intermedia a CIP

<sup>d</sup>Susceptibilidad intermedia a SXT, CEP y NAL

<sup>e</sup>Susceptibilidad intermedia a NAL

<sup>f</sup>Susceptibilidad intermedia a CHL

## 7.2 Determinación de la concentración de bacterias indicadoras de calidad sanitaria en canales de bovino.

Los indicadores son utilizados para verificar el control de los procesos e identificar oportunidades para mejorarlos (ICMSF, 2002). También se han utilizado para evaluar los niveles de higiene durante el proceso de sacrificio para la obtención de la carne y aves. Con este fin diversos grupos de investigadores han determinado bacterias y grupos de bacterias como indicadores por ejemplo, las BMA, Enterobacteriaceae, *E. coli*, coliformes, *Pseudomonas* (Ghafir et al., 2008; McEvoy et al., 2004; Rahkio, Korkeala, 1996). En el presente estudio se determinó la concentración de BMA,

coliformes y E. coli en las canales de bovino en cuatro rastros municipales del Estado de Jalisco.

### 7.2.1. Bacterias mesófilas aerobias

La media de los recuentos de BMA en las 499 muestras analizadas para este grupo indicador estuvo entre 4.0 y 4.8 log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 7), encontrándose diferencias (P<0.05) entre sus recuentos en los cuatro rastros, observándose que el rastro D tuvo el valor promedio más alto de BMA.

Tabla 7. Recuentos de bacterias mesófilas aerobias (log UFC/cm<sup>2</sup>) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco

Rastro	No. muestras	Log UFC/cm <sup>2</sup> <sup>a</sup>			
		Mínimo	Máximo	Media	DE <sup>b</sup>
A	127	2.8	6.2	4.4 X <sup>c</sup>	0.7
B	122	1.4	6.9	4.0 Y	0.7
C	126	2.9	6.0	4.0 Y	0.6
D	124	1.5	6.8	4.8 Z	0.7
Total	499	1.4	6.9	4.3	0.7

<sup>a</sup> Logaritmo de unidades formadoras de colonias/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Dentro de cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

El 46.5% de las muestras tuvo recuentos entre 4.0 y 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup>. Con respecto a los resultados por rastro, el 48% de las muestras del rastro A tuvieron cuentas entre 4.0 y 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que en el rastro B el 96.6% de las muestras tuvo cuentas entre 3.0 y 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup>. Además, el mayor porcentaje de muestras de los rastros C y D, 58.7% y 59.7% respectivamente, se ubicaron entre 3.0 y 3.9 log UFC/cm<sup>2</sup> y el rastro D el entre 4.0 y 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 8). En general el mayor porcentaje de muestras tuvo recuentos entre 3.0 y 4.9 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Tabla 8. Niveles de bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco

Rastro	Log UFC/cm <sup>2</sup>	No. muestras	Frecuencia (%)	Frecuencia acumulada (%)
A	0 a 0.9	0	0.0	0
	1.0 a 1.9	0	0.0	0
	2.0 a 2.9	2	1.6	1.6
	3.0 a 3.9	39	30.7	32.3
	4.0 a 4.9	61	48.0	80.3
	5.0 a 5.9	23	18.1	98.4
	6.0 a 6.9	2	1.6	100
	<b>TOTAL</b>	<b>127</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
B	0 a 0.9	0	0.0	0
	1.0 a 1.9	1	0.8	0.8
	2.0 a 2.9	2	1.6	2.4
	3.0 a 3.9	57	46.7	49.1
	4.0 a 4.9	58	47.5	96.6
	5.0 a 5.9	3	2.5	99.1
	6.0 a 6.9	1	0.8	99.9
	<b>TOTAL</b>	<b>122</b>	<b>100.0</b>	<b>99.9</b>
C	0 a 0.9	0	0.0	0
	1.0 a 1.9	0	0.0	0
	2.0 a 2.9	1	0.8	0.8
	3.0 a 3.9	74	58.7	59.5
	4.0 a 4.9	39	31.0	90.5
	5.0 a 5.9	11	8.7	99.2
	6.0 a 6.9	1	0.8	100
	<b>TOTAL</b>	<b>126</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
D	0 a 0.9	0	0.0	0
	1.0 a 1.9	1	0.8	0.8
	2.0 a 2.9	0	0.0	0.8
	3.0 a 3.9	9	7.3	8.1
	4.0 a 4.9	74	59.7	67.8
	5.0 a 5.9	33	26.6	94.4
	6.0 a 6.9	7	5.6	100
	<b>TOTAL</b>	<b>124</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>

Es importante conocer la distribución de los recuentos de grupos indicadores en las diferentes épocas del año. Respecto a la distribución de la media de los recuentos de BMA en las épocas seca y húmeda del año estudiadas, se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las dos épocas y entre los rastros (Figura 8), en donde se puede apreciar que los recuentos de BMA fueron más altos en la época húmeda. Las canales del rastro D tuvieron niveles promedio de BMA más altos en la época seca (4.9

log UFC/cm<sup>2</sup>), mientras que las canales de los rastros A y D tuvieron recuentos más altos en la época húmeda (4.9 y 4.8 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente).

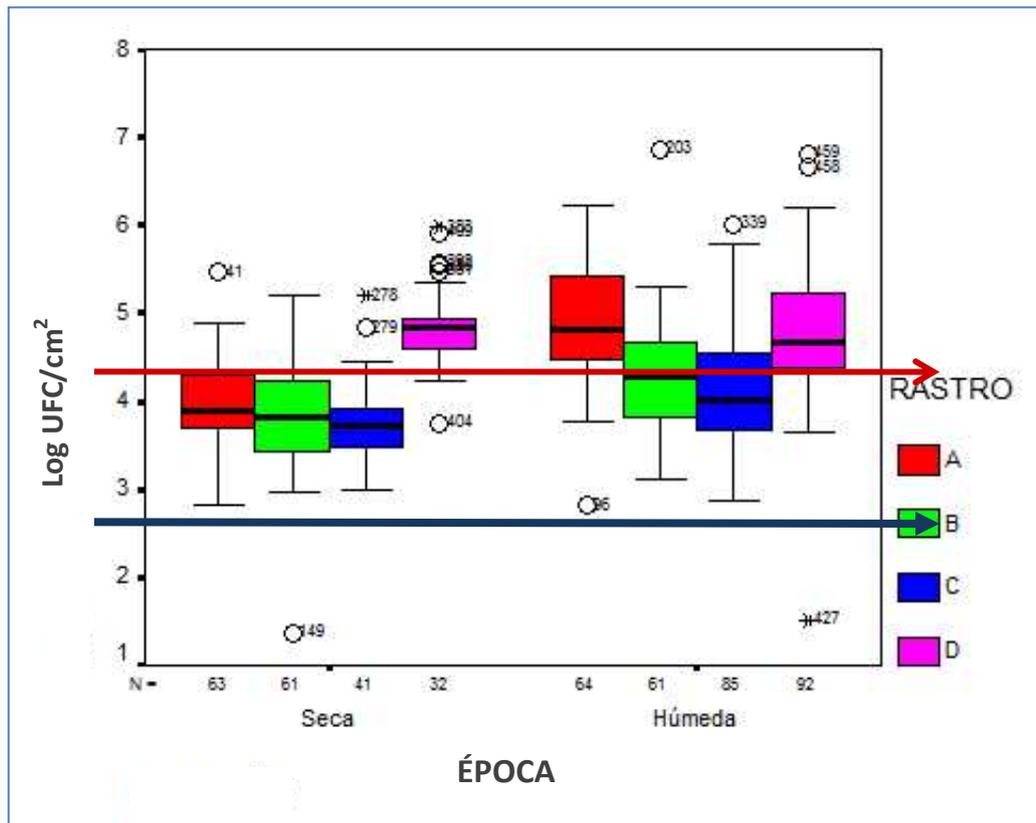


Figura 8. Distribución de los recuentos de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda

### 7.2.2 Coliformes totales

De las 501 muestras analizadas, el 99% (498) tuvieron cuentas de CT, el promedio de los recuentos fue de  $1.6 \pm 0.9$  log UFC/cm<sup>2</sup>, observándose recuentos más bajos ( $P \leq 0.05$ ) en las canales del rastro C. El valor mínimo observado fue de -0.6 y el máximo de 4.0 log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 9). De las 498 muestras con recuentos de CT, el 95.0% (datos no mostrados) tuvieron cuentas  $\leq 2.9$  log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 9). En la Tabla 10 se puede observar que en los rastros A, B y C el 58.6, 39.2 y 45.2% de las muestras, respectivamente, tuvieron cuentas entre 1.0 y 1.9 log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que el rastro D,

el 33.6 y 36.1% de las muestras tuvieron cuentas entre 1.0 a 1.9 y 2.0 a 2.9 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Tabla 9. Recuentos de coliformes totales (log UFC/cm<sup>2</sup>) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco

Rastro	No. muestras	CT log UFC/cm <sup>2</sup> <sup>a</sup>			
		Mínimo	Máximo	Media	DE <sup>b</sup>
A	128	0.2	3.6	1.7 Y <sup>c</sup>	0.7
B	125	-0.2	4.0	1.6 Y	0.9
C	126	-0.6	3.1	1.3 X	0.8
D	122	-0.6	3.9	1.8 Y	0.9
Total	501	-0.6	4.0	1.6	0.9

<sup>a</sup> Logaritmo de unidades formadoras de colonias/cm<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Dentro de cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (P≤0.05).

En la Figura 9 se observa la distribución de los recuentos promedio de CT en las dos épocas del año estudiadas y se aprecia que los recuentos de CT fueron mayores en la época húmeda (P≤0.05). El rastro D tuvo los recuentos más altos (P≤0.05) en la época seca (2.6 log UFC/cm<sup>2</sup>) y el rastro A mostró los recuentos más bajos (P≤0.05) en la época seca (1.3 log UFC/cm<sup>2</sup>).

Tabla 10. Niveles de coliformes totales en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco

Rastro	Log UFC/cm <sup>2</sup>	No. muestras	% Frecuencia	% Frecuencia acumulada
A	0 a 0.9	18	14.0	14
	1.0 a 1.9	75	58.6	72.6
	2.0 a 2.9	29	22.7	95.3
	3.0 a 3.9	6	4.7	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>128</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
B	0 a 0.9	32	25.6	25.6
	1.0 a 1.9	49	39.2	64.8
	2.0 a 2.9	38	30.4	95.2
	3.0 a 3.9	5	4.0	99.2
	4.0 a 4.9	1	0.8	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>125</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
C	0 a 0.9	50	39.7	39.7
	1.0 a 1.9	57	45.2	84.9
	2.0 a 2.9	18	14.3	99.2
	3.0 a 3.9	1	0.8	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>126</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
D	0 a 0.9	25	20.5	20.5
	1.0 a 1.9	41	33.6	54.1
	2.0 a 2.9	44	36.1	90.2
	3.0 a 3.9	12	9.8	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>122</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>

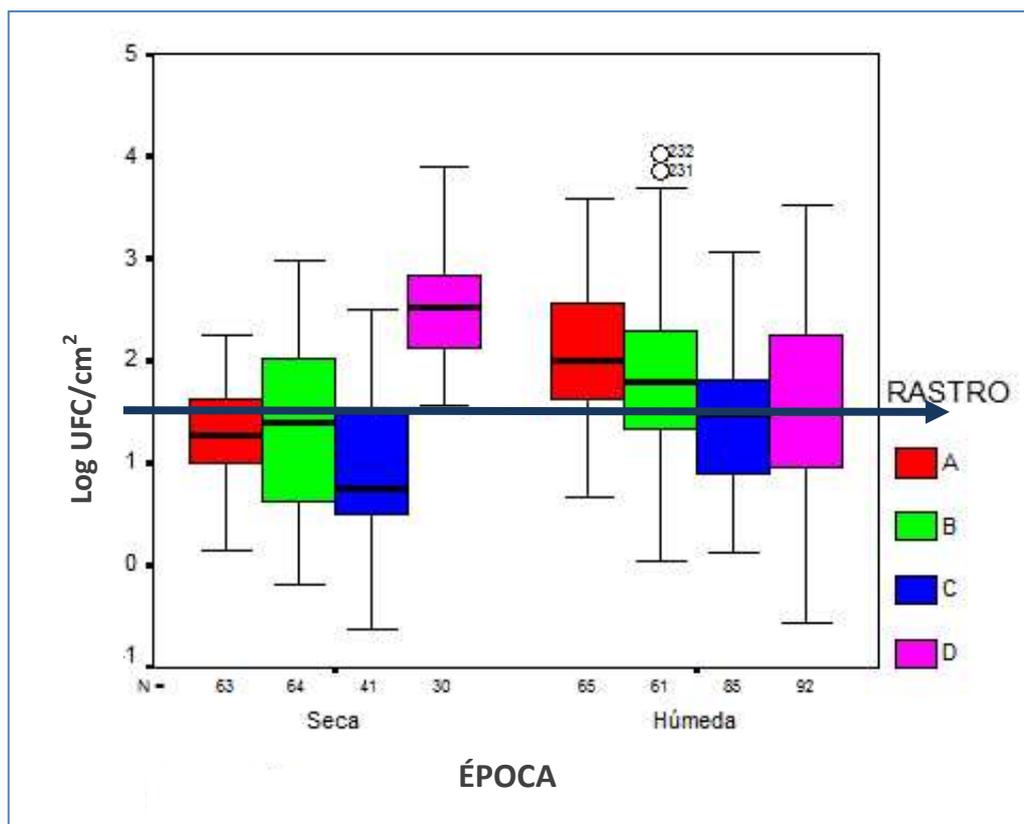


Figura 9. Distribución de los recuentos de coliformes totales (CT) en canales de bovino en rastos municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda.

### 7.2.3 Escherichia coli

De las 498 muestras analizadas, el 96% (478) resultaron positivas a la presencia de *E. coli*. La media de los recuentos fue de 1.0 log UFC/cm<sup>2</sup>, observándose que la media de los recuentos en el rastro C fue menor ( $P \leq 0.05$ ) respecto a la de los demás. Los valores mínimo y máximo observados fueron de -1.5 y 4.0 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (Tabla 11). Dentro de las muestras positivas a la presencia de *E. coli*, el 46.9% tuvo cuentas  $\leq 0.9$  log UFC/cm<sup>2</sup> y el 86.4% de las muestras tuvo recuentos  $< 1.9$  log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 11). En la Tabla 12 se puede observar que en los rastos A, B y D el mayor porcentaje de las muestras (86.0, 80.5 y 81.8%, respectivamente) tuvo recuentos de *E. coli*  $\leq 1.9$  log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que en el rastro C, el mayor porcentaje de muestras (65.9%) tuvo cuentas de 0.9 log UFC/cm<sup>2</sup> o menos.

Tabla 11. Recuentos de *Escherichia coli* (log UFC/cm<sup>2</sup>) en canales de bovino en rastros municipales del estado de Jalisco

Rastro	No. muestras	E. coli log UFC/cm <sup>2</sup> <sup>a</sup>			
		Mínimo	Máximo	Media	DE <sup>b</sup>
A	128	-0.4	3.1	1.1 Y <sup>c</sup>	0.7
B	123	-0.9	4.0	1.2 Y	1.0
C	126	-1.5	2.5	0.6 X	0.8
D	121	-1.5	3.0	1.1 Y	0.9
Total	498	-1.5	4.0	1.0	0.9

<sup>a</sup> Logaritmo de unidades formadoras de colonias/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Dentro de cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (P≤0.05)

Respecto a la distribución de los recuentos de *E. coli* en las dos épocas del año, se observaron recuentos significativamente más altos de *E. coli* en la época húmeda (P≤0.05), en donde los recuentos más altos de *E. coli* se observaron en los rastros A y B (1.5 y 1.6 log UFC/cm<sup>2</sup>) (Figura 10). Por otra parte, se observó una gran variabilidad (dispersión) en los recuentos de BMA (Tablas 7 y 8; Figura 8), de CT (Tablas 9 y 10; Figura 9) y de *E. coli* (Tablas 11 y 12; Figura 10).

Tabla 12. Niveles de Escherichia coli en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco

Rastro	Log UFC/cm <sup>2</sup>	No. muestras	Frecuencia (%)	Frecuencia acumulada (%)
A	0 a 0.9	54	42.2	42.2
	1.0 a 1.9	56	43.8	86.0
	2.0 a 2.9	17	13.3	99.2
	3.0 a 3.9	1	0.8	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>128</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
B	0 a 0.9	45	36.6	36.6
	1.0 a 1.9	54	43.9	80.5
	2.0 a 2.9	19	15.4	95.9
	3.0 a 3.9	5	4.1	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>123</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
C	0 a 0.9	83	65.9	65.9
	1.0 a 1.9	39	31.0	96.9
	2.0 a 2.9	4	3.2	100
	3.0 a 3.9	0	0.0	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>126</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>
D	0 a 0.9	52	43.0	43.0
	1.0 a 1.9	47	38.8	81.8
	2.0 a 2.9	21	17.4	99.2
	3.0 a 3.9	1	0.8	100
	4.0 a 4.9	0	0.0	100
	5.0 a 5.9	0	0.0	100
	6.0 a 6.9	0	0.0	100
	<b>TOTAL</b>	<b>121</b>	<b>100.0</b>	<b>100</b>

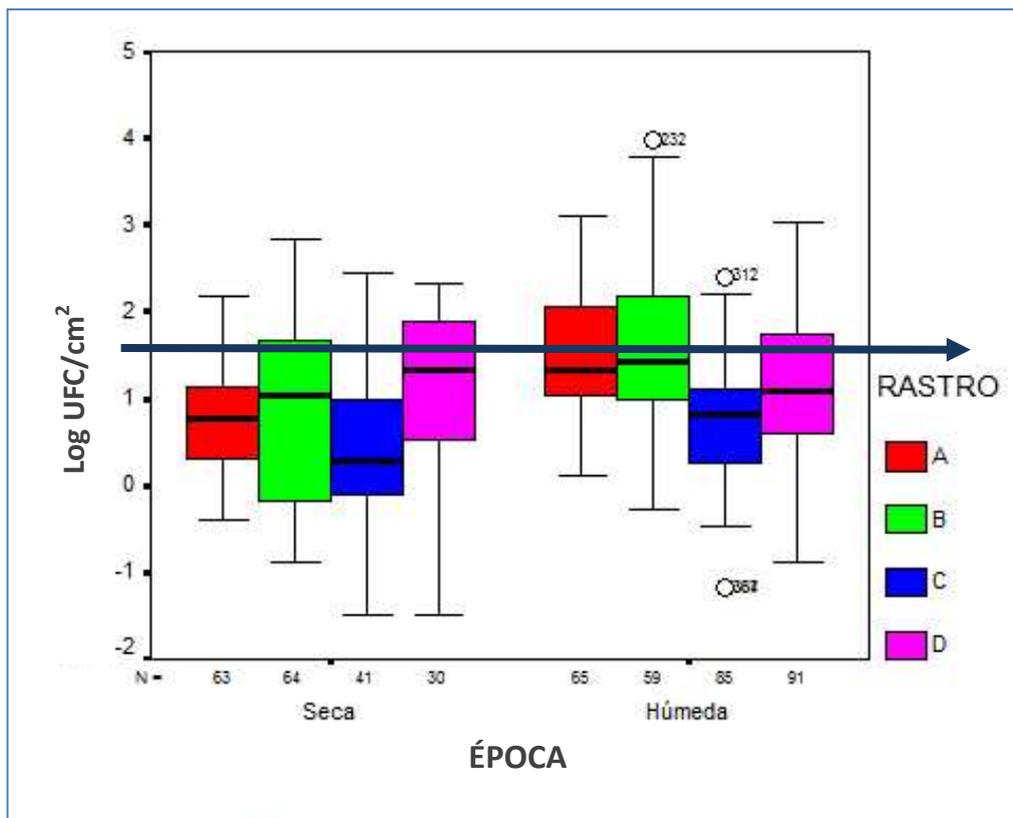


Figura 10. Distribución de los recuentos E. coli en canales de bovino en rastros municipales de Jalisco, durante las épocas seca y húmeda.

#### 7.2.4 Potabilidad del agua para lavado de las canales

Con la finalidad de conocer la influencia de la calidad microbiológica del agua utilizada en el lavado de las canales se tomaron algunas muestras, generalmente una por cada muestreo en los diferentes rastros y en las cuales se determinó el recuento de coliformes totales. Los resultados de la prueba de potabilidad del agua tomada del efluente de llave o manguera en el área de lavado de canales se muestran en la Tabla 13, y puede observarse que sólo en el rastro A las muestras cumplieron con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-2000 (Secretaría de Salud, 2000) y que 8 de 17 (47.1%) de las muestras no cumplieron con el límite permisible (ausencia o no detectable/100ml). No se determinaron coliformes fecales o E. coli.

Tabla 13. Número más probable de organismos coliformes en agua para el lavado de canales de bovino en rastros municipales

Rastro	No. muestras dentro de especificación	Límites de coliformes totales NMP/100ml
A	5 de 5	<2
B	1 de 4	<2 - 220
C	2 de 4	<2 - 130
D	0 de 4	5 - 21

### 7.3 Comparación de las propiedades de adhesión entre serotipos de Salmonella aislados y un grupo de cepas de Escherichia coli biotipo I previamente propuestas como organismos sustitutos

#### 7.3.1 Determinación de la hidrofobicidad

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana tales como la hidrofobicidad influyen en la adhesión bacteriana a las superficies, (van Loosdrecht et al., 1987). Se determinó la hidrofobicidad de cada aislamiento por el método de adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) descrito por Sweet et al (1987). Los valores promedio de hidrofobicidad (ABH, expresada en %) para las 78 cepas de Salmonella variaron de 15.6 a 45.8% y para las cuatro cepas de E. coli biotipo I marcadas con proteínas fluorescentes de 28.5 a 36.9%. El valor de la media de la ABH para Salmonella fue  $31.8 \pm 6.5\%$  y para E. coli biotipo I de  $31.9 \pm 4.0\%$ . En general no se observaron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) en los valores de ABH entre el grupo de cepas de Salmonella y el grupo de cepas de E. coli con excepción de una cepa de S. Anatum que presentó un valor de ABH significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) al resto de las cepas (45.8%) (Tabla 14 y Figura 11).

Respecto a los serotipos de Salmonella, los valores de ABH variaron de 15.6% (S. Panama) a 40.6% (S. Grupo E1 Monofásico) y se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre ellos. Los serotipos que mostraron los valores más altos de ABH fueron S. Enteritidis (37.9%), S. Grupo B Monofásico (38.7%) y S. Grupo E1 Monofásico, mencionado al inicio del párrafo.

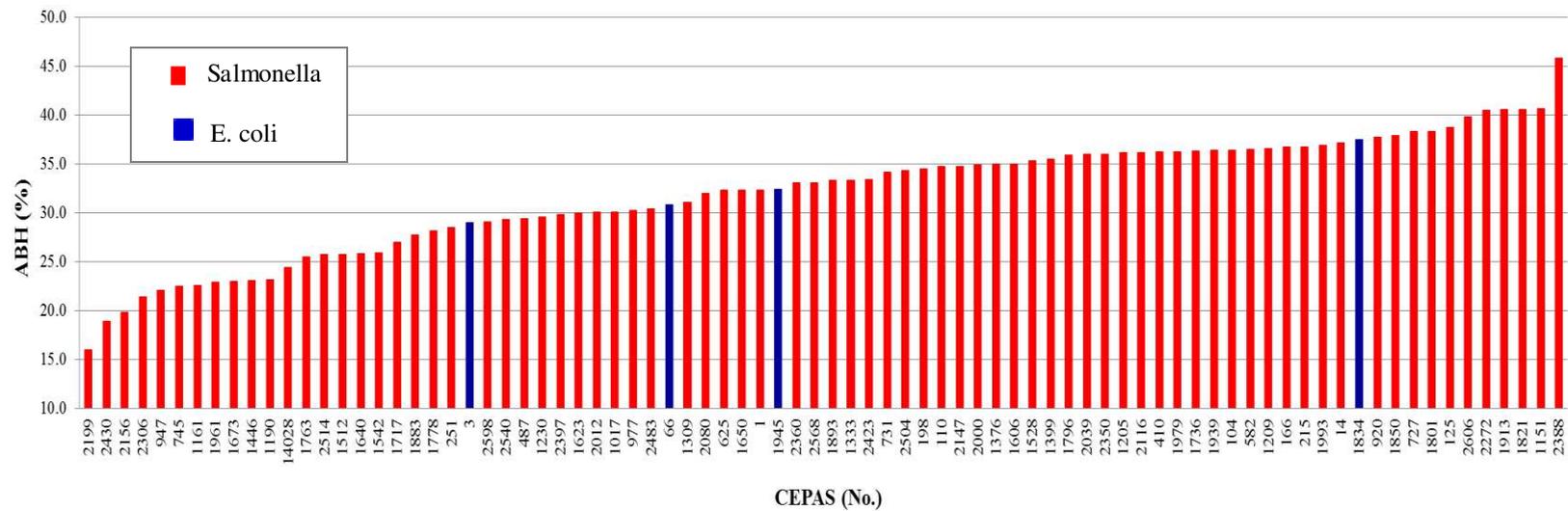


Figura 11. Valores promedio de la adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) de Salmonella y Escherichia coli biotipo I

Tabla 14. Valores de hidrofobicidad determinados mediante el método de adhesión bacteriana a los hidrocarburos (ABH) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I

No. cepa	Serotipo	ABH <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup>	No. cepa	Serotipo	ABH <sup>a</sup> ± DE <sup>b</sup>
104	Give	36.4 ± 1.5	1763	Give	24.4 ± 2.9
110	Montevideo	34.5 ± 2.9	1778	Give	27.7 ± 1.2
125	Give	38.3 ± 2.3	1796	Montevideo	35.5 ± 1.7
166	Give	36.5 ± 0.9	1801	Give	38.3 ± 1.6
198	Give	34.3 ± 2.4	1821	Give	40.6 ± 0.9
215	Give	36.7 ± 1.8	1834	Give	37.1 ± 1.3
251	Grupo B	28.1 ± 1.5	1850	Give	37.7 ± 1.0
410	Oranienburg	36.1 ± 0.7	1883	Give	26.9 ± 2.1
487	Bovismorbificans	29.3 ± 1.6	1893	Give	33.1 ± 2.5
582	Give	36.4 ± 2.4	1913	Grupo E1	40.5 ± 2.2
625	Give	32.0 ± 1.1	1939	Havana	36.3 ± 2.5
727	Enteritidis	37.9 ± 1.6	1945	Infantis	32.3 ± 0.5
731	Montevideo	33.4 ± 1.8	1961	Infantis	22.5 ± 0.6
745	Anatum	22.0 ± 1.7	1979	Give	36.2 ± 0.6
920	Anatum	37.5 ± 2.1	1993	Infantis	36.8 ± 1.1
947	Grupo G2	21.4 ± 2.1	2000	Infantis	34.7 ± 0.7
977	Livingstone	30.0 ± 2.3	2012	Infantis	29.9 ± 0.5
1017	Grupo E1	30.0 ± 2.3	2039	Infantis	35.9 ± 1.9
1151	Grupo E 1 Monofásico	40.6 ± 2.4	2080	No tipificable	31.1 ± 0.2
1161	Grupo B	22.5 ± 2.8	2116	Grupo B	36.1 ± 1.9
1190	Grupo B	23.0 ± 0.7	2147	Grupo B	34.7 ± 1.0
1205	Grupo B	36.0 ± 1.5	2156	Grupo B	18.9 ± 2.7
1209	Grupo B	36.5 ± 2.3	2199	Panama	15.6 ± 1.4
1230	Grupo B	29.4 ± 0.9	2272	Thyphimurium	39.8 ± 2.5
1260	Anatum	45.8 ± 0.8	2306	Infantis	19.8 ± 2.9
1309	Grupo B	30.8 ± 1.9	2350	Thyphimurium	35.9 ± 2.5
1333	Grupo B	33.3 ± 2.4	2360	Thyphimurium	32.4 ± 3.0
1376	Sinstorf	34.9 ± 2.3	2388	Thyphimurium	40.6 ± 2.0
1399	No tipificable	35.3 ± 1.5	2397	Thyphimurium	29.6 ± 0.9
1446	Muenster	23.0 ± 2.9	2423	Thyphimurium	33.3 ± 2.1
1512	Muenster	25.7 ± 1.2	2430	Thyphimurium	16.0 ± 3.1
1528	Anatum	35.0 ± 1.4	2483	Infantis	30.2 ± 1.8
1542	Grupo E1	25.8 ± 1.4	2504	Thyphimurium	34.1 ± 1.5
1606	Bovismorbificans	35.0 ± 2.7	2514	Give	25.4 ± 2.0
1623	Bovismorbificans	29.8 ± 1.4	2540	Thyphimurium	29.0 ± 1.8
1640	Thyphimurium	25.7 ± 1.0	2568	Thyphimurium	33.1 ± 2.0
1650	Thyphimurium	32.3 ± 2.0	2598	Thyphimurium	29.0 ± 1.3
1673	Thyphimurium	22.8 ± 1.8	2606	Grupo B Monofásico	38.7 ± 2.6
1717	Give	25.9 ± 0.8	14028	Typhimurium ATCC	23.1 ± 2.0
1736	Give	36.3 ± 0.8		14028	
1	E. coli RFP-1	32.9 ± 2.3	14	E. coli YFP-14	36.9 ± 2.5
3	E. coli GFP-3	28.5 ± 1.9	66	E. coli YFP-66	30.4 ± 2.8

<sup>a</sup> Adhesión bacteriana a los hidrocarburos. Los valores representan la media de seis repeticiones

<sup>b</sup> Desviación Estándar

### **7.3.2 Capacidad de Salmonella y E. coli biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes**

En experimentos preliminares se comparó la recuperación de biopelículas en acero inoxidable mediante hisopado y agitación con vortex, encontrándose mayor cantidad de biopelículas con el método de agitación con vortex ( $P \leq 0.05$ ). En los experimentos preliminares en donde se evaluó a formación de biopelículas durante 6, 12, 24 y 48 h en acero inoxidable para determinar el tiempo en el que se forma la mayor cantidad de biopelícula, no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre los recuentos obtenidos a los diferentes tiempos evaluados (4.7, 4.6, 4.5 y 4.8 log UFC/cm<sup>2</sup>). Tampoco se encontraron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) cuando se comparó la cantidad de biopelícula formada en la superficie de acero inoxidable con reemplazo del caldo cada 48 h durante un período de 7 días a  $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$  y sin reemplazo (4.9 y 4.7 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente). De acuerdo con estos resultados se definieron las variables a utilizar en los experimentos las cuales incluyeron el método de agitación en vortex para el desprendimiento de las biopelículas y se eligieron los tiempos de 24 h y 7 d para el recuento de las biopelículas.

#### **7.3.2.1 Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable**

En general, las medias de las cuentas (log UFC/cm<sup>2</sup>) de las biopelículas formadas en la superficie de acero inoxidable variaron de  $4.3 \pm 0.2$  a  $5.6 \pm 0.4$  (Tabla 15), observándose diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de biopelícula formada entre las diferentes cepas de Salmonella y E. coli, en 24 h y 7 días. Aunque la diferencia entre la cantidad de biopelícula formada en 24 h y 7 días fue significativamente diferente de acuerdo con el análisis estadístico de los datos ( $P \leq 0.05$ ), la media de las cuentas de cada tiempo fue de  $4.6 \pm 0.4$  y  $4.8 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, lo cual en realidad no representa una diferencia en la concentración de microorganismos que pueda tener una importancia práctica (Tablas 15, 16 y 17).

En 24 horas, el promedio de las cuentas de biopelículas para Salmonella y E. coli fue de  $4.6 \pm 0.4$  y  $4.7 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que en 7 días fue de  $4.7 \pm 0.4$  y  $5.1 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente. En este tiempo (24h), las tres cepas con mayor

producción de biopelículas fueron la cepa de *S. Give* número 582 ( $5.7 \pm 0.3 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), *S. Typhimurium* ATCC 14028 ( $5.3 \pm 0.5 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), la cepa de *S. Bovismorbificans* número 487 ( $5.6 \pm 0.3 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) y entre las cepas de *E. coli* biotipo I, la cepa RFP-1 ( $4.8 \pm 0.3 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) y la YFP-66 ( $5.1 \pm 0.4 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), aunque la diferencia no fue significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre las cinco cepas (Tabla 15 y 16; Figura 12). Respecto a las cepas que produjeron la mayor cantidad de biopelícula en 7 días, fueron la cepa de *S. Give* #582 ( $5.5 \pm 0.5 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), la cepa de *S. Bovismorbificans* #487 ( $5.1 \pm 0.4 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) y *S. Havana* #1939 ( $5.07 \pm 0.5 \log \text{ UFC/cm}^2$ ). De las cepas de *E. coli* la cepa YFP-66 ( $5.6 \pm 0.2 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) y la cepa RFP-1 ( $5.3 \pm 0.4 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) fueron las mejores productoras de biopelícula.

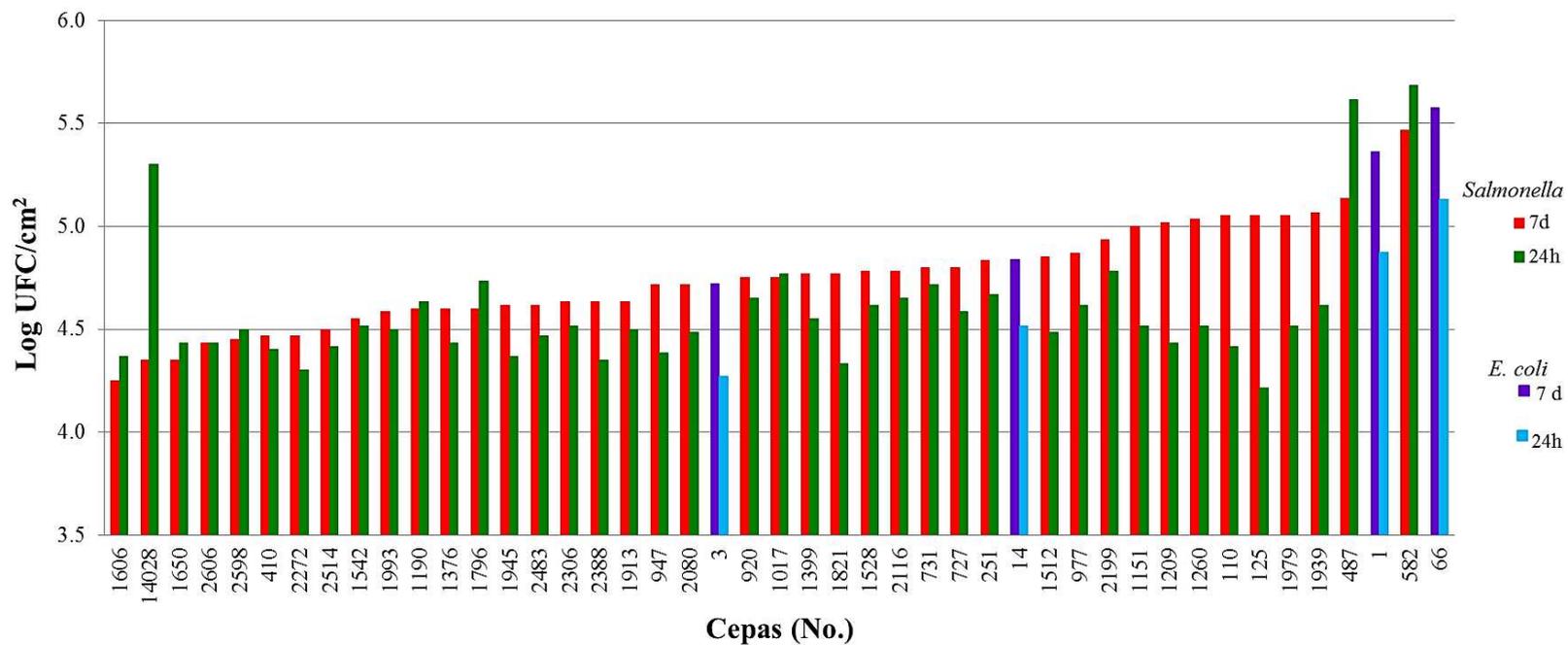


Figura 12. Promedio de los recuentos (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de biopelículas formadas por *Salmonella* y *Escherichia coli* en acero inoxidable después de incubar en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días

Tabla 15. Recuento de Salmonella<sup>a</sup> y de Escherichia coli biotipo I en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas y 7 días

No. cepa <sup>a</sup>	Serotipo <sup>b</sup>	Media ± Desviación estándar (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>			
		Acero inoxidable		Látex	
		24 h	7d	24 h	7d
1017	S. Grupo E1	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.1	4. ± 0.3
110	S. Montevideo	4.4 ± 0.4	5.1 ± 0.5	4.9 ± 0.1	5. ± 0.3
1151	S. Grupo E monofásico	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.1	5. ± 0.2
1190	S. B rugoso	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5. ± 0.3
1209	S. Grupo B rugoso	4.4 ± 0.1	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5. ± 0.2
125	S. Give	4.2 ± 0.1	5.1 ± 0.5	4.8 ± 0.5	4. ± 0.3
1260	S. Anatum	4.5 ± 0.4	5.0 ± 0.3	4.8 ± 0.1	5. ± 0.2
1376	S. Sinstorf	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4. ± 0.3
1399	Salmonella no	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5. ± 0.2
14028	S. Typhimurium ATCC	5.3 ± 0.5	4.4 ± 0.2	5.3 ± 0.5	5. ± 0.2
1512	S. Muenster	4.5 ± 0.3	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5. ± 0.2
1528	S. Anatum	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.0 ± 0.2	4. ± 0.3
1542	S. Grupo E1	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.5	4.9 ± 0.2	4. ± 0.5
1606	S. Bovismorbificans	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.9 ± 0.3	4. ± 0.2
1650	S. Typhimurium	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.2	4. ± 0.2
1796	S. Montevideo	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.5	5.1 ± 0.3	5. ± 0.2
1821	S. Give	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.4	5.0 ± 0.2	4. ± 0.3
1913	S. Grupo E1	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5. ± 0.4
1939	S. Havana	4.6 ± 0.4	5.1 ± 0.5	4.8 ± 0.3	4. ± 0.4
1945	S. Infantis	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.4	4.8 ± 0.3	5. ± 0.2
1979	S. Give	4.5 ± 0.2	5.1 ± 0.6	4.9 ± 0.4	4. ± 0.4
1993	S. Infantis	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4. ± 0.1
2080	Salmonella no tipificable	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.2	4. ± 0.1
2116	S. Grupo B rugoso	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.3	5. ± 0.1
2199	S. Panama	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5. ± 0.2
2272	S. Typhimurium	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.9 ± 0.1	4. ± 0.3
2306	S. Infantis	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3	5. ± 0.2
2388	S. Typhimurium	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.2	4. ± 0.4
2483	S. Infantis	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.4	4.8 ± 0.2	5. ± 0.4
251	S. Grupo B rugoso	4.7 ± 0.4	4.8 ± 0.4	5.1 ± 0.3	5. ± 0.2
2514	S. Give	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.4	5. ± 0.3
2598	S. Typhimurium	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.5	5. ± 0.4
2606	S. Grupo B monofásico	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.3	4.9 ± 0.2	4. ± 0.1
410	S. Oranienburg	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5. ± 0.4
487	S. Bovismorbificans	5.6 ± 0.3	5.1 ± 0.4	5.9 ± 0.4	5. ± 0.3
582	S. Give	5.7 ± 0.3	5.5 ± 0.5	6.2 ± 0.2	5. ± 0.3
727	S. Enteritidis	4.6 ± 0.1	4.8 ± 0.5	4.9 ± 0.2	5. ± 0.2
731	S. Montevideo	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2	5. ± 0.4
920	S. Anatum	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.3	5. ± 0.2
947	S. Grupo G2 rugoso	4.4 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5. ± 0.2
977	S. Livingstone	4.6 ± 0.4	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.3	5. ± 0.4

<sup>a, b</sup> Cepas y serotipos de Salmonella aisladas de canales de bovino excepto la cepa 14028 que corresponde a S. Typhimurium ATCC 14028

<sup>c</sup> Representa la media de 6 repeticiones

Tabla 16. Recuento de *Escherichia coli*<sup>a</sup> biotipo I en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas y 7 días

Cepa <sup>a</sup>	Media ± Desviación estándar (Log UFC/cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>			
	Acero inoxidable		Látex	
	24 h	7d	24 h	7d
E. coli RFP-1	4.9 ± 0.3	5.4 ± 0.4	4.9 ± 0.4	5.0 ± 0.3
E. coli GFP-3	4.3 ± 0.5	4.7 ± 0.4	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.4
E. coli YFP-14	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.3	4.9 ± 0.6	5.2 ± 0.2
E. coli YFP-66	5.1 ± 0.4	5.6 ± 0.2	5.0 ± 0.3	5.3 ± 0.3
Promedio (tablas 2 y 3)	4.6 ± 0.4	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.4	5.0 ± 0.4

<sup>a</sup> Cepas de *E. coli* biotipo I fluorescentes marcadas con proteína fluorescente

<sup>b</sup> Representa el promedio de 6 repeticiones

En el presente estudio los recuentos promedio de las cepas de *E. coli* quedaron incluidos dentro del rango de los valores observados para las cepas de *Salmonella*. Se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre los serotipos y en algunos casos en el mismo serotipo entre 24 y 7 días (Figura 13). Los serotipos que mostraron mayor producción de biopelícula fueron *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (cepa control) con  $5.3 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup>, *S. Bovismorbificans* con  $5.0 \pm 0.7$  log UFC/cm<sup>2</sup> y *S. Panama* con  $4.8 \pm 0.2$  log UFC/cm<sup>2</sup>. En 7 días no hubo diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre los serotipos.

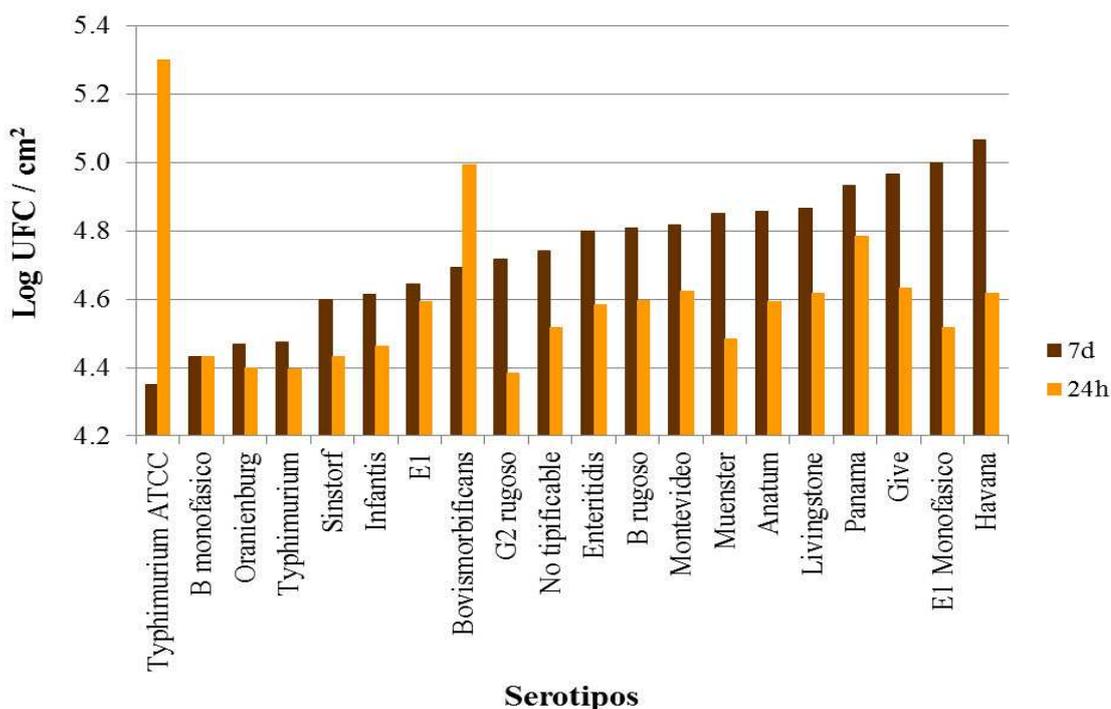


Figura 13. Promedio de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de acero inoxidable incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días

### 7.3.2.2 Cuantificación de biopelículas en látex

En látex, la media general de las cuentas de biopelículas estuvo entre  $4.7 \pm 0.3$  y  $6.2 \pm 0.3$  log UFC/cm<sup>2</sup> (Tablas 15 y 16). En general se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de biopelícula formada por las diferentes cepas de Salmonella y también por las cepas de E. coli en 24 h y 7 días, pero no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre el grupo de cepas de Salmonella y el de E. coli. La media de las cuentas de biopelículas para Salmonella en 24 horas y 7 días fue de  $5.0 \pm 0.4$  log UFC/cm<sup>2</sup> y para E. coli en 24 h y 7 días fue de  $5.0 \pm 0.4$  y  $5.2 \pm 0.3$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (Tablas 15, 16 y 17).

Después de 24 h de incubación, las cepas de E. coli produjeron cantidades similares de biopelículas que muchas de las cepas de Salmonella. En este tiempo las cepas que obtuvieron los valores más altos de biopelículas fueron las cepas de S. Give (582), S. Bovismorbificans (487) y S. Typhimurium ATCC 14028 de Salmonella con 6.2

$\pm 0.2$ ,  $5.9 \pm 0.4$  y  $5.3 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, aunque las diferencias sólo fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las cepas 582 y 14028 (Tabla 15 y 16; Figura 14). Después de 7 d de incubación, las cepas de *E. coli* mostraron mayor similitud en las cantidades de biopelículas producidas con respecto de las cepas de *Salmonella*, sin observarse diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). Además, se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre algunos serotipos y en el mismo serotipo entre 24 h y 7 días (Figura 15).

Tabla 17. Media del recuento de *Salmonella*<sup>a</sup> y de *Escherichia coli* biotipo I en superficies de acero inoxidable, látex y poliestireno incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas y 7 días

Superficie inerte	Tiempo de incubación	Media $\pm$ Desviación estándar	
		<i>Salmonella</i> spp <sup>a</sup>	<i>E. coli</i> biotipo I <sup>b</sup>
Acero (Log UFC/cm <sup>2</sup> )	24 horas	4.6 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.5
	7 días	4.7 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.5
Látex (Log UFC/cm <sup>2</sup> )	24 horas	5.0 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.4
	7 días	5.0 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.3
Poliestireno (Absorbancia 550 nm)	24 horas	0.106 $\pm$ 0.317	0.056 $\pm$ 0.767
	7 días	0.650 $\pm$ 0.513	0.678 $\pm$ 0.471

<sup>a</sup>Representa la media del recuento de 78 cepas de *Salmonella* aisladas de canales de bovino y la cepa control *S. Typhimurium* ATCC 14028

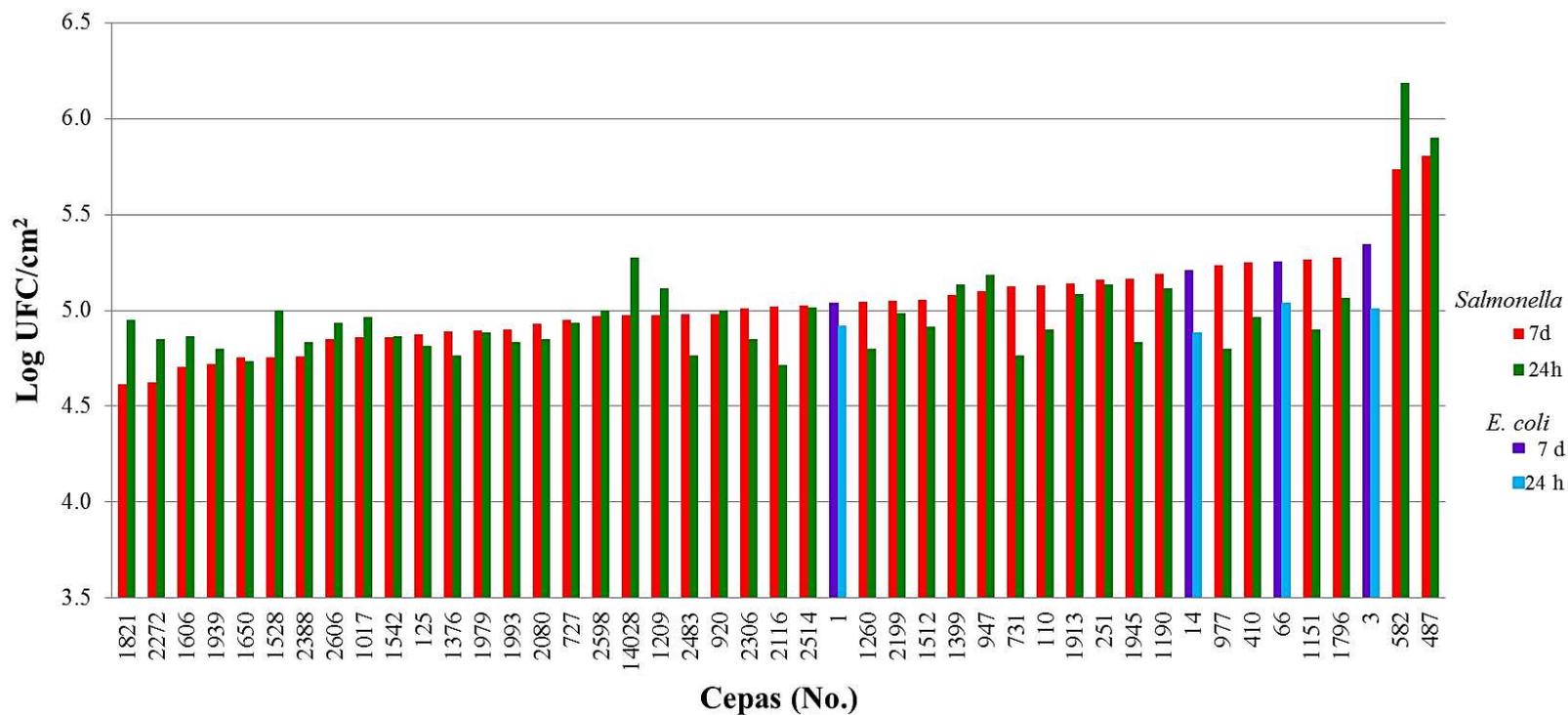


Figura 14. Medias (log UFC/cm<sup>2</sup>) de las cuentas de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y Escherichia coli en superficies de látex incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días

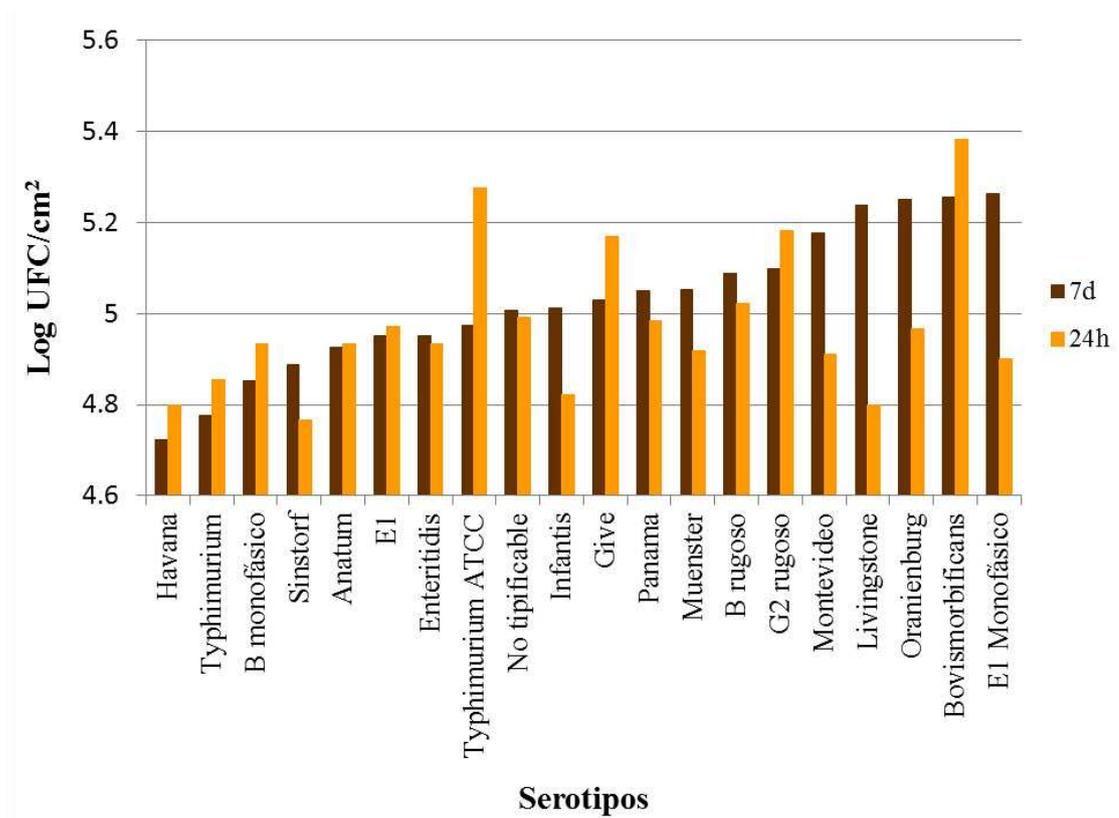


Figura 15. Medias (log UFC/cm<sup>2</sup>) de las cuentas de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de látex incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 h y 7 días

### 7.3.2.3 Comparación entre la cantidad de biopelícula formada en acero inoxidable y látex

Se comparó la cantidad de biopelícula formada por las diferentes cepas tanto en acero inoxidable como en látex, encontrando que en general tanto en Salmonella como en E. coli una mayor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) de bacterias se adherieron formando biopelículas en látex que en acero, aunque en términos de logaritmos éstas diferencias no sean grandes (Tabla 17), pero fueron más marcadas entre algunas cepas (Figuras 16 y 17) en los dos tiempos de incubación.

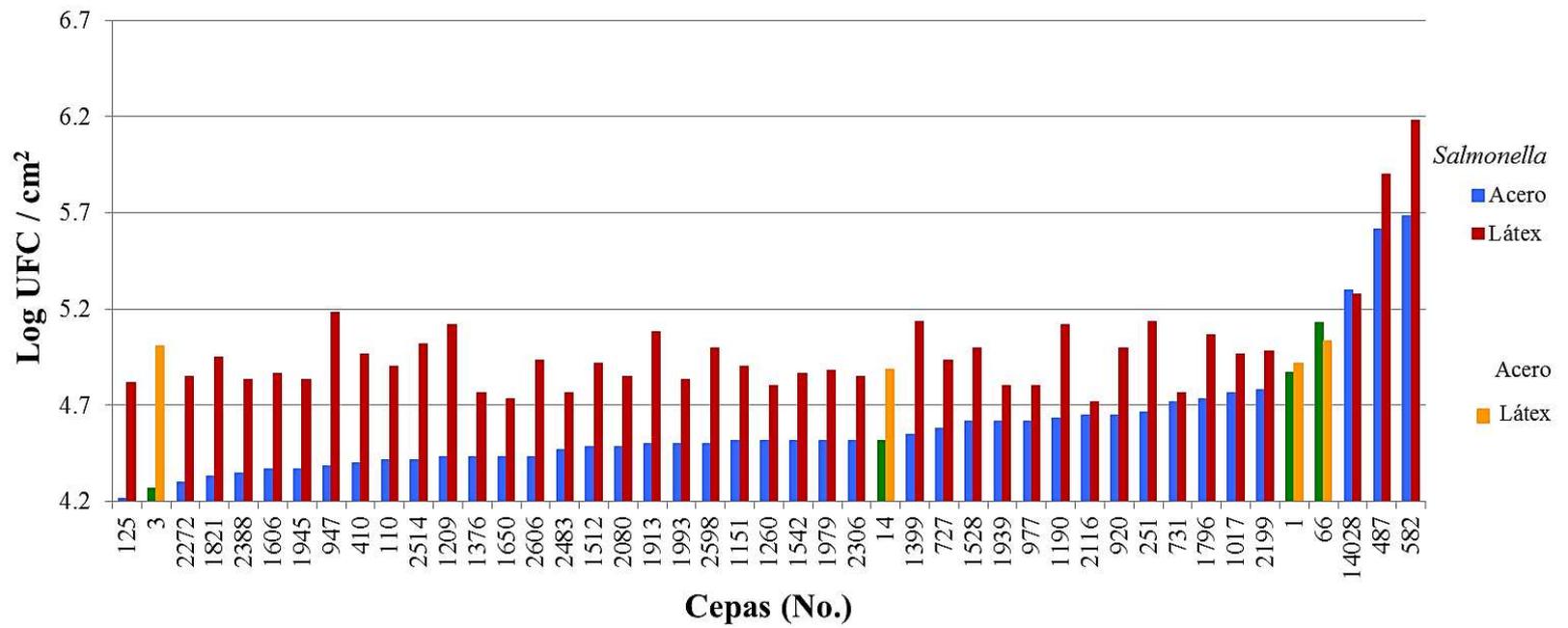


Figura 16. Promedio de los recuentos (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y Escherichia coli en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 24 horas

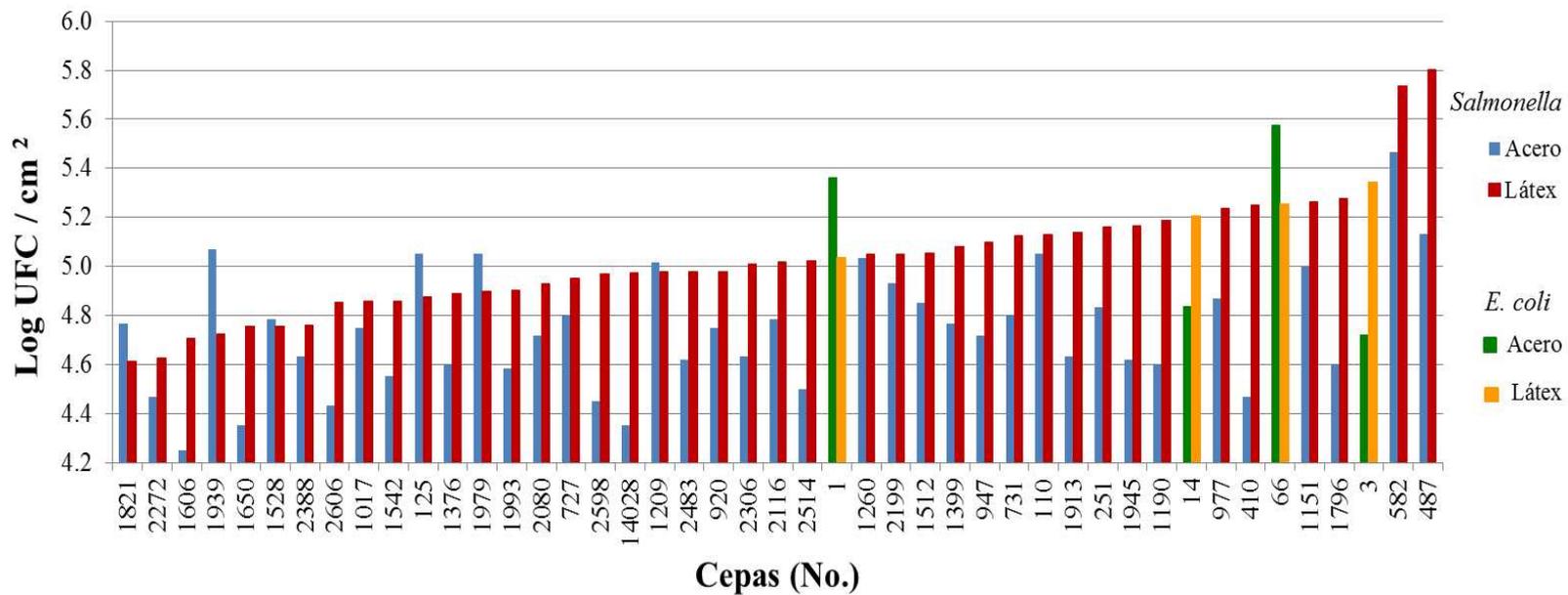


Figura 17. Promedio de los recuentos (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y Escherichia coli en superficies de acero inoxidable y látex incubadas en caldo soya tripticaseína a 26°C durante 7 días

#### 7.3.2.4 Cuantificación de biopelículas en poliestireno

En las biopelículas formadas en poliestireno, la media general de los valores de absorbancia a 550 nm en las dos condiciones de tiempo varió desde  $-0.003 \pm 0.006$  hasta  $1.859 \pm 0.578$ . También se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de biopelícula formada por las cepas entre 24 horas y 7 días, los promedios de absorbancia fueron en 24 horas  $0.102 \pm 0.304$  y en 7 días de  $0.653 \pm 0.509$  (Tablas 17 y 18).

En 24 horas, la media de los valores de absorbancia a 550 nm de biopelícula para *Salmonella* y *E. coli* fue  $0.106 \pm 0.317$  y  $0.055 \pm 0.077$  respectivamente. La respectiva media en 7 días para ambas bacterias fue de  $0.651 \pm 0.513$  y  $0.678 \pm 0.471$  (Tabla 18 y Figura 86). A las 24 h las cepas con los valores mayores de absorbancia a 550 nm fueron la cepa #582 de *S. Give* ( $1.423 \pm 0.194$ ), la cepa #487 de *S. Bovismorbificans* ( $1.331 \pm 0.424$ ) y la cepa #2272 de *S. Typhimurium* ( $0.596 \pm 0.258$ ) y dentro de las *E. coli* la cepa RFP-1 ( $0.110 \pm 0.061$ ), la única cepa diferente ( $P \leq 0.05$ ) del resto fue la cepa 2272 de *S. Typhimurium*. A los siete días las cepas que tuvieron los valores mayores de absorbancia a 550 nm fueron la cepa #582 ( $1.859 \pm 0.578$ ), la cepa #487 ( $1.746 \pm 0.310$ ) y la cepa #1606 ( $1.274 \pm 0.271$ ), la cepa control de *S. Typhimurium* ATCC 14028 estuvo en el cuarto lugar ( $1.218 \pm 0.739$ ) y dentro de las *E. coli* la cepa YFP-66 tuvo los valores más altos ( $0.932 \pm 0.191$ ) seguida de la cepa YFP-14 ( $0.920 \pm 0.539$ ), aunque entre todas ellas no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ). Los valores de absorbancia de las cepas de *E. coli* biotipo I quedaron incluidos entre los respectivos valores de *Salmonella*.

A las 24 horas la mayor concentración de biopelícula ( $P \leq 0.05$ ; absorbancia a 550 nm) correspondió a los serotipos *S. Bovismorbificans* ( $0.729 \pm 0.633$ ), seguido de *S. Give* ( $0.289 \pm 0.582$ ) y *S. Typhimurium* ( $0.169 \pm 0.280$ ), éstos dos últimos no fueron diferentes ( $P \geq 0.05$ ) entre sí. A los siete días *S. Bovismorbificans* ( $1.510 \pm 0.371$ ), *S. Typhimurium* ATCC 14028 ( $1.218 \pm 0.740$ ), *S. E1 Monofásico* ( $1.159 \pm 0.129$ ), y *S. B Monofásico* ( $1.122 \pm 0.260$ ), aunque entre éstos no hubo diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) (Tabla 18 y Figura 19).

Tabla 18. Valores de absorbancia a 550 nm de Salmonella<sup>a</sup> y E. coli biotipo I en superficie de poliestireno incubadas con caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días

No. cepa <sup>a</sup>	Serotipo <sup>b</sup>	Media ± Desviación estándar (Absorbancia <sub>550 nm</sub> ) <sup>c</sup>	
		24 h	7d
1017	S. Grupo E1	-0.001 ± 0.011	0.295 ± 0.118
110	S. Montevideo	0.028 ± 0.025	0.365 ± 0.161
1151	S. Grupo E monofásico	0.035 ± 0.036	1.159 ± 0.129
1190	S. Grupo B	-0.003 ± 0.008	0.042 ± 0.040
1209	S. Grupo B	-0.003 ± 0.006	0.018 ± 0.035
125	S. Give	0.008 ± 0.020	0.111 ± 0.031
1260	S. Anatum	0.013 ± 0.020	0.759 ± 0.096
1376	S. Sinstorf	0.036 ± 0.091	0.260 ± 0.318
1399	Salmonella no tipificable	0.014 ± 0.005	0.240 ± 0.224
14028	S. Typhimurium ATCC	0.026 ± 0.004	1.218 ± 0.739
1512	S. Muenster	0.013 ± 0.017	0.398 ± 0.111
1528	S. Anatum	0.017 ± 0.013	0.523 ± 0.137
1542	S. Grupo E1	0.148 ± 0.077	1.215 ± 0.253
1606	S. Bovismorbificans	0.254 ± 0.058	1.274 ± 0.271
1650	S. Typhimurium	0.024 ± 0.016	0.528 ± 0.199
1796	S. Montevideo	0.028 ± 0.027	0.575 ± 0.301
1821	S. Give	0.000 ± 0.017	0.544 ± 0.254
1913	S. Grupo E1	0.008 ± 0.013	0.352 ± 0.149
1939	S. Havana	0.010 ± 0.009	0.949 ± 0.245
1945	S. Infantis	0.002 ± 0.007	0.997 ± 0.507
1979	S. Give	0.011 ± 0.010	0.223 ± 0.347
1993	S. Infantis	0.008 ± 0.005	0.627 ± 0.334
2080	S. no tipificable	0.000 ± 0.007	0.106 ± 0.117
2116	S. Grupo B rugoso	0.001 ± 0.014	0.045 ± 0.060
2199	S. Panama	0.007 ± 0.010	0.966 ± 0.286
2272	S. Typhimurium	0.596 ± 0.258	1.053 ± 0.434
2306	S. Infantis	0.008 ± 0.006	0.713 ± 0.169
2388	S. Typhimurium	0.026 ± 0.008	1.062 ± 0.212
2483	S. Infantis	0.022 ± 0.009	0.517 ± 0.205
251	S. Grupo B rugoso	0.028 ± 0.033	0.070 ± 0.069
2514	S. Give	0.004 ± 0.008	0.584 ± 0.175
2598	S. Typhimurium	0.028 ± 0.014	1.062 ± 0.380
2606	S. Grupo B monofásico	*0.032 ± 0.012	1.122 ± 0.259
410	S. Oranienburg	0.028 ± 0.032	0.077 ± 0.035
487	S. no tipificable	1.332 ± 0.424	1.746 ± 0.310
582	S. Give	1.423 ± 0.195	1.859 ± 0.578
727	S. Enteritidis	0.104 ± 0.091	0.910 ± 0.187
731	S. Montevideo	-0.003 ± 0.019	0.764 ± 0.187
920	S. Anatum	0.009 ± 0.012	0.332 ± 0.170
947	S. Grupo G2 rugoso	0.006 ± 0.019	0.675 ± 0.137
977	S. Livingstone	-0.003 ± 0.020	0.532 ± 0.180
1	E. coli RFP-1	0.110 ± 0.061	0.696 ± 0.372
3	E. coli GFP-3	-0.001 ± 0.013	0.163 ± 0.294
14	E. coli YFP-14	0.026 ± 0.036	0.921 ± 0.540
66	E. coli YFP-66	0.087 ± 0.110	0.932 ± 0.191
	Promedio	0.102 ± 0.304	0.653 ± 0.509

<sup>a, b</sup> Cepas de Salmonella aisladas de canales de bovino excepto la cepa de S. Typhimurium ATCC 14028 (control) y de E. coli sustitutas marcadas con proteína fluorescente

<sup>b</sup> Representa el promedio de 6 repeticiones

<sup>c</sup> Absorbancia a 550 nm

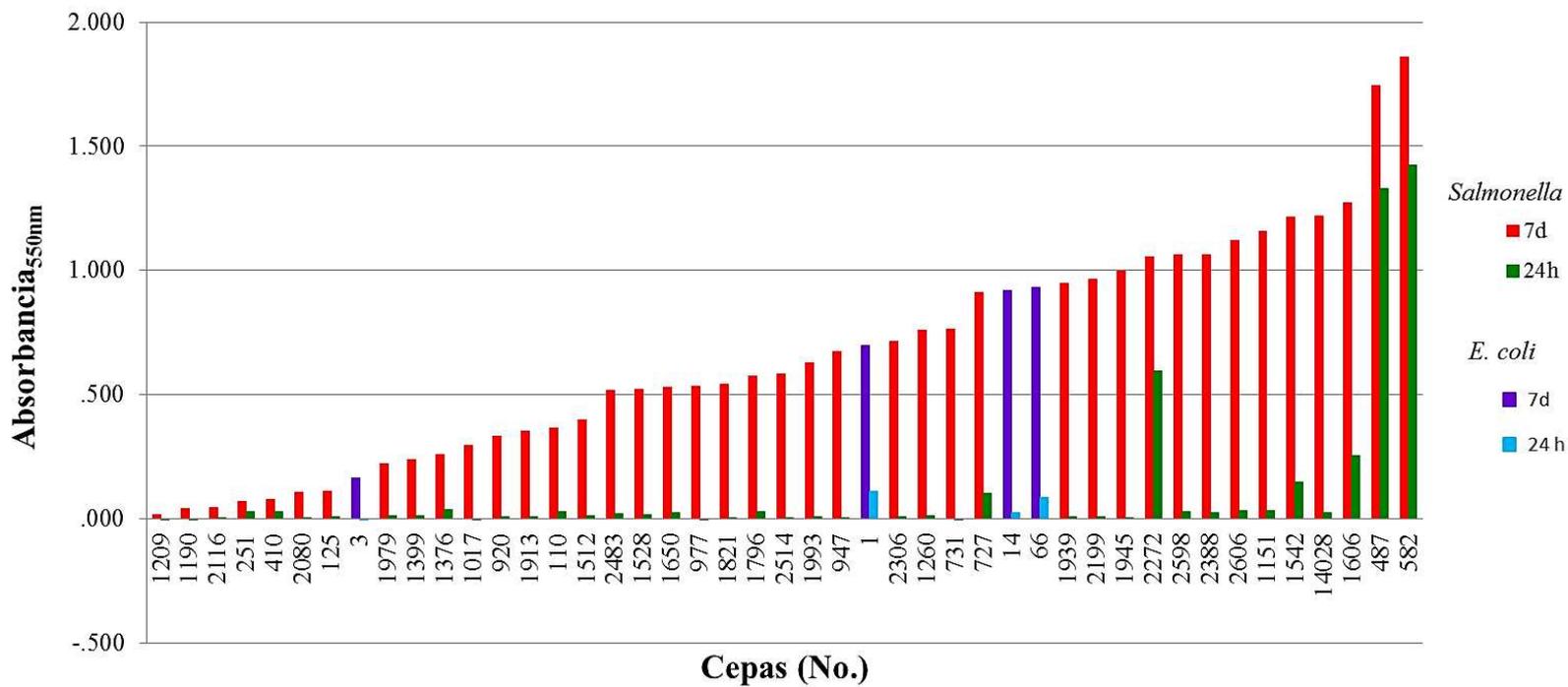


Figura 18. Promedio de los valores de absorbancia a 550 nm de biopelículas formadas por cepas de Salmonella y Escherichia coli en superficies de poliestireno incubadas en caldo soya tripticaseina a 26°C durante 24 horas y 7 días

### 7.3.2.5. Relación entre la hidrofobicidad (ABH) y la formación de biopelículas entre las cepas de Salmonella y de E. coli biotipo I

Se realizaron pruebas de correlación (Pearson, Kendall y Spearman con niveles de significancia de  $\alpha=0.01$  y  $0.05$  para determinar si el incremento en el valor de ABH (%) se relacionaba con un aumento en la cantidad de biopelículas formadas por las cepas de Salmonella y E. coli biotipo I en superficies inertes que comprende la siguiente etapa de experimentos. Se observó una correlación negativa entre la ABH (%) y la formación de biopelícula ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) en acero (24 h) y en látex (7d).

Las cepas correspondientes S. Bovismorbificans, S. Give y la cepa control de S. Typhimurium resultaron ser las mejores formadoras de biopelículas en las tres superficies estudiadas. En poliestiretreno S. Typhimurium también estuvo entre las mejores productoras de biopelículas.

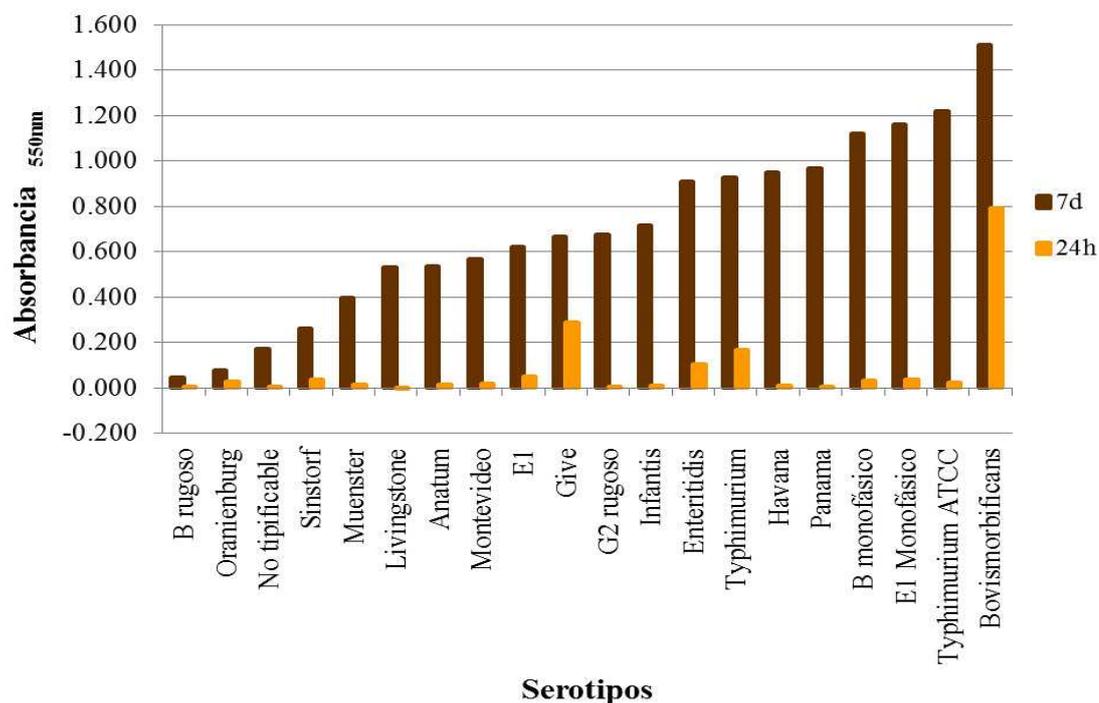


Figura 19. Promedio de los valores ( $A_{550\text{nm}}$ ) de biopelículas formadas por serotipos de Salmonella en superficies de poliestireno incubadas en caldo soya tripticaseína a  $26^\circ\text{C}$  durante 24 horas y 7 días

## **7.4 Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de serotipos de Salmonella y de E. coli biotipo I**

Se realizó la cuenta de las bacterias débilmente adheridas (BDA) y fuertemente adheridas (BFA) en las cinco diferentes superficies de la canal de bovino, a partir de las cuales se calculó la fuerza de adhesión ( $S_R$ ) para las cepas de Salmonella y E. coli fluorescentes inoculadas en la superficie de cinco tejidos diferentes de la canal de bovino: músculo, fascia, tendón, grasa y hueso, mantenidas a temperatura ambiente (TA) durante 30 min y a temperatura alternada (temperatura ambiente por 30 min, seguida de refrigeración por 24h y temperatura ambiente por 30 min; TA-R-TA) para permitir la adhesión. Las bacterias débilmente adheridas a la superficie se localizan en la película de agua que cubre las superficies de los tejidos y las fuertemente adheridas están físicamente asociadas a la misma. La fuerza de adhesión representa el porcentaje de la población total de bacterias asociadas con la superficie del tejido y están físicamente adheridas a ésta (Dickson, Koohmaraie, 1989).

### **7.4.1 Resultados de experimentos preliminares**

#### **7.4.1.1 Influencia del diluyente en la cantidad de bacterias recuperadas del músculo.**

En estos experimentos no se encontraron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en los recuentos de bacterias al emplear un diluyente u otro; los recuentos promedio de bacterias en DP fueron de  $7.1 \pm 0.07$  y en PBS de  $7.2 \pm 0.21$  log UFC/cm<sup>2</sup>. Al comparar si hubiera diferencia ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad de bacterias adheridas después de realizar los enjuagues con volúmenes de 50 o de 100 ml de PBS, tampoco se encontraron diferencias. Al emplear 50 ml de diluyente, los recuentos promedio de BDA fueron  $7.3 \pm 1.06$  y de BFA de  $7.9 \pm 0.6$ , mientras que al utilizar 100 ml, los recuentos promedio de BDA y BFA fueron de  $7.4 \pm 0.24$  y  $7.4 \pm 0.09$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente.

#### **7.4.1.2 Influencia del método de agitación en la recuperación de las bacterias adheridas al músculo.**

El recuento de BDA y BFA en tejido muscular fue de  $6.7 \pm 0.21$  y  $7.3 \pm 0.07$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente ( $P \geq 0.05$ ). Cuando las muestras se agitaron mecánicamente los recuentos de BDA y BFA fueron de  $6.7 \pm 0.21$  y  $7.2 \pm 0.14$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente ( $P \geq 0.05$ ). De acuerdo con estos resultados los experimentos se diseñaron eligiendo las opciones más prácticas y factibles, como fueron el empleo de 50 ml de PBS y agitación de los tejidos en forma manual.

#### **7.4.1.3 Determinación de la etapa del crecimiento de las bacterias.**

Se determinó la etapa del crecimiento en la que se encontraban las bacterias durante los experimentos de adhesión (Figura 20). Se observó un incremento inicial desde los 10 min a TA ( $26.6 \pm 2.2^\circ\text{C}$ ) que continuó hasta los 30 min ( $0.7$  y  $1.0$  logUFC/cm<sup>2</sup> para Salmonella y E. coli, respectivamente) y después del cual se mantuvo estable durante el tiempo en que las muestras se almacenaron en refrigeración ( $4.8 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ) por 24 h, sin observarse cambios dentro de los siguientes treinta minutos que se mantuvieron a TA. Las bacterias se mantuvieron adheridas durante el almacenamiento en la temperatura alternada sin llegar a la etapa de colonización que implicaría su multiplicación.

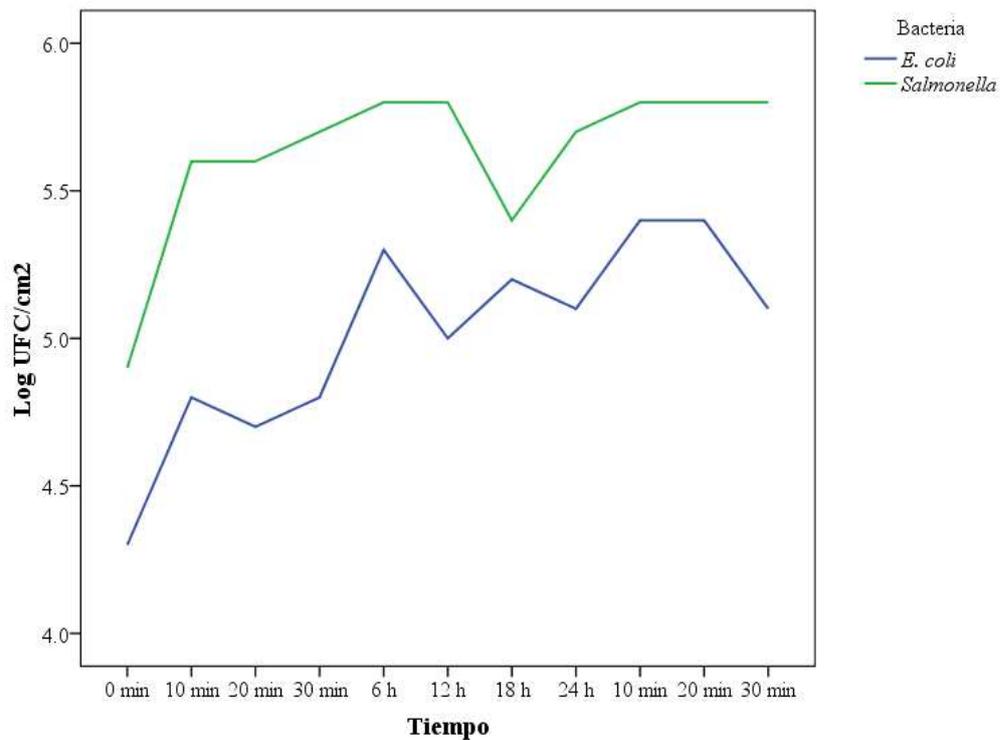


Figura 20. Crecimiento *Salmonella* y *E. coli* durante los experimentos de adhesión a temperatura alternada (temperatura ambiente/30min-refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 min)

#### 7.4.2 Diferencia entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino

Al comparar en general la cantidad de bacterias adheridas a cada tejido tanto a TA como a TA-R-TA, no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la cantidad de bacterias adheridas entre los diferentes tejidos (Tablas 19 y 20). La cantidad de bacterias adheridas a los tejidos suele expresarse mediante recuentos de bacterias en unidades de logaritmos<sub>10</sub> (log UFC/cm<sup>2</sup>), o bien mediante el cálculo del valor SR tomando en cuenta la cantidad de BDA y BFA como se explicó en el punto 6.4.4. En este trabajo se emplearon ambas formas de expresión como a continuación se describe.

#### **7.4.3 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino expresada en log UFC/cm<sup>2</sup>**

En los experimentos realizados a TA, en la mayoría de los casos las cepas de Salmonella y el control de S. Typhimurium ATCC 14028 tuvieron recuentos más altos ( $P \leq 0.05$ ) que el grupo de cepas de E. coli (Tabla 19). En almacenamiento a temperatura alternada (TA-R-TA) se repitió el mismo comportamiento ya que, en la mayoría de los casos las cepas de Salmonella y el control de S. Typhimurium tuvieron recuentos más altos ( $P \leq 0.05$ ) que el grupo de cepas de E. coli. La excepción fue en los recuentos de BDA y BFA en músculo y de BFA en fascia donde no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre los recuentos en los dos géneros bacterianos (Tabla 20). En general las diferencias observadas entre las medias de los recuentos ( $\log \text{UFC/cm}^2$ ) de las bacterias en cada tejido variaron desde 0.02 hasta 1.8  $\log \text{UFC/cm}^2$ .

#### **7.4.4 Diferencia entre la fuerza de adhesión (SR) de los grupos de cepas adheridas a los tejidos**

En músculo, el valor de SR calculado para el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de S. Typhimurium y para el grupo de cepas de E. coli varió de  $0.510 \pm 0.000$  a  $0.533 \pm 0.001$  (Tabla 19 y Figura 21). La cepa control de S. Typhimurium tuvo el valor más bajo de SR y éste fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) del grupo de cepas de Salmonella. En fascia, el valor de SR para los tres respectivos grupos de cepas estuvo entre  $0.470 \pm 0.000$  y  $0.543 \pm 0.029$ , la cepa control de S. Typhimurium tuvo el valor más bajo de SR y éste fue significativamente más bajo ( $P \leq 0.05$ ) que el del grupo de cepas de E. coli. Para tendón el valor de SR correspondiente al grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de S. Typhimurium y el grupo de cepas de E. coli varió de  $0.490 \pm 0.007$  a  $0.517 \pm 0.006$ , la cepa control de S. Typhimurium mostró el valor más bajo de SR ( $P < 0.05$ ). En el caso de grasa, la fuerza de adhesión SR para los tres respectivos grupos de cepas estuvo entre  $0.500 \pm 0.010$  y  $0.527 \pm 0.006$ , en este tejido el grupo de cepas de E. coli tuvo valores significativamente más bajos de SR ( $P \leq 0.05$ ) con respecto del grupo de cepas de Salmonella. En hueso los valores de SR para el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de S. Typhimurium y el grupo de cepas de E. coli se ubicaron entre 0.530

$\pm 0.010$  y  $0.513 \pm 0.025$ , sin que se observaran diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en la fuerza de adhesión de los dos grupos de bacterias y la cepa control de *S. Typhimurium*.

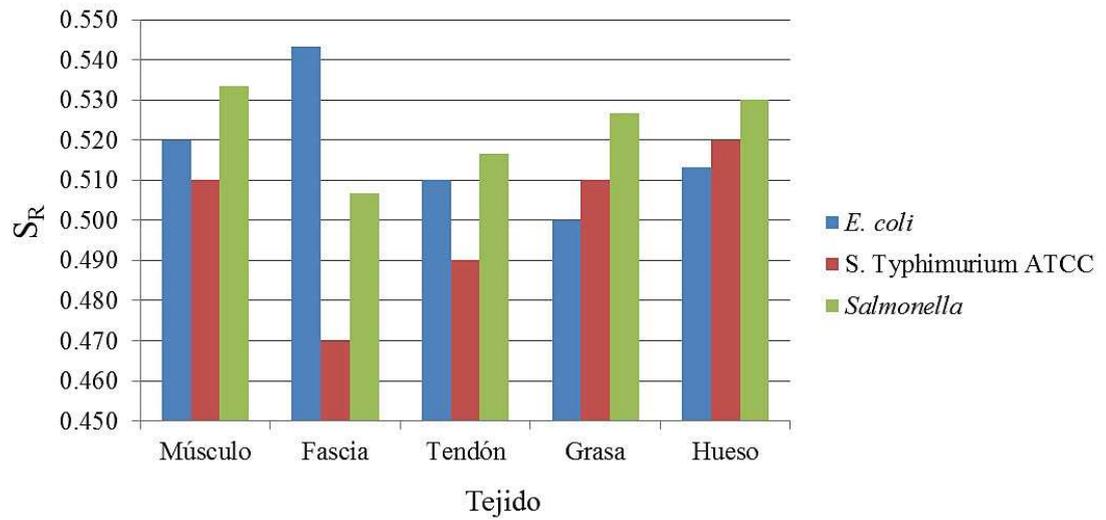


Figura 21. Fuerza de adhesión (SR) para cepas de *Salmonella* y *E. coli* en tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente durante 30 minutos (TA)

Tabla 19. Promedio de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S<sub>R</sub>) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculados en diferentes tejidos de la canal de bovino y almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Inóculo	Media de las cuentas <sup>a</sup> (log UFC/cm <sup>2</sup> ) ± DS <sup>b</sup>		S <sub>R</sub>
			BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	Salmonella <sup>e</sup>	5.8 ± 0.7 XY <sup>h</sup>	5.2 ± 0.3 A <sup>g</sup> X	5.9 ± 0.2 A Y	0.533 ± 0.001 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.8 ± 0.0 X	5.0 ± 0.0 AB X	5.3 ± 0.1 B X	0.510 ± 0.000 B
	E. coli substitutas <sup>f</sup>	5.00 ± 0.3 X	4.5 ± 0.4 B X	4.9 ± 0.4 B X	0.520 ± 0.100 AB
Fascia	Salmonella	5.4 ± 0.4 X	5.3 ± 0.1 A X	5.5 ± 0.6 A X	0.507 ± 0.025 AB
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.7 ± 0.7 X	5.7 ± 0.2 A X	5.0 ± 0.1 A X	0.470 ± 0.000 A
	E. coli substitutas	4.3 ± 1.2 X	3.9 ± 0.4 B X	5.00 ± 1.0 A X	0.543 ± 0.029 B
Tendón	Salmonella	6.0 ± 0.6 X	5.2 ± 0.2 A Y	5.6 ± 0.2 A XY	0.517 ± 0.006 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.8 ± 0.1 X	5.4 ± 0.1 A X	5.30 ± 0.1 A X	0.490 ± 0.007 B
	E. coli substitutas	4.9 ± 0.8 X	4.6 ± 0.7 A X	4.8 ± 0.6 A X	0.510 ± 0.010 A
Grasa	Salmonella	5.5 ± 0.2 X	5.00 ± 0.1 AB Y	5.6 ± 0.2 A X	0.527 ± 0.006 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	6.4 ± 0.1	5.7 ± 0.0 A	6.0 ± 0.0 A	0.510 ± 0.007 AB
	E. coli substitutas	4.5 ± 0.6 X	4.4 ± 0.6 B X	4.2 ± 0.5 B X	0.500 ± 0.010 B
Hueso	Salmonella	6.1 ± 0.2 X	5.3 ± 0.2 A Y	5.9 ± 0.2 A X	0.530 ± 0.010 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.8 ± 0.2 X	4.9 ± 0.1 A Y	5.3 ± 0.3 A X	0.520 ± 0.000 A
	E. coli substitutas	4.2 ± 0.6 X	3.8 ± 0.3 B X	4.1 ± 0.5 B X	0.513 ± 0.025 A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del log UFC/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas (BDA)

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas (BFA)

<sup>e</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, S. Panama; 1190, S. B rugoso; 487 y 1606, S. Bovismorbificans y 582, S. Give

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de E. coli marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes (P≥0.05)

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes (P≥0.05)

Con respecto a los valores de SR calculados para las bacterias en las muestras mantenidas en TA-R-TA se puede observar que en músculo los valores de SR para el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de *S. Typhimurium* y el grupo de cepas de *E. coli* estuvieron entre  $0.510 \pm 0.000$  y  $0.537 \pm 0.025$ . En fascia los valores de SR variaron de  $0.460 \pm 0.007$  a  $0.510 \pm 0.010$ , mientras que en tendón se ubicaron entre  $0.500 \pm 0.007$  y  $0.540 \pm 0.026$ . En el caso de grasa el valor SR para el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de *S. Typhimurium* y el grupo de cepas de *E. coli* estuvo entre  $0.500 \pm 0.007$  y  $0.513 \pm 0.041$ , y en hueso el valor de SR en los tres grupos de bacterias varió de  $0.520 \pm 0.000$  a  $0.530 \pm 0.017$ . En esta condición de almacenamiento en ninguno de los tejidos se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la fuerza de adhesión de los dos grupos de bacterias y la cepa control de *S. Typhimurium*.

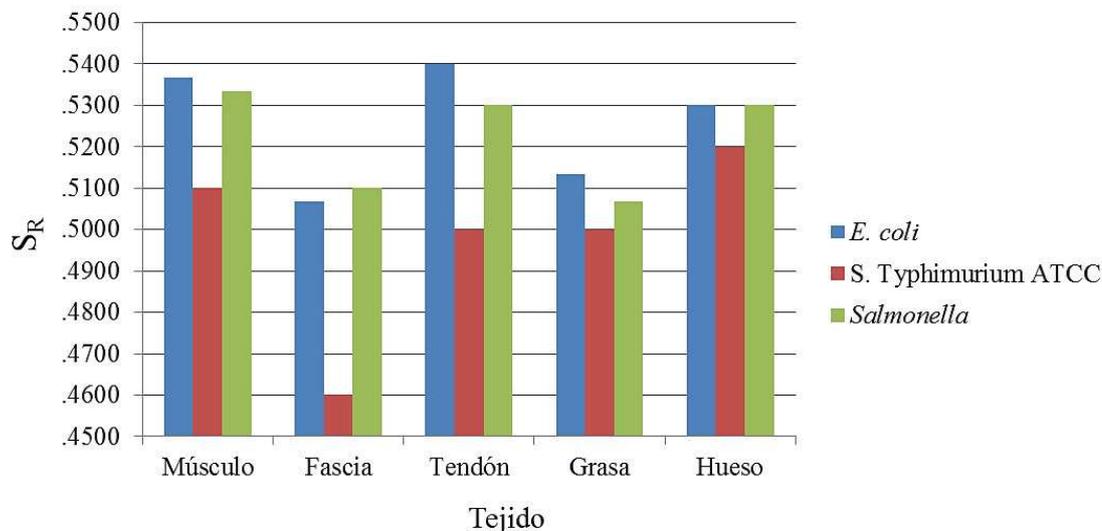


Figura 22. Fuerza de adhesión (SR) para cepas de Salmonella y *E. coli* en tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos (TA-R-TA)

Tabla 20. Promedio de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S<sub>R</sub>) para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculados en diferentes tejidos de la canal de bovino y almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-Refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Inóculo	Media de las cuentas <sup>a</sup> (log UFC/cm <sup>2</sup> ) ± DS <sup>b</sup>		S <sub>R</sub>
			BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	Salmonella <sup>e</sup>	6.1 ± 0.3 X <sup>h</sup>	5.5 ± 0.2 A <sup>g</sup> Y	6.2 ± 0.4 A X	0.533 ± 0.015 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.8 ± 0.0 X	5.3 ± 0.0 A X	5.5 ± 0.1 A X	0.510 ± 0.000 A
	E. coli substitutas <sup>f</sup>	5.8 ± 0.6 X	5.1 ± 0.4 A X	5.8 ± 0.6 A X	0.537 ± 0.025 A
Fascia	Salmonella	6.0 ± 0.2 X	5.7 ± 0.3 A X	6.0 ± 0.6 A X	0.510 ± 0.010 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	6.7 ± 0.7 X	6.00 ± 0.2 A Y	5.2 ± 0.1 A Z	0.460 ± 0.007 A
	E. coli substitutas	5.1 ± 0.3 X	4.9 ± 0.3 B X	5.3 ± 0.7 A X	0.507 ± 0.049 A
Tendón	Salmonella	5.7 ± 0.0 XY	5.4 ± 0.1 A X	6.0 ± 0.4 A Y	0.530 ± 0.017 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	6.0 ± 0.1 X	5.6 ± 0.1 A X	5.8 ± 0.1 AB X	0.500 ± 0.007 A
	E. coli substitutas	4.9 ± 0.1 XY	4.4 ± 0.3 B X	5.1 ± 0.5 B Y	0.540 ± 0.026 A
Grasa	Salmonella	6.8 ± 1.5 X	5.4 ± 0.1 A Y	5.5 ± 0.2 A Y	0.507 ± 0.006 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	6.4 ± 0.1 X	6.0 ± 0.2 A X	6.1 ± 0.1 B X	0.500 ± 0.007 A
	E. coli substitutas	5.0 ± 0.2 X	4.5 ± 0.4 B Y	4.7 ± 0.3 C XY	0.513 ± 0.041 A
Hueso	Salmonella	6.3 ± 0.6 X	5.3 ± 0.3 A Y	6.00 ± 0.2 A X	0.530 ± 0.017 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	6.1 ± 0.2 X	5.5 ± 0.2 A Y	6.0 ± 0.1 A XY	0.520 ± 0.000 A
	E. coli substitutas	5.2 ± 0.2 X	4.5 ± 0.3 B Y	5.1 ± 0.1 B X	0.530 ± 0.010 A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del log UFC/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas

<sup>e</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, S. Panama; 1190, S. B rugoso; 487 y 1606, S. Bovismorbificans y 582, S. Give

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de E. coli marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes (P≥0.05)

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes (P≥0.05)

#### **7.4.5 Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y bacterias fuertemente adheridas en cada grupo de cepas**

Se comparó la cantidad de bacterias adheridas en cada tejido (de cada grupo individual de bacterias), observándose diferencias entre la cantidad ( $\log \text{UFC/cm}^2$ ) de BDA y de BFA, y entre éstas últimas y la cantidad de bacterias originalmente inoculadas (inóculos) en diferentes casos (Tablas 19 y 20). En los experimentos realizados a TA, sólo hubo diferencias en el caso del grupo de cepas de Salmonella las cuales presentaron mayor cantidad de BFA que de BDA ( $P \leq 0.05$ ) en músculo ( $5.9 \pm 0.2$  y  $5.2 \pm 0.3$ , respectivamente), en grasa ( $5.6 \pm 0.2$  y  $5.0 \pm 0.1$ ) y en hueso ( $5.9 \pm 0.2$  y  $5.3 \pm 0.2$ ), respectivamente. También se observó menor cantidad de BDA ( $P \leq 0.05$ ) de Salmonella que en los inóculos para los casos del tendón ( $5.2 \pm 0.2$  y  $6.00 \pm 0.6$ ), grasa ( $5.00 \pm 0.1$  y  $5.5 \pm 0.2$ ) y hueso ( $5.3 \pm 0.2$  y  $6.1 \pm 0.2$ ), respectivamente (Tabla 20). En los tejidos almacenados a TA-R-TA, el grupo de cepas de Salmonella presentó mayor cantidad ( $\log \text{UFC/cm}^2$ ) de BFA que de BDA ( $P \leq 0.05$ ) en músculo ( $6.2 \pm 0.4$  y  $5.5 \pm 0.2$ , respectivamente), en tendón ( $6.0 \pm 0.4$  y  $5.4 \pm 0.1$ ) y en hueso ( $6.0 \pm 0.2$  y  $5.3 \pm 0.3$ ). Además se observó menor cantidad de BDA que en el inóculo ( $P \leq 0.05$ ) en músculo ( $5.5 \pm 0.2$  y  $6.1 \pm 0.3 \log \text{UFC/cm}^2$ , respectivamente) y en hueso ( $5.3 \pm 0.3$  y  $6.3 \pm 0.6$ ). Solo en grasa fue menor ( $P \leq 0.05$ ) la cantidad de BDA y BFA ( $5.4 \pm 0.1$  y  $5.5 \pm 0.2 \log \text{UFC/cm}^2$ ) que las bacterias inoculadas ( $6.8 \pm 1.5 \log \text{UFC/cm}^2$ ). En la cepa control de S. Typhimurium, la cantidad de BFA en fascia fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que la cantidad de BDA ( $5.2 \pm 0.1$  y  $6.00 \pm 0.2 \log \text{UFC/cm}^2$ ) y de ambas que las del inóculo ( $6.7 \pm 0.7 \log \text{UFC/cm}^2$ ). En hueso la cantidad de BDA fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que la cantidad de bacterias del inóculo ( $5.5 \pm 0.2$  y  $6.1 \pm 0.2$  respectivamente). En el grupo de cepas de E. coli, hubo mayor cantidad de BFA que BDA ( $P \leq 0.05$ ) en tendón ( $5.1 \pm 0.5$  y  $4.4 \pm 0.3 \log \text{UFC/cm}^2$  respectivamente) y en hueso ( $5.1 \pm 0.1$  y  $4.5 \pm 0.3$ ). Para este caso, también hubo menor la cantidad de BDA que en el inóculo ( $P \leq 0.05$ ) en hueso ( $4.5 \pm 0.3$  y  $5.2 \pm 0.2$ ) y en grasa ( $4.5 \pm 0.4$  y  $5.3 \pm 0.2 \log \text{UFC/cm}^2$  respectivamente) (Tabla 20).

#### **7.4.6 Cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino a TA versus TA-R-TA**

Se realizaron las comparaciones entre la cantidad de bacterias adheridas a temperatura ambiente/30 min (TA) y las adheridas a TA-R-TA con el objeto de saber si había diferencias en la adhesión de las bacterias a los tejidos bajo una condición u otra. Al comparar las medias de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de las BDA y BFA, el ANOVA indicó que sí hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en las cantidades de éstas bacterias entre las dos condiciones de almacenamiento. Se observó una cantidad mayor de bacterias adheridas a TA-R-TA ( $\leq 0.42 \log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) respecto a los recuentos a TA y aunque ésta diferencia fue significativa, es discutible desde un punto de vista práctico. Resultados contrarios se obtuvieron al comparar los valores de SR de las bacterias adheridas a los diferentes tejidos, en donde no se encontraron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre los valores de SR de las bacterias adheridas a TA respecto a los valores de SR de las bacterias adheridas a TA-R-TA.

#### **7.4.7 Determinación de la actividad de agua de los tejidos y humedad relativa durante la experimentación**

Las determinaciones se realizaron para las muestras almacenadas a TA a los 0 y 30 min y para las muestras almacenadas a TA-R-TA a los 0 y 30 min, a las 24 h y a los 30 min posteriores a las 24 h de incubación. Dichos valores se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Estadística descriptiva para las determinaciones fisicoquímicas de los tejidos de canales de bovino bajo las condiciones de experimentación

Tejido	Parámetro	n	Mínimo	Máximo	Media	DE <sup>a</sup>
Músculo	Aa <sup>b</sup>	12	0.65	0.97	0.77	0.09
	temp1 <sup>c</sup>	12	18.40	26.00	23.22	2.15
	HR <sup>d</sup>	12	61.00	93.00	73.92	10.31
	temp2 <sup>e</sup>	12	5.00	29.00	20.83	7.93
Fascia	Aa	12	0.66	0.87	0.79	0.06
	temp1	12	22.90	26.90	25.00	1.37
	HR	10	61.00	95.00	77.70	10.53
	temp2	10	6.00	29.00	20.80	8.59
Tendón	Aa	12	0.71	0.91	0.81	0.06
	temp1	12	22.30	26.70	24.91	1.46
	HR	10	62.00	98.00	80.90	12.03
	temp2	10	8.00	29.00	21.35	8.20
Grasa	Aa	12	0.73	0.88	0.83	0.04
	temp1	12	19.00	27.80	24.88	2.36
	HR	10	62.00	85.00	76.30	9.21
	temp2	10	7.00	29.00	21.50	8.57
Hueso	Aa	12	0.73	0.92	0.83	0.05
	temp1	12	20.30	27.30	24.86	1.84
	HR	10	60.00	99.00	79.10	11.09
	temp2	10	3.00	29.00	20.70	9.81

<sup>a</sup> Desviación estándar

<sup>b</sup> Actividad de agua

<sup>c</sup> Temperatura de la muestra durante la determinación de Aa

<sup>d</sup> Humedad relativa

<sup>e</sup> Temperatura de la muestra durante la determinación de HR

### 7.5 Comparación de la capacidad de agentes surfactantes para remover *Salmonella* y *E. coli* biotipo I adheridas a la superficie de la canal de bovino

Con el objeto de comparar la capacidad de agentes surfactantes para remover *Salmonella* y *E. coli* biotipo I de la superficie de canales de bovino se realizó la siguiente metodología. Cortes de tres tejidos de la canal de bovino músculo, fascia y hueso fueron inoculados con una mezcla de cepas de *Salmonella* y el grupo de cepas de *E. coli* biotipo I, además de la cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 como control, se mantuvieron en dos condiciones de almacenamiento para permitir la adhesión de las bacterias (TA y TA-R-TA) y posteriormente se les aplicaron tratamientos con los detergentes SDS y Tween 20 al 2% durante 10 min para evaluar su efecto en la remoción de las bacterias adheridas a los tejidos. Se determinó la cuenta ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de bacterias débilmente adheridas

(BDA) y fuertemente adheridas (BFA) y se calculó la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias a los tejidos.

### **7.5.1 Estudios preliminares**

#### **7.5.1.1 Efecto del SDS y Tween 20 sobre Salmonella en caldo soya tripticaseína con y sin inclusión de caldo neutralizante.**

En los experimentos en donde se probó el efecto sobre Salmonella de diferentes concentraciones de SDS (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0 y 20%) durante un tiempo de contacto de 30 s al incluir o no caldo neutralizante Dey Engley (DE). No se observaron diferencias en los recuentos de Salmonella ( $P \geq 0.05$ ) a las diferentes concentraciones utilizadas del detergente con y sin caldo neutralizante. Los promedios de recuentos de Salmonella sin la inclusión del caldo neutralizante variaron de 7.5 a 8.9 log UFC/ml y con la inclusión del caldo DE desde 6.9 hasta 7.3 log UFC/ml. Tampoco hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre utilizar o no caldo neutralizante DE cuando se probaron concentraciones mayores de SDS (5.0, 7.0, 10.0 y 20.0%) durante 2 y 5 min de contacto. Los recuentos de Salmonella sin caldo neutralizante variaron de 6.7 a 8.6 log UFC/ml y de 7.0 a 7.5 log UFC/ml con la inclusión del caldo DE. En los experimentos realizados con SDS y Tween 20 al 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0% durante 5 y 10 min de contacto con Salmonella inoculada en CST con y sin la inclusión del caldo neutralizante DE, tampoco se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) al incluir o no caldo DE en los dos tiempos de contacto en ninguna de las concentraciones probadas. Los recuentos del patógeno sin caldo neutralizante variaron de 7.6 a 8.1 log UFC/ml y con caldo DE fueron de 7.4 a 7.8 log UFC/ml.

#### **7.5.1.2 Efecto del SDS y Tween 20 en la remoción de Salmonella adherida al músculo con y sin aplicación de masaje.**

En los experimentos realizados para ver el efecto del SDS y Tween 20 al 2% durante 10 min en la remoción de Salmonella adherida (a TA/30 min) en la superficie del músculo con y sin aplicación de masaje, se observaron con ambos detergentes recuentos mayores ( $P \leq 0.05$ ) en las muestras sin masaje (6.8 y 6.9 log

UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente) que en las muestras con masajeo (5.9 y 6.1 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente), sin encontrarse diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre los efectos de los surfactantes, pero sí al aplicar o no masajeo. Al comparar los tratamientos con los controles sin aplicación de los surfactantes, no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ), con lo que se descartaría cualquier efecto de los surfactantes sobre la remoción de las bacterias.

En otro experimento se compararon el masajeo intermitente con la agitación suave con 15 movimientos de vaivén de forma intermitente hasta completar 10 min. Se observó mayor cantidad de BDA que de BFA con el masajeo (7.2 y 6.1 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente) y mayor cantidad de BFA que de BDA con la agitación en tubo (7.0 y 6.6 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente) ( $P \leq 0.05$ ).

El método del masajeo tuvo un mayor efecto en la remoción de Salmonella del músculo, por lo que se decidió utilizar el método de agitación suave en tubo durante la aplicación de los tratamientos con SDS y Tween 20 para poder evaluar el efecto de los surfactantes sin la influencia de la fuerza mecánica impartida por el masajeo.

## **7.5.2 Diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes**

### **7.5.1.1 Tratamientos con SDS.**

Después del almacenamiento de los tejidos a TA, seguidos del tratamiento con SDS al 2% por 10 min, se observó una mayor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) de bacterias adheridas al músculo. La media de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de BDA y BFA en músculo fue  $5.1 \pm 0.8$  y  $5.5 \pm 0.6$ , en fascia de  $4.8 \pm 1.0$  y  $4.7 \pm 0.6$  y en hueso de  $4.5 \pm 1.1$  y  $4.9 \pm 0.9$ , respectivamente. Después del almacenamiento a TA-R-TA y los tratamientos con SDS al 2% por 10 min, se observó una mayor cantidad de bacterias adheridas al músculo, ( $P \leq 0.05$ ) con respecto del hueso pero no de la fascia ( $P \geq 0.05$ ). La media de los recuentos de BDA y BFA en músculo fue  $5.1 \pm 1.0$  y de  $6.0 \pm 0.5$ , en fascia  $5.2 \pm 1.1$  y  $5.0 \pm 0.9$  y en hueso de  $4.1 \pm 1.1$  y  $5.3 \pm 0.7$ , respectivamente (datos no mostrados en las tablas).

### **7.5.2.2 Tratamientos con Tween 20.**

Después del almacenamiento de los tejidos a TA, seguidos del tratamiento con Tween 20 al 2% por 10 min, se observó una mayor cantidad de bacteria adheridas al músculo ( $P \leq 0.05$ ), la diferencia fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) respecto a fascia. El promedio de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BDA y BFA fue  $5.3 \pm 0.7$  y  $5.6 \pm 0.6$  para músculo,  $5.0 \pm 1.0$  y  $4.8 \pm 0.8$  para fascia y  $4.8 \pm 0.8$  y  $5.2 \pm 0.8$  para hueso, respectivamente. Respecto a los tejidos que se almacenaron a TA-R-TA y posteriormente se trataron con Tween 20 al 2% por 10 min, se observó una mayor cantidad de bacterias adheridas ( $P \leq 0.05$ ) en músculo con respecto de hueso, mientras que la cantidad de bacterias adheridas a la fascia no fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) de la cantidad de bacterias adheridas al músculo o hueso. El promedio de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BDA y BFA fueron  $5.5 \pm 0.9$  y  $6.2 \pm 0.6$  para músculo,  $5.6 \pm 0.7$  y  $5.4 \pm 0.5$  para fascia y  $4.7 \pm 0.7$  y  $5.6 \pm 0.7$  para hueso, respectivamente (datos no mostrados en las tablas).

Al realizar las comparaciones entre el promedio de los valores de SR calculados para las bacterias adheridas en cada tejido, solo se observaron diferencias en la fuerza de adhesión en los tejidos que fueron almacenadas a TA-R-TA. En los tejidos tratados con SDS los valores de SR fueron de 0.503, 0.580 y 0.556 para fascia, hueso y músculo, respectivamente. Los valores de SR después de los tratamientos con Tween 20 fueron de 0.493, 0.541 y 0.531 en fascia, hueso y músculo, respectivamente. Fascia fue el tejido con los valores de SR más bajos ( $P \leq 0.05$ ), es decir con el menor porcentaje de bacterias fuertemente adheridas.

### **7.5.3 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes (expresadas en $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ).**

#### **7.5.3.1 Tratamientos con SDS.**

En las muestras almacenadas a TA y tratadas con SDS al 2% por 10 min, se observó que en los tres tejidos la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA fue más alta ( $P \leq 0.05$ ) para el grupo de cepas Salmonella que para el grupo de E. coli. Sólo en el caso del hueso la media de los recuentos del grupo de cepas de E. coli fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que la media de la cepa control de S. Typhimurium (Tabla 22). En los tejidos

almacenados a TA-R-TA y luego tratados con SDS al 2% por 10 min, la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA en el grupo de cepas de *E. coli* fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que para el grupo de cepas de *Salmonella*. En músculo la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA en el grupo de cepas de *E. coli* fue menor ( $P \leq 0.05$ ) que la cepa control de *S. Typhimurium*; no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la respectiva media de BFA del grupo de cepas de *Salmonella* y la cepa control de *S. Typhimurium* (Tabla 23). Tampoco se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre las medias de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BDA de los dos grupos de bacterias y la cepa control, en los tres tejidos, en las dos condiciones de almacenamiento.

### **7.5.3.2 Tratamientos con Tween 20.**

En las muestras almacenadas a TA y tratadas con Tween 20 al 2% durante 10 min se observó que la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BDA en hueso fue menor ( $P \leq 0.05$ ) para la cepa control de *S. Typhimurium* que para el grupo de cepas de *Salmonella*. En contraste, en músculo y hueso la media de los recuentos fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) para el grupo de cepas de *Salmonella* que para el grupo de cepas de *E. coli*. En fascia no se observaron diferencias entre los recuentos de los grupos de bacterias estudiados (Tabla 24). En los tres tejidos hubo una mayor cantidad ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA en el grupo de cepas de *Salmonella* ( $P \leq 0.05$ ) que en el de *E. coli*, en hueso la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA del grupo de cepas de *Salmonella* fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que la de la cepa control de *S. Typhimurium* (Tabla 24). En las muestras almacenadas a TA-R-TA y luego tratadas con Tween 20 al 2% por 10 min, en ningún tejido se observó diferencia ( $P \geq 0.05$ ) en los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BDA de los dos grupos de bacterias y la cepa control de *S. Typhimurium*. Respecto a la cantidad de BFA sólo se observaron diferencias en hueso, donde la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA en el grupo de cepas de *Salmonella* fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control de *S. Typhimurium* y al grupo de cepas de *E. coli*. No se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en la media de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de BFA en músculo y fascia entre las tres bacterias estudiadas (Tabla 25).

#### **7.5.4 Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos tratados con surfactantes.**

La expresión de los resultados como fuerza de adhesión (SR) calculada a partir de los valores de las BDA y BFA mediante la fórmula:  $S_R = \text{No células no adheridas físicamente (BDA)} - \text{No. células físicamente adheridas (BFA)} / \text{No células físicamente adheridas}$  (Dickson, Koohmaraie, 1989), permitió una interpretación mas real y simple de los resultados y sus comparaciones.

##### **7.5.4.1 Tratamientos con SDS.**

Para los experimentos realizados a TA que recibieron tratamiento con SDS al 2% por 10 min, los valores de SR calculados para el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de S. Typhimurium y el grupo de cepas de E. coli biotipo I adheridas al músculo variaron desde  $0.513 \pm 0.025$  hasta  $0.540 \pm 0.025$ . Para las bacterias adheridas a la fascia variaron de  $0.500 \pm 0.026$  a  $0.510 \pm 0.025$ . Para hueso los valores de SR estuvieron entre  $0.527 \pm 0.021$  y  $0.560 \pm 0.025$  (Tabla 23). En las muestras almacenadas a TA-R-TA y luego tratadas con SDS al 2% por 10 min, los valores de SR calculados para las tres bacterias adheridas al músculo variaron de  $0.520 \pm 0.040$  a  $0.570 \pm 0.046$ . En las muestras de fascia este valor SR varió desde  $0.490 \pm 0.040$  hasta  $0.513 \pm 0.031$ . En hueso los valores de SR de las bacterias se ubicaron entre  $0.570 \pm 0.040$  y  $0.587 \pm 0.080$  (Tabla 23).

##### **7.5.4.2 Tratamientos con Tween 20.**

Para los experimentos realizados a TA que recibieron tratamiento con Tween 20 al 2% por 10 min, los valores de SR calculados para el grupo de cepas de Salmonella, el control de S. Typhimurium y el grupo de cepas de E. coli biotipo I en músculo variaron desde  $0.513 \pm 0.006$  hasta  $0.520 \pm 0.030$ . Para las bacterias adheridas a la fascia variaron de  $0.490 \pm 0.046$  a  $0.493 \pm 0.040$ . Para hueso los valores de SR estuvieron entre  $0.503 \pm 0.035$  y  $0.580 \pm 0.046$  (Tabla 24). En las muestras almacenadas a TA-R-TA y tratadas con Tween 20 al 2% por 10 min, los valores de SR calculados para las tres bacterias en el músculo fueron de  $0.520 \pm 0.010$  a  $0.543 \pm 0.025$ . En las

muestras de fascia fue desde  $0.487 \pm 0.035$  hasta  $0.500 \pm 0.025$ . En hueso los valores de  $S_R$  de las bacterias se ubicaron entre  $0.527 \pm 0.035$  y  $0.553 \pm 0.031$  (Tabla 25).

No se encontraron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en los valores calculados de  $S_R$  entre el grupo de cepas de Salmonella, la cepa control de *S. Typhimurium* y el grupo de cepas de *E. coli* en ninguno de los tejidos almacenados tanto en TA como a TA-R-TA y tratados posteriormente con SDS o Tween 20 al 2% por 10 min.

Tabla 22. Promedio de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión ( $S_R$ ) después de la aplicación de SDS para cepas de Salmonella y *E. coli* biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Media de las cuentas <sup>a</sup> ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ DS <sup>b</sup>		$S_R$
		BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	Salmonella <sup>e</sup>	$5.6 \pm 0.7$ A <sup>g</sup> X <sup>h</sup>	$5.9 \pm 0.2$ A X	$0.513 \pm 0.025$ A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	$5.2 \pm 0.2$ A X	$6.0 \pm 0.2$ A X	$0.540 \pm 0.025$ A
	<i>E. coli</i> substitutas <sup>f</sup>	$4.7 \pm 0.7$ A X	$4.9 \pm 0.4$ B X	$0.517 \pm 0.023$ A
Fascia	Salmonella	$5.4 \pm 0.7$ A X	$5.2 \pm 0.3$ A X	$0.500 \pm 0.026$ A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	$4.6 \pm 0.4$ A X	$4.8 \pm 0.1$ AB X	$0.510 \pm 0.025$ A
	<i>E. coli</i> substitutas	$4.3 \pm 1.2$ A X	$4.3 \pm 0.5$ B X	$0.503 \pm 0.059$ A
Hueso	Salmonella	$5.2 \pm 0.7$ A X	$5.8 \pm 0.4$ A X	$0.527 \pm 0.021$ A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	$3.7 \pm 0.2$ A X	$4.8 \pm 0.1$ B Y	$0.560 \pm 0.025$ A
	<i>E. coli</i> substitutas	$4.0 \pm 1.3$ A X	$4.1 \pm 0.4$ B X	$0.527 \pm 0.067$ A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$  de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas (BDA)

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas (BFA)

<sup>e</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, *S. Panama*; 1190, *S. B rugoso*; 487 y 1606, *S.*

*Bovismorbificans* y 582, *S. Give*

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de *E. coli* marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

Tabla 23. Promedio de los recuentos ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión ( $S_R$ ) después de la aplicación de SDS para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Media de las cuentas <sup>a</sup> ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ DS <sup>b</sup>		$S_R$
		BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	Salmonella <sup>e</sup>	5.1 $\pm$ 1.0 A <sup>g</sup> X <sup>h</sup>	6.3 $\pm$ 0.4 A Y	0.570 $\pm$ 0.046 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.9 $\pm$ 0.0 A X	6.5 $\pm$ 1.0 A X	0.520 $\pm$ 0.040 A
	E. coli substitutas <sup>f</sup>	4.8 $\pm$ 1.0 A X	6.0 $\pm$ 0.4 B X	0.553 $\pm$ 0.061 A
Fascia	Salmonella	5.4 $\pm$ 1.2 A X	5.0 $\pm$ 1.0 A X	0.497 $\pm$ 0.021 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.7 $\pm$ 0.2 A X	5.5 $\pm$ 0.1 A X	0.490 $\pm$ 0.040 A
	E. coli substitutas	4.8 $\pm$ 1.3 A X	4.8 $\pm$ 0.9 A X	0.513 $\pm$ 0.031 A
Hueso	Salmonella	4.3 $\pm$ 1.0 A X	5.8 $\pm$ 0.5 A Y	0.577 $\pm$ 0.040 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	4.0 $\pm$ 1.0 A X	5.2 $\pm$ 0.5 AB Y	0.570 $\pm$ 0.040 A
	E. coli substitutas	3.9 $\pm$ 1.4 A X	4.8 $\pm$ 0.7 B X	0.587 $\pm$ .080 A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$  de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas (BDA)

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas (BFA)

<sup>e</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, S. Panama; 1190, S. B rugoso; 487 y 1606, S. Bovismorbificans y 582, S. Give

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de E. coli marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

### 7.5.5 Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y bacterias fuertemente adheridas a los tejidos tratados con surfactantes en cada grupo de cepas

En las muestras que fueron almacenadas a TA y luego tratadas con SDS y Tween 20, en general, no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la cantidad de BDA y BFA de cada grupo de bacterias en cada tejido (Tablas 22 y 24), con excepción de la cepa control de *S. Typhimurium* que presentó mayor cantidad de BFA que de BDA en hueso ( $P \leq 0.05$ ). En las muestras almacenadas a TA-R-TA y luego tratadas con los detergentes, sólo se observó una mayor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) de BFA que de BDA en el grupo de cepas de *Salmonella* y en la cepa control de *S. Typhimurium* en hueso (Tablas 23 y 25).

Tabla 24. Promedio de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión ( $S_R$ ) después de la aplicación de Tween 20 para cepas de *Salmonella* y *E. coli* biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente por 30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Media de las cuentas <sup>a</sup> (log UFC/cm <sup>2</sup> ) $\pm$ DS <sup>b</sup>		$S_R$
		BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	<i>Salmonella</i> <sup>e</sup>	5.8 $\pm$ 0.6 A <sup>g</sup> X <sup>h</sup>	6.0 $\pm$ 0.5 A X	0.513 $\pm$ 0.006 A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	5.6 $\pm$ 1.0 AB X	6.0 $\pm$ 0.1 A X	0.520 $\pm$ 0.046 A
	<i>E. coli</i> substitutas <sup>f</sup>	4.7 $\pm$ 0.7 B X	5.0 $\pm$ 0.2 B X	0.520 $\pm$ 0.030 A
Fascia	<i>Salmonella</i>	5.4 $\pm$ 0.8 A X	5.3 $\pm$ 0.7 A X	0.493 $\pm$ 0.040 A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	5.7 $\pm$ 0.1 A X	5.5 $\pm$ 0.3 A X	0.490 $\pm$ 0.046 A
	<i>E. coli</i> substitutas	4.3 $\pm$ 1.1 A X	4.1 $\pm$ 0.4 B X	0.493 $\pm$ 0.060 A
Hueso	<i>Salmonella</i>	5.4 $\pm$ 0.4 A X	5.9 $\pm$ 0.7 A X	0.523 $\pm$ 0.031 A
	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	3.5 $\pm$ 0.4 B X	4.7 $\pm$ 0.0 B Y	0.580 $\pm$ 0.046 A
	<i>E. coli</i> substitutas	4.5 $\pm$ 0.6 B X	4.6 $\pm$ 0.3 B X	0.503 $\pm$ 0.035 A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del log UFC/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas (BDA)

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas (BFA)

<sup>c</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, S. Panama; 1190, S. B rugoso; 487 y 1606, S. Bovismorbificans y 582, S. Give

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de E. coli marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

Tabla 25. Promedio de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de bacterias débilmente y fuertemente adheridas y fuerza de adhesión (S<sub>R</sub>) después de la aplicación de Tween 20 para cepas de Salmonella y E. coli biotipo I inoculadas en tres tejidos de la canal de bovino almacenados a temperatura ambiente/30 minutos-refrigeración/24h-temperatura ambiente/30 minutos

Tejido de la canal	Microorganismo	Media de las cuentas <sup>a</sup> (log UFC/cm <sup>2</sup> ) ± DS <sup>b</sup>		S <sub>R</sub>
		BDA <sup>c</sup>	BFA <sup>d</sup>	
Músculo	Salmonella <sup>e</sup>	5.9 ± 0.5 A <sup>g</sup> X <sup>h</sup>	6.4 ± 0.4 A X	0.520 ± 0.010 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.6 ± 0.1 A X	6.2 ± 0.3 A X	0.530 ± 0.025 A
	E. coli substitutas <sup>f</sup>	5.1 ± 1.2 A X	6.0 ± 0.8 A X	0.543 ± 0.025 A
Fascia	Salmonella	6.0 ± 0.6 A X	5.8 ± 0.3 A X	0.497 ± 0.032 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	5.0 ± 0.3 A X	5.0 ± 0.2 A X	0.500 ± 0.025 A
	E. coli substitutas	5.5 ± 0.8 A X	5.2 ± 0.6 A X	0.487 ± 0.035 A
Hueso	Salmonella	5.0 ± 0.6 A X	6.1 ± 0.3 A Y	0.553 ± 0.031 A
	S. Typhimurium ATCC 14028	4.0 ± 0.1 A X	4.9 ± 0.0 B Y	0.550 ± 0.025 A
	E. coli substitutas	4.8 ± 0.8 A X	5.3 ± 0.7 B X	0.527 ± 0.035 A

<sup>a</sup> Representa el promedio de las cuentas del log UFC/cm<sup>2</sup> de la superficie

<sup>b</sup> Desviación estándar

<sup>c</sup> Bacterias débilmente adheridas (BDA)

<sup>d</sup> Bacterias fuertemente adheridas (BFA)

<sup>e</sup> Pool de cinco cepas de Salmonella: 2199, S. Panama; 1190, S. B rugoso; 487 y 1606, S. Bovismorbificans y 582, S. Give

<sup>f</sup> Pool de cuatro cepas de E. coli marcadas con proteínas fluorescentes (cepas RFP-1, GFP-3, YFP-14 y YFP-66)

<sup>g</sup> Media de las cuentas en la misma columna (por tejido) con la misma letra (ABC) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

<sup>h</sup> Media de las cuentas en la misma fila con la misma letra (XYZ) no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ )

### **7.5.6. Cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes a TA versus TA-R-TA**

De manera general, se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la cantidad ( $\log \text{UFC/cm}^2$ ) de bacterias adheridas a los tejidos de los tres grupos de bacterias entre los experimentos realizados a TA y TA-R-TA. Sin embargo al comparar los recuentos en cada condición de almacenamiento por separado no se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) en la cantidad de bacterias adheridas después de tratar los tejidos con SDS o con Tween 20. Contrario a lo mencionado en el párrafo anterior, al comparar los valores de SR calculados para los tres grupos de bacterias adheridas a los tejidos tratados con los surfactantes, no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre las dos condiciones de almacenamiento.

### **7.5.7 Comparación entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino en los experimentos con y sin tratamiento con surfactantes.**

Utilizando sólo los valores de SR calculados se realizaron las comparaciones entre ambos grupos de experimentos. No se observaron diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos entre las dos condiciones de almacenamiento (TA y TA-R-TA), ni entre los grupos de bacterias (*Salmonella*, *S. Typhimurium* y *E. coli*), o entre los tratamientos (SDS, Tween 20, sin tratamiento), pero sí ( $P \leq 0.05$ ) entre los tejidos (músculo, fascia y hueso) que provenían del almacenamiento a TA-R-TA. Fascia fue el tejido con menor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) de bacterias adheridas. Los valores totales de SR en los tejidos antes de la aplicación de detergentes fueron para fascia  $0.509 \pm 0.034$ , para hueso  $0.525 \pm 0.015$  y para músculo  $0.528 \pm 0.016$ . Después de la aplicación de los detergentes, los valores para fascia fueron  $0.501 \pm 0.035$ , para hueso  $0.541 \pm 0.046$  y para músculo  $0.531 \pm 0.032$ .

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Prevalencia y resistencia antimicrobiana de serotipos de *Salmonella* aislados de canales de bovino.

#### 8.1.1 Prevalencia de *Salmonella*

Los hallazgos de esta investigación en relación a la prevalencia de *Salmonella* en canales de bovino que no habían sido tratadas con agentes antimicrobianos son similares a los reportados previamente en México y en otros países. En Estados Unidos, la prevalencia de *Salmonella* en canales de bovino durante la pre-evisceración ha sido reportada de 1.4 a 57.8% (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Bosilevac et al., 2009; Sofos et al., 1999a). En el Reino Unido, *Salmonella* fue aislada del 0 al 20% de las canales muestreadas antes del lavado con agua y enfriado (Small et al., 2006). En Senegal, el 42.8% de las canales muestreadas antes del enfriado fueron positivas para *Salmonella* en un rastro donde no se seguían las buenas prácticas de manufactura (BPM) (Stevens et al., 2006). En tanto que en México, la información relacionada es escasa y un reporte señala que este patógeno estuvo presente en el 14.0% (5/36) de las canales de bovino muestreadas en un rastro municipal del Estado de Hidalgo (Hernández-San Juan et al., 2007).

En este trabajo encontramos que la contaminación por *Salmonella* en las canales de bovino es afectada por la época del año, estos hallazgos concuerdan con estudios previos. Sofos et al (1999a) encontraron frecuencias de aislamiento de *Salmonella* de 5.2 y 8.5% en canales de bovino pre-evisceradas durante las estaciones seca y húmeda, respectivamente. Después del lavado final de las canales la frecuencia de *Salmonella* fue de 1.8 y 3.0% durante las estaciones seca y húmeda, respectivamente. En otro estudio, Barkocy- Gallagher et al (2003) reportaron que la prevalencia de *Salmonella* en canales de bovino pre-evisceradas fue mayor durante el verano y otoño (19.7 a 4.9%) en comparación con la prevalencia observada en invierno y primavera (3.0 a 4.1%).

Durante la estación húmeda, las pieles del ganado son más propensas a ensuciarse con lodo y heces, incrementando la posibilidad de contaminación de las canales durante la remoción de la piel y evisceración (Rivera-Betancourt et al., 2004).

El ganado que se presenta para sacrificio en cada rastro proviene de diferentes corrales de engorda ubicados en diferentes áreas geográficas, lo que puede explicar la diversidad de serotipos de Salmonella identificados. Es posible que S. Grupo B sea prevalente en el ganado de las diferentes regiones incluidas en el estudio debido a que fue recuperada de las muestras de canales de bovino obtenidas en tres diferentes establecimientos.

S. Anatum, S. Montevideo, S. Muenster, S. Give, S. Infantis, S. Typhimurium, S. Enteritidis y S. Oranienburg encontrados en este estudio han sido aislados de canales de bovino en otros países. En EUA, S. Montevideo, S. Give, S. Newport, <sup>c</sup>6,7:k:- y S. Agona fueron los cinco serotipos más importantes aislados de vacas y toros, mientras que S. Bareilly, S. Give, S. <sup>c</sup>III\_61:-:1,5,7, S. Montevideo y S. Muenchen fueron los cinco serotipos más comúnmente recuperados de novillos y vaquillas en 2009 (USDA, 2011b). En Australia, los serotipos S. Bredeney, S. Give, S. Mbandaka y S. Muenchen fueron los más comúnmente aislados de canales de bovino en un estudio realizado en 2003 (Fegan et al., 2005). En Bélgica, Ghafir et al (2005), reportaron S. Typhimurium, S. Enteritidis y S. Derby como los serotipos más prevalentes en canales de bovino colectadas entre 2000 y 2003. En Senegal, Stevens et al (2006) reportaron que los serotipos S. Bredeney, S. Hindmarsh S. Oranienburg y S. Muenster fueron los más prevalentes en canales de bovino en 2003. En el Reino Unido, encontraron S. Anatum, S. Dublin, S. Orough:i:1 y S. Kimuenza en canales de terneras, mientras los serotipos S. Mbandaka, S. Orough:i:1,w, S. Orough:z10:e,n,z15 y S. 6,7:~:no móvil fueron frecuentemente aislados de canales de bovino (Small et al., 2006). La prevalencia de serotipos en las canales de bovino cambia en el tiempo (Callaway et al., 2008; USDA, 2011b) y podría estar relacionada con los serotipos predominantes presentes en el ganado de una región geográfica determinada o influenciada por los serotipos establecidos en el entorno del rastro (Small et al., 2006).

Algunos de los serotipos predominantes identificados en el presente estudio han sido asociados con casos de salmonelosis. *S. Enteritidis* es el serotipo más frecuentemente relacionado con infecciones humanas en los Estados Unidos desde 2007, seguido por *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana*, *S. Heidelberg* y *S. Montevideo* (CDC, 2010). En los Países Bajos, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* han sido los serotipos más prevalentes en pacientes con infecciones clínicas (van Duijkeren et al., 2002). En México, los cinco serotipos más frecuentemente relacionados con infecciones humanas de 1972 a 1999 fueron *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Agona* y *S. Newport* (Gutierrez-Cogco et al., 2000). Siete serotipos (39%) aislados de canales de bovino durante la presente investigación se encuentran entre los 20 serotipos más comúnmente asociados con infecciones humanas en México. Sin embargo, se necesitan más estudios de prevalencia y mayor evidencia epidemiológica para poder establecer una relación entre los aislamientos de *Salmonella* obtenidos de carne de bovino y aquellos relacionados con casos humanos de salmonelosis en México (Bosilevac et al., 2009).

### **8.1.2 Resistencia antimicrobiana**

No se encontraron reportes previos sobre la resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Salmonella* recuperados de canales de bovino en México con propósitos de comparación. Sin embargo, nuestros hallazgos son similares a los reportados en estudios previos de otros países. En Estados Unidos y Canadá, la resistencia a TET y/o STR fue la más comúnmente observada entre aislamientos de *Salmonella* recuperados de canales de bovino encontrándose que de 5.8 a 36.8% de los aislamientos analizados fueron resistentes a TET y 29.2% fueron resistentes a STR (Beach et al., 2002; Larkin et al., 2004). Estudios previos llevados a cabo en México en productos cárnicos comercializados en establecimientos al menudeo revelaron que entre el 28.6 y el 92.5% de los aislamientos recuperados de *Salmonella* fueron resistentes a TET y entre el 63.3 y el 87.8% fueron resistentes a STR (Miranda et al., 2009; Zaidi et al., 2008; Zaidi et al., 2006). Los resultados obtenidos en la presente investigación y los reportados por otros investigadores de nuestro país sugieren que la resistencia observada contra antimicrobianos que han sido usados en la producción animal por largos periodos, tales

como TET, STR, SXT y CHL, es común entre aislamientos de Salmonella recuperados de carne cruda en México (Miranda et al., 2009).

Los aislamientos MR de *S. Typhimurium* presentaron tres fenotipos de multirresistencia, aunque ninguno correspondió al fenotipo de típico de penta-resistencia ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida y tetraciclina) comúnmente encontrado en *S. Typhimurium* DT104. No obstante, un aislamiento de *S. Grupo B* que fue resistente a siete diferentes antimicrobianos presentó el fenotipo AMP-CHL-STR-SXT-TET-NAL-CEP y puede representar una importante amenaza para la salud pública. La resistencia al ácido nalidíxico observada en este aislamiento ha sido relacionada con una disminución de la susceptibilidad a la ciprofloxacina (Stevenson et al., 2007) la cual es el tratamiento preferido para la salmonelosis no tifoídica en adultos (Guerrant et al., 2001). Se observó una disminución de la susceptibilidad a varios antimicrobianos entre los aislamientos MR (Tabla 5), además un aislamiento de *S. Typhimurium* que fue resistente al NAL tuvo también disminución de la susceptibilidad a CIP, dicha circunstancia está asociada con un mayor riesgo de fracaso del tratamiento.

La frecuencia de aislamientos multirresistentes de Salmonella fue significativamente mayor en el rastro C (44.7%,  $P \leq 0.05$ ), seguido por los rastros D (13.2%), B (7.9%) y A (2.6%). El rastro C está localizado en una de las áreas de producción animal más importantes de México, tiene el inventario más grande de ganado en el Estado de Jalisco y mayor número de sistemas de producción intensiva comparado con otras áreas incluidas en esta investigación, donde predominan los métodos de ganadería extensiva (SIAP, 2010). El uso de antimicrobianos es más común en sistemas de ganadería intensiva para prevenir y limitar enfermedades. De acuerdo con el USDA, aproximadamente el 25% de las pequeñas operaciones de engorda de ganado utilizan antimicrobianos en comparación con el 70% de las operaciones intensivas en los EUA, por lo que el ganado en las operaciones intensivas tiene casi el doble de probabilidad de recibir antibióticos en su alimentación y agua en comparación con el ganado en operaciones pequeñas (USDA, 2007). Es posible que la administración de antimicrobianos sea más común en las operaciones de engorda de gran capacidad que

llevan animales al rastro C, lo cual puede estar relacionado a la alta frecuencia de aislamientos MR de Salmonella encontrados en las canales de bovino de este rastro. No obstante, se requieren más estudios para confirmar estos resultados debido a la falta de información sobre el uso de antimicrobianos en los animales destinados al consumo en México.

## **8.2 Determinación de bacterias indicadoras de calidad sanitaria**

### **8.2.1 Bacterias mesófilas aerobias**

Los resultados del presente estudio difieren de otros reportes. En canales de bovino muestreadas en cuatro rastros en Finlandia, se observaron cuentas promedio de BMA de  $2.5 \log \text{ UFC/cm}^2$  con un rango de 1.0 a 3.5. Las muestras fueron tomadas antes del enfriamiento de las canales en dos áreas de  $25 \text{ cm}^2$  de la región de la falda y del hombro (Rahkio, Korkeala, 1996). Los investigadores asocian éstas cuentas con la contaminación aérea y la reducción en periodicidad de la desinfección. Es probable que los niveles limpieza de los rastros del presente estudio sean inferiores a los del estudio de referencia, reflejándose en cuentas de BMA más elevadas. En México, la media de los recuentos de BMA en 36 canales de bovino muestreadas en un rastro municipal del estado de Hidalgo fue de  $4.4 \pm 1.1$  con valor mínimo de 3.1 y máximo de  $7.4 \log \text{ UFC/cm}^2$  (Hernández-San Juan et al., 2007), resultados muy similares a los encontrados en el presente estudio, aunque los tamaños de muestras fueran diferentes.

En un estudio realizado en rastros de Jalisco se reportó que el 65% de las canales de bovinos después del lavado con agua tuvieron recuentos de 4.0 y  $4.9 \log \text{ UFC/cm}^2$  (Campos Bravo, 2001), niveles de bacterias iguales a los reportados en el presente estudio. El estudio referido fue realizado en rastros diferentes a los incluidos en la actual investigación.

Bajo condiciones sanitarias aceptables en rastros tecnificados de los EUA, el USDA (1994) reportó que el promedio de los recuentos de BMA en canales de bovino fue de  $2.7 \log \text{ UFC/cm}^2$ , indicada por la flecha azul en la Figura 3, mientras que la

flecha roja indica el promedio de BMA en las canales de bovino en el presente estudio y que el 93.1% de las canales tuvo recuentos de  $4.0 \log \text{ UFC/cm}^2$  o menores y el 6.9 % presentó recuentos mayores a  $4.0 \log \text{ UFC/cm}^2$ . Al comparar estos datos con el presente estudio, es evidente que en los rastros estudiados las cuentas de BMA fueron superiores a las reportadas en rastros de los EUA.

Existen reportes respecto a la distribución de los recuentos de bacterias indicadoras en diferentes épocas del año. Sofos et al (1999a) reportaron cuentas de BMA entre 1 y  $4 \log \text{ UFC/cm}^2$  en el mayor porcentaje de muestras de canales de bovino ( $n= 3,780$ ) de siete rastros recolectadas durante la pre-evisceración, después del lavado final y después de 24 h de refrigeración, durante las épocas seca y húmeda. Los recuentos de BMA en ambos estudios muestran una similitud y en ambos estudios hubo gran variabilidad en las cuentas, aunque en el estudio de referencia no hubo diferencias en los recuentos de BMA en las dos épocas del año, mientras que en el presente estudio los recuentos fueron más elevados en la época húmeda. Algunas de las características de los rastros del estudio mencionado anteriormente fueron que 3 de 7 no aplicaban enjuague final de las canales, mientras que 4 de 7 no aplicaban tratamiento químico. Los investigadores concluyeron sobre la necesidad reducir la contaminación microbiana.

En México no existen criterios respecto al número de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales o *E. coli* para determinar la calidad microbiológica o el control de procesos para la carne en canal. En el caso de la Unión Europea, el criterio de higiene para los procesos de la carne y sus derivados señala que la higiene del proceso es satisfactoria cuando en canales muestreadas después del faenado y antes del enfriamiento, el promedio diario del recuento de BMA es igual o inferior a  $3.5 \log \text{ UFC/cm}^2$ , como un proceso de higiene aceptable cuando dicho valor se encuentre entre  $3.5$  y  $5.0 \log \text{ UFC/cm}^2$ , e insatisfactorio donde el recuento sea mayor a  $5.0 \log \text{ UFC/cm}^2$  (European Union, 2005). De acuerdo a estos criterios, el 11.8% de las muestras de este estudio cumplirían con ese criterio indicando que el proceso es satisfactorio, 72.9% que es el proceso de higiene es aceptable y el 15.2% que el proceso de higiene es insatisfactorio. En los rastros B y C el mayor porcentaje de muestras (24.6 y 17.5%

respectivamente) indicarían un proceso de higiene satisfactorio y en los rastros A y D el mayor porcentaje de muestras indicarían un proceso de higiene insatisfactorio (Tabla 8). Es importante aclarar que los estándares que utilizan otros países solo son útiles como puntos de referencia, ya que existen diferencias en las condiciones bajo las cuales son aplicables dichos valores y las condiciones de los rastros municipales mexicanos por lo que no se pretende adoptar éstos criterios.

Tabla 26. Límites de aceptabilidad de bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino en rastros municipales respecto al reglamento de la Unión Europea.

Rastros	No. Muestras (%)		
	Satisfactorio $\leq 3.5 \log \text{ UFC/cm}^2$	Aceptable $3.5-5.0 \log \text{ UFC/cm}^2$	Insatisfactorio $> 5.0 \log \text{ UFC/cm}^2$
A	6 (4.76)	91 (72.2)	29 (23.0)
B	30 (24.6)	87 (71.3)	5 (4.1)
C	22 (17.5)	92 (73.0)	12 (9.5)
D	1 (0.8)	94 (75.2)	30 (24.0)
Total	59 (11.8)	364 (72.9)	76 (15.2)

Unión Europea, 2005

### 8.2.2 Coliformes totales

En el estudio realizado en un rastro del Estado de Hidalgo, México (Hernández-San Juan et al., 2007), la media de los recuentos de CT observados en el 83% de las muestras fue de  $1.03 \pm 1.58 \log \text{ UFC/cm}^2$  con valor máximo de  $6.01 \log \text{ UFC/cm}^2$ . El mayor porcentaje de muestras de ese estudio tuvo recuentos bajos de CT, mientras que los obtenidos en este trabajo mostraron recuentos de CT más altos que los reportados en el rastro de Hidalgo. Es probable que el tamaño de muestra pequeño (36 canales de bovino) analizado en ese estudio, entre otros factores, hayan influido en el resultado.

Al comparar los resultados del presente estudio con el reporte del USDA de 1994 para carne de bovino en canal en donde la media del recuento de CT fue de  $1.5 \log \text{ UFC/cm}^2$  (flecha color azul) se observaron resultados similares (Figura 4). En ese reporte, sólo el 16.3% de las muestras tuvo recuentos de CT y de éstos, el 96.4% con  $\leq 2.0 \log \text{ UFC/cm}^2$  y el 3.6% con recuentos  $\geq 2.0 \log \text{ UFC/cm}^2$ , mientras que en el presente estudio sólo el 25% de las muestras tuvo recuentos  $< 0.9 \log \text{ UFC/cm}^2$  y el

69.3% mostró recuentos  $\leq 1.9 \log \text{UFC/cm}^2$  y el 30.8% de las muestras tuvo recuentos  $> 2 \log \text{UFC/cm}^2$  de CT (Tabla 10).

En el estudio realizado por Sofos et al (1999a) en establecimientos de sacrificio de los EUA, la media de los recuentos de CT para la época seca y húmeda fue de -0.62 a -0.26  $\log \text{UFC/cm}^2$  respectivamente, recuentos muy por debajo de los reportados en el presente estudio. Los recuentos de CT en la presente investigación fueron más altos que los del estudio mencionado, probablemente hayan influido factores como el diseño de las instalaciones, mejores condiciones de higiene, aplicación de lavados con agua y la aplicación de tratamientos químicos en algunos casos para reducir la contaminación microbiana.

### 8.2.3 *Escherichia coli*

Hernández-San Juan et al (2007) reportaron recuentos promedio de *E. coli* de  $0.3 \pm 0.65 \log \text{UFC/cm}^2$ , con un valor máximo de  $0.98 \log \text{UFC/cm}^2$  en el 69% de las muestras de canales de bovino analizadas en su estudio. Al parecer en ese estudio un mayor porcentaje de muestras tuvo recuentos de *E. coli* menores que en el presente estudio.

Los recuentos de *E. coli* reportados en este estudio contrastan de manera importante con reportes del USDA en canales de bovino recolectadas en rastros tecnificados. En 1994, encontraron que sólo el 8.2% de las muestras de canales de bovino (n=2,089) contenían *E. coli* comparado con el 96% de muestras positivas a la presencia de este indicador en el presente estudio. La media de los recuentos en el estudio del USDA fue de  $1.6 \log \text{UFC/cm}^2$  (flecha azul en la figura 3), y de las muestras positivas, el 95.9% tuvo cuentas  $< 1.0 \log \text{UFC/cm}^2$  y el 4.1% presentó recuentos  $> 1.0 \log \text{UFC/cm}^2$  (USDA, 1994). Posteriormente esta misma institución (1997-1998) dentro de su programa nacional de muestreo microbiológico con esponja en canales de bovinos reportó que el 16.6% (n=1,881) de las muestras analizadas mostró la presencia de *E. coli* con un recuento promedio de  $-0.6 \log \text{UFC/cm}^2$  (Figura 5). De las muestras positivas, el 100% tuvo  $\leq 2 \log \text{UFC/cm}^2$  de *E. coli* y de éstas el 98.9% mostraron  $\leq 1 \log \text{UFC/cm}^2$

(USDA, 1999). Es evidente que la implementación de controles de proceso se traduce en una baja prevalencia y cifras muy bajas de *E. coli* en las canales de bovino, en otras palabras en el control de la contaminación fecal.

En el reporte de Sofos et al (1999a) los recuentos promedio para *E. coli* en la época húmeda también fueron inferiores a los reportados en el presente estudio y variaron de -0.74 a -0.45 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Por otra parte, se observó una gran variabilidad (dispersión) en los recuentos de BMA (Tablas 6 y 7; Figura 3), de CT (Tablas 9 y 10; Figura 4) y de *E. coli* (Tablas 11 y 12; Figura 5). La variabilidad indicó que existía una falta de control en todo el proceso de obtención de la carne, ya que al no existir uniformidad en la manera en la que se realizan cada una de las operaciones, no es posible mantener una calidad microbiológica constante de la carne. En rastros en EUA también se observaron variaciones en los recuentos de los tres grupos indicadores, y los investigadores señalaron que fue influenciada por la estación climática, localización dentro de la planta, y en cierta medida por el sitio de la canal muestreado (Sofos et al., 1999a). Estos factores pudieron también haber influido en la variabilidad en los recuentos observada en el presente estudio, además de otros como la falta de control en los procesos.

La presencia de *E. coli* en el 96.0% de las muestras analizadas en este estudio es de gran importancia. Esta bacteria es habitante normal del intestino de los bovinos y puede llegar a contaminar las canales a través de la materia fecal proveniente de la piel, durante el desollado (Gill, 2004; Rivera-Betancourt et al., 2004) o del contenido intestinal, durante la evisceración (Fegan et al., 2005). Una vez contaminada la canal, la contaminación puede distribuirse a otras canales mediante el contacto entre éstas, o por el contacto con cualquier otra superficie, favoreciendo que el ciclo de contaminación continúe en el rastro. Se han reportado recuentos más elevados de BMA y *E. coli* en sitios de la canal contaminados directamente con materia fecal o que contactan con pieles contaminadas con materia fecal, que en los casos donde el contacto ha sido con la piel limpia o sitios no sujetos a la contaminación fecal (Bell, 1997). Es muy importante

el apego a las buenas prácticas de manufactura y controlar la higiene del proceso, lo cual permitiría mantener una calidad constante de la carne, pero además controlar la contaminación fecal y en consecuencia reducir la posibilidad de la presencia de patógenos como Salmonella en las canales de bovino.

Otras bacterias también pueden estar presentes en el contenido intestinal, entre éstas, bacterias patógenas como Salmonella capaces de causar enfermedad en los seres humanos (USDA, 2010). Ghafir et al (2008), determinaron bacterias indicadoras en canales de bovinos, cerdos y pollos y encontraron una correlación entre los recuentos de BMA, enterobacterias y E. coli y observaron que las muestras que contenían cuentas altas de E. coli y enterobacterias estaban contaminadas con Salmonella, confirmando la utilidad de E. coli como indicador de malas prácticas higiénicas que pueden propiciar la presencia de otros patógenos entéricos. En el presente estudio se pudo observar un comportamiento similar en la prevalencia de Salmonella y los recuentos de bacterias indicadoras durante el tiempo del estudio. La prevalencia de Salmonella fue de 5.5% en la época seca y de 22.0% en la época húmeda, mientras que en el caso de los indicadores los recuentos fueron más elevados durante la época húmeda (Tabla 2; Figuras 3-5).

La investigación de E. coli como indicador es la medida más efectiva para determinar si el proceso de sacrificio y faenado controla (previene) la contaminación fecal. La sola presencia de E. coli es importante más que su número ya que evidencia la contaminación con materia fecal, la cuál es inaceptable en algunos países (Heuvelink et al., 2001; USDA, 1996). El USDA establece que el control del proceso es aceptable cuando los niveles de E.coli/cm<sup>2</sup> son  $\leq 5$  UFC (considerado como ausencia o equivalente a decir que una muestra es negativa), como control marginal la presencia de  $\leq 100$  UFC/cm<sup>2</sup> e inaceptable por arriba de éste límite (USDA, 1996). Si las canales analizadas en este estudio debieran cumplir con este criterio, el 34.4 % estarían en el rango aceptable (cumpliría con el control del proceso), 52.0% en el límite marginal y el 13.6% estaría fuera del mismo (Tabla 13).

Tabla 27. Niveles de Escherichia coli en canales de bovino para determinar la aceptabilidad en el control del proceso de obtención de la carne en canal en rastros municipales de Jalisco

Rastros	Acceptable	Marginal	Inacceptable
	Negativo	Positivo pero < 100 UFC/cm <sup>2</sup> <sup>a</sup>	> 100 UFC/cm <sup>2</sup>
No. Muestras (%)			
A	35 (27.2)	75 (58.6)	18 (14.1)
B	35 (4.0)	66 (52.8)	24 (19.2)
C	66 (52.4)	56 (44.4)	4 (3.2)
D	37 (30.1)	64(52.0)	22 (17.9)
TOTAL	173 (34.4)	261 (52.0)	68 (13.6)

<sup>a</sup> Tomando en cuenta la sensibilidad de las técnicas de muestreo y del método de prueba, considera 5 UFC/cm<sup>2</sup> como negativo. USDA, 1996.

Se han reportado cuentas más elevadas de BMA y E. coli en sitios de la canal contaminados directamente con materia fecal o que contactan con pieles contaminadas con materia fecal, que en los casos donde el contacto ha sido con la piel limpia o sitios no sujetos a la contaminación fecal (Bell, 1997). Como lo señalan Gill et al (2004), se asume que reduciendo o eliminando la contaminación visible, se puede mejorar la calidad microbiológica de la carne y por lo tanto la mejor forma de reducirla es minimizando ésta durante las operaciones de desollado y evisceración, evitando la transferencia de suciedad de la piel o la salida del contenido intestinal a la carne para asegurar un mínimo de control sobre la contaminación microbiológica de la carne. Ahora bien, como ya se mencionó anteriormente, en varias ocasiones durante los muestreos realizados se observó la presencia visible de suciedad o materia fecal en las canales en todos los rastros y la contaminación cruzada fue común durante las operaciones de todos los establecimientos. Los resultados de este estudio ponen en evidencia el incumplimiento a las buenas prácticas higiénicas en los cuatro rastros estudiados y la carencia de procedimientos operativos estándar de sanitización (POES), además de que ninguno cuenta con un sistema de inocuidad de alimentos implementado.

Por otra parte, es posible encontrar rastros donde los resultados de los recuentos de bacterias indicadoras se encuentren dentro de los límites aceptables y las condiciones sanitarias no sean aceptables y viceversa, por ejemplo Rahkio and Korkeala (1996) en

Finlandia encontraron correlación entre las bacterias indicadoras y las condiciones sanitarias; en los rastros donde la frecuencia de la desinfección del equipo e instalaciones fue baja, el nivel de contaminación de las canales fue alto. Los investigadores también resaltan la importancia que tiene el diseño de las líneas de sacrificio para facilitar la limpieza y desinfección. En los resultados del presente estudio, se observaron recuentos bajos de coliformes totales y *E. coli* en algunos meses y probablemente se pudieran interpretar como que se cumple con las normas de referencia, pero se debe tener mucho cuidado ya que como lo mencionan los investigadores al principio de este párrafo se pueden tener recuentos bajos en condiciones higiénicas objetables.

#### **8.2.4 Potabilidad del agua para lavado de las canales**

La presencia de coliformes totales en las muestras de agua efluente de la manguera utilizada para el lavado de las medias canales después de ser evisceradas representa una fuente de contaminación adicional. Su presencia en el agua es indicador de contaminación fecal (Escartín, 2000). Casi el 50% de las muestras de agua correspondiente a tres de los cuatro rastros incluidos en el estudio no cumplieron con dicha especificación de la NON-127 (Salud, 2000), por lo que dicha agua no es apta para su uso en el proceso de lavado de las canales y requiere de la aplicación de tratamientos para su potabilización.

### **8.3 Comparación de las propiedades de adhesión entre serotipos de *Salmonella* aislados y un grupo de cepas de *Escherichia coli* biotipo I previamente propuestas como organismos sustitutos**

#### **8.3.1 Determinación de la hidrofobicidad**

Como se pudo observar, hubo gran variabilidad en los valores de ABH entre las cepas, las cuatro cepas de *E. coli* tuvo valores que quedaron incluidos en los valores de ABH de los grupos de cepas de *Salmonella*, por lo que en forma individual, cada cepa de *E. coli* no podría representar a todas las cepas de *Salmonella*, pero el grupo de las cuatro

cepas si podría representar a más del 80% de las cepas de Salmonella aisladas de canales de bovino.

Los resultados de hidrofobicidad son similares a los reportados por Cabrera-Diaz et al (2009) quienes reportaron para Salmonella valores de 23.8 a 43.3%, para E. coli O157:H7 de 28.2 a 54.3% y para el mismo grupo de cepas de E. coli fluorescentes de 24.9 a 45.6%, los cuales no fueron diferentes ( $P \geq 0.05$ ) entre los grupos de cepas. Las cepas de E. coli probadas en ese estudio fueron las mismas cepas incluidas en el presente trabajo por lo que es razonable que los resultados sean similares, además de que la hidrofobicidad fue determinada mediante el mismo método. En otro estudio realizado en aislamientos de E. coli productores de toxina Shiga, la hidrofobicidad para los cultivos planctónicos (cultivos en caldo nutritivo) varió de 21 a 58% y para los cultivos sésiles (cultivos en agar nutritivo) de 0 a 36%, encontrándose diferencias entre las cepas ( $P \leq 0.05$ ). Los investigadores clasificaron a las cepas en tres categorías de acuerdo a sus valores de ABH, hidrofobicidad baja (0 a 35%), moderada (36 a 70%) y alta (71 a 100%), encontrando que la mayoría de las cepas que estudiaron resultaron ser medianamente hidrofóbicas (Rivas et al., 2005). De acuerdo con esta clasificación el 33% de los aislamientos obtenidos en la presente investigación también corresponderían al grupo de mediana hidrofobicidad. Chia et al (2008) encontraron valores desde 22 a 53% para aislamientos de Salmonella. Goulter et al (2010) reportaron valores de hidrofobicidad desde 0.4 hasta 57.7% en seis aislamientos de E. coli, cinco de los cuales correspondían a E. coli O157. En éste último estudio se aplicaron tres diferentes técnicas para determinar la hidrofobicidad, adhesión bacteriana a los hidrocarburos con xileno, interacción cromatográfica y medición del ángulo de contacto. Resulta difícil hacer comparaciones entre los diversos estudios debido a las diversas técnicas que se aplican para medir la hidrofobicidad, por lo que en general se trató de contrastar los resultados del presente estudio con estudios en donde se aplicara la misma técnica y encontramos que en la mayoría de los casos los valores aquí reportados son semejantes con los de dichos estudios.

En un estudio realizado por Chia et al (2008) los valores de hidrofobicidad para los aislamientos de los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Virchow* y *S. Infantis* variaron de 22 a 37% y para la mayoría de los aislamientos de *S. Sofia* (12 de 14) variaron de 46 a 53%, los aislamientos de ese estudio provenían de aves de corral y algunos implicados en brotes de enfermedad en humanos, lo cual explicaba la diferencia entre los serotipos de ambos estudios, aunque algunos de estos valores de hidrofobicidad fueron similares a los del presente estudio.

Las cepas de *E. coli* biotipo I mostraron valores de ABH similares a los observados en *Salmonella*, por lo que las cuatro cepas pudieran ser utilizadas como microorganismos sustitutos del patógeno en estudios de adhesión en superficies bajo condiciones de producción en donde *Salmonella* no puede utilizarse directamente por cuestiones de bioseguridad.

### **8.3.2 Capacidad de *Salmonella* y *E. coli* biotipo I para formar biopelículas en la superficie de materiales inertes**

#### **8.3.2.1 Cuantificación de biopelículas en acero inoxidable.**

En un estudio donde se evaluó la adhesión en acero inoxidable de 20 aislamientos de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) provenientes de rumiantes o implicadas en brotes de enfermedad, se encontró una diferencia en la capacidad individual de las cepas para adherirse a la superficie. La mayoría de las cepas tuvieron recuentos similares ( $P > 0.05$ ) que fueron de 2.05 a 2.85 log UFC/cm<sup>2</sup> para los cultivos planctónicos y de 2.08 a 3.05 log UFC/cm<sup>2</sup> para los cultivos sésiles. La adhesión de STEC fue diferente ( $P < 0.01$ ) entre las cepas de los cultivos planctónicos y sésiles (Rivas et al., 2007b). En otro estudio realizado con 25 cepas de *Salmonella* de cuatro diferentes serotipos aislados de aves o implicadas en brotes, el promedio de células adheridas al acero inoxidable fue de 4.3 log UFC/cm<sup>2</sup>, las cuentas se realizaron en un microscopio de epifluorescencia y variaron de  $3.2 \pm 0.5$  a  $4.3 \pm 0.2$  log UFC/cm<sup>2</sup> (Chia et al., 2009). Los recuentos de bacterias formadoras de biopelículas de estos estudios son más bajos respecto a los obtenidos en el presente estudio.

En otros estudios se han reportado cantidades mayores de biopelículas que las producidas en el presente estudio. *S. Typhimurium* DT 104 mostró las cuentas más altas de biopelícula en acero inoxidable cuando fue incubada con caldos de carne y pavo a 25 °C mostrando valores de  $7.7 \pm 0.4$  y  $7.6 \pm 0.3$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. *S. Heidelberg* y *E. coli* O157:H7 tuvieron capacidad similar para formar biopelículas en acero inoxidable cuando se cultivaron en caldo de carne de res con valores de  $6.0 \pm 0.2$  y  $6.2 \pm 0.3$  log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente y en caldo de pavo con recuentos de  $5.9 \pm 0.4$  y  $6.3 \pm 0.5$  log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente; sin embargo *E. coli* O157:H7 formó mayor cantidad de biopelícula en acero inoxidable cuando se cultivó en caldo lechuga que en los otros dos caldos. En el mismo estudio también se obtuvieron las cuentas más altas de biopelículas en acero inoxidable después de cultivar a *Klebsiella pneumoniae* ( $7.71 \pm 0.5$  y  $7.65 \pm 0.3$  log UFC/cm<sup>2</sup>) y *Listeria monocytogenes* ( $7.34 \pm 0.1$  y  $6.90 \pm 0.4$  log UFC/cm<sup>2</sup>) en caldo de carne de res y de pavo respectivamente (Kim and Wei, 2007). Por otra parte, *Salmonella* Sofia se adhirió en mayor cantidad al acero inoxidable ( $P \leq 0.05$ ) que *S. Typhimurium*, *S. Virchow* y *S. Infantis* (Chia et al., 2009).

### **8.3.2.2 Cuantificación de biopelículas en látex**

Estos resultados difieren de los reportados por Chia et al (2009), en donde el promedio de las cuentas de células de *Salmonella* en la superficie de cupones de hule nitrilo fue más bajo, con un valor promedio de  $3.5 \pm 0.46$  log UFC/cm<sup>2</sup>. En otro estudio realizado por Chia et al (2008), *Salmonella* Sofia se adhirió en mayor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) que *S. Typhimurium*, *S. Virchow* y *S. Infantis* a hule nitrilo.

### **8.3.2.3 Comparación entre la cantidad de biopelícula formada en acero inoxidable y látex**

Pawar et al (2005) estudiaron la formación de biopelículas de cepas de EHEC (dos de ellas con la variante para expresar curli). En el estudio largo (7 días/28°C), EHEC se adhirió mejor a poliestireno, hule (caucho) y acero inoxidable con valores de absorbancia a 550 nm de 2.60, 2.56 y 2.51, respectivamente que al vidrio con valor de 1.63. En el estudio corto (24 h/28°C) no hubo diferencias ( $P \geq 0.05$ ) entre la formación de biopelículas en poliestireno, vidrio, acero inoxidable y hule. La utilización

de diferentes unidades para la cuantificación de biopelículas dificulta comparar estos resultados con los del presente estudio. En el estudio realizado por Chia et al (2009) la media de las cuentas de células de Salmonella adheridas al acero fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que en hule nitrilo (4.03 y 3.49 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente), éste comportamiento es contrario al observado en el presente estudio, en donde se obtuvieron cuentas más altas de biopelículas de Salmonella y E. coli en látex que en acero. Por otra parte, las bacterias se adhieren a superficies más hidrofóbicas y cargadas más negativamente que a superficies con baja hidrofobicidad (van Loosdrecht et al., 1987). El acero es hidrofílico, los polímeros y el hule son hidrofóbicos (Pawar et al., 2005), lo cual explica en parte porqué en el presente estudio una mayor cantidad de bacterias se adhirieron al látex que al acero inoxidable.

#### **8.3.2.4 Cuantificación de biopelículas en poliestireno**

Los resultados del presente estudio concuerdan con los reportados por Pawar et al (2005), en donde los valores de absorbancia a 550nm en el estudio largo (0 a 7 d) fueron más altos ( $P \leq 0.05$ ) que los obtenidos en el estudio corto (0 a 24h) en las superficies por ellos estudiadas (poliestireno, acero, vidrio), excepto en caso del hule donde no hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ). En poliestireno, los promedios de los valores de absorbancia a 550 nm para las cepas de E. coli O157:H7 en el estudio corto variaron desde 0.06 hasta 0.65 y en el estudio largo desde 0.38 en la primer día hasta 1.22 a los 7 días. Los valores de absorbancia para algunas de las cepas de Salmonella y E. coli reportados en el presente estudio son similares a los del estudio de referencia. Por otra parte, se estudió la producción de biopelículas en una colección de cepas de Salmonella originarias de productos vegetales, carne y cepas clínicas relacionadas con brotes (Solomon et al., 2005). Los valores promedios de absorbancia a 590 nm en tres diferentes medios de cultivo variaron de 0.064 a 0.535 (clínicos), de 0.077 a 0.430 (carne y productos relacionados) y de 0.111 a 0.525 (vegetales). Se encontraron aislamientos provenientes de las tres fuentes con gran capacidad para formar biopelículas. Rivas et al (2007a) encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la producción de biopelículas entre aislamientos de E. coli en cultivos planktónicos y sésiles en 24 y 48 h, en donde 4 de 10 aislamientos de E. coli productora y no productora de toxina Shiga

mostraron la mayor producción de biopelículas ( $P < 0.05$ ) después de 24 h. Se podría decir que independientemente de las cepas y su origen, las enterobacterias tienen un comportamiento similar en su capacidad para formar biopelículas en superficies inertes bajo condiciones ambientales similares.

Kim and Wei (2007) denominaron a las cepas con valores de absorbancia a 570 nm mayores 0.82, como fuertes formadoras de biopelícula en poliestireno al ser comparadas con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada como control. Los investigadores encontraron a las cepas de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* como fuertes formadores de biopelículas. *S. Typhimurium* DT104, *S. Heidelberg*, *E. coli* O157:H7 y *Klebsiella pneumoniae* mostraron también los valores más altos de absorbancia. En el estudio realizado por Solomon et al (2005) los aislamientos de serotipos de *Salmonella* obtenidos de diferentes carnes con los valores más elevados de absorbancia a 590 nm en CST y 1/20-CST fueron *S. Hadar* y *S. Typhimurium*.

#### **8.3.2.5 Relación entre la hidrofobicidad (ABH) y la formación de biopelículas entre las cepas de *Salmonella* y de *E. coli* biotipo I**

Si bien existen diversos reportes en donde se encontró una relación entre la hidrofobicidad y la adhesión de las bacterias a diferentes superficies (Nguyen et al., 2011; van Loosdrecht et al., 1987), en el presente estudio y en otras investigaciones no se ha encontrado correlación entre la hidrofobicidad y el número de bacterias adheridas al acero inoxidable (Hassan and Frank, 2004; Rivas et al., 2005, 2007b). Otros estudios señalan que la relación entre la hidrofobicidad y la adhesión a superficies hidrofóbicas o hidrofílicas fue altamente variable (Goulter et al., 2010).

La mayoría de las cepas estudiadas en el presente estudio (66%) tuvieron baja hidrofobicidad, lo cual podría indicar que la adhesión al acero, látex y poliestireno no estuvo influenciada en su totalidad por la hidrofobicidad de la superficie de las cepas y que por lo tanto otras propiedades de la célula como la presencia de estructuras (fimbrias, flagelos o sustancias poliméricas extracelulares) y la influencia de factores

ambientales (pH, temperatura, composición del medio, etc) estarían interactuando (Donlan, 2002; Bouttier et al., 1997; Moe et al., 2009; Vu, 2009).

Una tercera parte de las cepas fueron medianamente hidrofóbicas y solo dos de estas cepas correspondientes a *S. Give* y *S. Bovismorbificans* se destacaron por formar la mayor cantidad de biopelículas en las tres superficies estudiadas. Los serotipos de *Salmonella* que presentaron los valores más altos de hidrofobicidad no fueron los mismos que resultaron ser mejores formadores de biopelículas, y se podría considerar que la capacidad de formar biopelículas depende del ambiente que rodea a una bacteria, pero también de características propias de su superficie y la superficie a la cual se adhiere (Kim and Wei, 2007; Donlan, 2002; Bouttier et al., 1997; Cloete et al., 2009), por lo que sería interesante realizar más estudios para conocer con mayor detalle las características de las cepas y compararlas entre sí.

Las cepas de *E. coli* biotipo I mostraron valores de ABH que no fueron diferentes a los observados en *Salmonella* y produjeron cantidades similares de biopelículas a las producidas por los diferentes grupos de cepas de *Salmonella*, por lo que las cuatro cepas analizadas en este trabajo pueden ser utilizadas como microorganismos sustituto del patógeno en estudios de adhesión en superficies bajo condiciones de producción en donde *Salmonella* no puede utilizarse directamente por cuestiones de bioseguridad.

#### **8.4 Influencia de la topografía y composición superficial de la canal de bovino en el grado de adhesión de serotipos de *Salmonella* y de *E. coli* biotipo I.**

##### **8.4.1 Diferencia entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino**

En el presente estudio, la composición superficial y topografía de los diferentes tejidos de la canal de bovino no influyeron en la adhesión de *Salmonella* y *E. coli* biotipo I. Los resultados del presente estudio coinciden con los de Cabedo et al (1997) quienes después de inocular *E. coli* O157:H7 durante 20 minutos en músculo y grasa de bovino no encontraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre el número de bacterias

adheridas en ambos tejidos. En dicho estudio, el promedio de bacterias recuperadas fue de  $5.5 \pm 0.1$  y  $5.3 \pm 0.1$  log UFC/cm<sup>2</sup> en músculo y grasa respectivamente, aunque los investigadores no hicieron una diferenciación entre las BDA y BFA.

#### **8.4.2 Diferencias entre los grupos de cepas adheridas a los tejidos de la canal de bovino expresadas en log UFC/cm<sup>2</sup>**

En general las diferencias observadas entre las medias de los recuentos (log UFC/cm<sup>2</sup>) de las bacterias en cada tejido variaron desde 0.02 hasta 1.82 log UFC/cm<sup>2</sup> y podría ser discutible su relevancia desde un punto de vista práctico. Es importante mencionar que las pequeñas diferencias observadas en los recuentos del grupo de cepas de Salmonella y el de las E. coli podrían además estar influenciadas porque los niveles de recuperación del inóculo del grupo de cepas de E. coli fueron siempre más bajos que los del grupo de cepas de Salmonella y del control de S. Typhimurium, como se puede observar en la Tabla 20. Por esta razón el mejor indicador para determinar las diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos es el valor de SR calculado o fuerza de adhesión obtenida de acuerdo a la fórmula indicada en la sección 8.4.4, ya que expresa el porcentaje de bacterias fuertemente adheridas a los tejidos.

#### **8.4.3 Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de los grupos de cepas adheridas a los tejidos**

Como se observó en los experimentos de formación de biopelículas en superficies inertes, el comportamiento de los diversos serotipos de Salmonella es variable y dependiente de la cepa (Chia et al., 2009) y de otros factores como la variabilidad biológica de cada serotipo (Jain and Chen, 2007), tales como características de la superficie celular (Bouttier et al., 1997; Dickson, Koohmaraie, 1989), esto podría explicar en parte las diferencias observadas en los valores de SR de la cepa control de S. Typhimurium y los valores de SR del grupo de cepas de Salmonella en los experimentos realizados a TA. A excepción del tejido adiposo, el grupo de cepas de Salmonella y el de E. coli mostraron el mismo comportamiento en su capacidad para adherirse a los otros tejidos aquí estudiados. De acuerdo con estos resultados, el grupo de cepas de E. coli

biotipo I tendrían potencial para ser utilizadas como sustitutos de Salmonella en la validación de tratamientos de descontaminación.

Valores de SR similares (0.52 y 0.56) a los observados en el presente estudio se han reportado en algunas cepas de E. coli productoras de toxina Shiga provenientes de cultivos planctónicos (cultivos en caldo nutritivo) y que fueron inoculadas en músculo en un baño con  $10^6$  UFC/ml en PBS con baja fuerza iónica (PBS 0.75 mM) (Rivas et al., 2006). De acuerdo con el citado estudio, no se observaron diferencias entre los valores de SR entre las cepas, pero mostraron valores más altos ( $P \leq 0.05$ ) de SR en grasa que en músculo.

Los resultados del presente estudio difieren de los reportados por Dickson y Koohmaraie (1989), quienes reportaron valores de SR para E.coli de 0.118 y 0.183, respectivamente y para Salmonella Typhimurium de 0.170 y 0.139, respectivamente, en músculo magro y grasa con un tiempo para la adhesión de 5 min a temperatura ambiente. Los investigadores encontraron mayor porcentaje de Salmonella adherida a las superficies de músculo magro que a grasa y en E. coli mayor porcentaje adherido a grasa que a músculo magro. La cepa de Salmonella que ellos utilizaron es la misma cepa incluida como control en el presente estudio y los valores de SR que observamos fueron mayores que en el estudio de referencia.

Cabrera-Diaz et al (2009) también obtuvieron valores de SR diferentes a los del presente estudio en áreas de la canal como la pulpa, pecho y paleta, en donde reportaron valores de SR de 0.162 a 0.224, de 0.099 a 0.236 y de 0.149 a 0.296 para un grupo de cepas de E. coli propuestas como organismos sustitutos, de E. coli O157:H7 y de Salmonella, respectivamente. Los investigadores tampoco encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los valores de SR de las cepas de E. coli y Salmonella independientemente del área de la canal. Es importante mencionar que las cepas de E. coli propuestas como sustitutos de los patógenos en dicho estudio fueron las mismas que se incluyeron en el presente estudio, por lo que es probable que las diferencias en los valores de SR de éstas cepas entre ambos estudios se deban a variaciones en

preparaciones y aplicación de inóculos a las muestras. En el estudio mencionado el vehículo de inoculación de las muestras consistió en una suspensión de materia fecal de bovino y en este estudio se emplearon suspensiones de bacterias en una solución amortiguadora de fosfatos. Aunque en el estudio de Cabrera-Díaz et al se menciona que existe mayor dificultad para retirar el inóculo cuando se utilizan inóculos en suspensiones de materia fecal, también es probable que la materia orgánica y la microbiota nativa presente pudieran interferir en la cantidad de bacterias fuertemente adheridas.

#### **8.4.4 Comparación entre la cantidad de bacterias débilmente adheridas y bacterias fuertemente adheridas en cada grupo de cepas**

Como se explica en la sección 7.4.5 de resultados, una mayor cantidad de bacterias se adhirieron fuertemente (BFA). Para los casos en donde se encontró una menor cantidad de BDA que las originalmente inoculadas (inóculos), la diferencia entre estos dos (BDA e inóculos) podrían correspondieran a BFA o bien, a bacterias no adheridas (ni BDA ni BFA) que se perdieron como resultado de la manipulación en los experimentos. En los casos donde no hubo diferencias entre la cantidad de BFA y el inóculo podría considerarse que la misma cantidad de las bacterias inoculadas se adhirieron fuertemente a los tejidos. En TA las diferencias entre la cantidad de BDA y BFA fueron  $\geq 0.5 \log \text{UFC/cm}^2$  y  $< 1.0 \log \text{UFC/cm}^2$ , mientras que a TA-R-TA las diferencias variaron desde 0.1 hasta  $1.4 \log \text{UFC/cm}^2$ . Como ya se ha comentado anteriormente estas diferencias podrían ser discutibles desde un punto de vista práctico. Situaciones similares fueron señaladas por Dickson et al (1991) con relación a diferencias menores a  $0.5 \log \text{UFC/cm}^2$  pero significativas en la adhesión de *S. Typhimurium* a músculo magro y grasa, así como diferencias en la concentración de células reportadas por Rivas et al (2006).

En otros reportes se han encontrado mayores cantidades de bacterias débilmente adheridas que de bacterias fuertemente adheridas. En un estudio realizado en canales de bovino (Warriner et al., 2001), no se encontraron diferencias significativas entre la adhesión de *Pseudomonas fragi*, *E. coli*, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*

inoculados en cortes de lomo proveniente de canales de bovino sin pasteurizar y mantenidas a 24 °C por 30 min para permitir la adhesión, además se encontraron mayor número de bacterias débilmente adheridas que fuertemente adheridas ( $P \leq 0.05$ ) para las tres bacterias.

Rivas et al (2006) en sus ensayos con cepas de *E. coli* (STEC) inoculadas en músculo y grasa a partir de cultivos planctónicos (provenientes de caldo) y sésiles (provenientes de agar), encontraron que la media de la concentración de bacterias débilmente adheridas ( $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ) fue consistentemente más alta que la de las bacterias fuertemente adheridas. En sus cultivos planctónicos encontraron mayor cantidad ( $P \leq 0.05$ ) de BDA y de BFA en la grasa que en músculo.

En otros estudios se ha reportado mayor cantidad de bacterias adheridas a superficies de la carne después de un tiempo de contacto determinado, que las originalmente inoculadas. La cantidad de *S. Choleraesuis* (flageladas) se incrementó respecto al inóculo inicial en 1.5 log y 1.7 log  $\text{UFC}/\text{cm}^2$  en lomo y grasa respectivamente entre 1 y 30 min de contacto con el inóculo (Bouttier et al., 1997). En otro estudio también el número de bacterias fuertemente adheridas de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* en músculo y grasa se incrementó con el tiempo respecto al inóculo inicial (Dickson, 1991).

Los resultados de este estudio no indicaron diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos. Para el caso del tejido graso, la manipulación de las muestras durante su obtención pudo haber influido en los resultados obtenidos propiciando la ruptura del tejido modificando sus propiedades hidrofóbicas, como lo señalan también en su estudio Dickson and Koohmaraie (1989). Se ha reportado la fascia como el mejor tejido para la adhesión de las bacterias (Firstenberg-Eden, 1981), la diferencia entre dicho estudio y el presente es que en el referenciado la adhesión se realizó sobre la fascia adherida al músculo y nosotros utilizamos la fascia obtenida a partir del músculo, grasa y tendones.

#### **8.4.5 Comparación entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal TA versus TA-R-TA**

Al realizar la comparación entre los valores de SR calculados para las bacterias, no se observaron diferencias entre las dos condiciones de almacenamiento. Es probable que la condición de refrigeración inhibiera el desarrollo de las bacterias y al cumplirse las 24 h de almacenamiento en esa temperatura y los 30 minutos siguientes a TA no fueran suficientes para permitir un incremento de la población bacteriana. Cabedo et al (1997) tampoco encontraron diferencias significativas en la fuerza de adhesión de *E. coli* O157:H7 entre músculo ( $0.49 \pm 0.40$ ) y grasa ( $0.32 \pm 0.17$ ) después de 3h a 4°C y explican que se debió a que la bacteria no es psicrótrofa, por lo que la refrigeración no permitió la formación de estructuras del exopolisacárido que permitieran una adhesión mas fuerte.

En las condiciones aplicadas en este trabajo las bacterias no se multiplicaron, el hecho de que aparentemente hubiera una mayor cantidad ( $\log \text{UFC}/\text{m}^2$ ) de bacterias en TA-R-TA que a TA, pudiera deberse a que las bacterias tuvieron mayor tiempo para adaptarse a esta condición y adherirse mostrando un desarrollo discreto (entre 0.7 y 1.0  $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ ), aunque finalmente permanecieron en la etapa de adhesión, sin llegar a la de colonización que implicaría la multiplicación de las bacterias. La razón por la cual se incluyó la condición de temperatura alternada (TA-R-TA) en los experimentos fue debida a que en las condiciones normales de operación de algunos rastros se asemejan a estas condiciones, es decir, durante el proceso de faenado las canales se encuentran a temperatura ambiente y luego son mantenidas en las cámaras de refrigeración durante 24 h (en los rastros donde se cuenta con cámaras de enfriamiento) y en ocasiones se mantienen un tiempo (de 30 minutos o más) a temperatura ambiente antes de ser transportadas en vehículos hacia los establecimientos de comercialización. No se encontraron diferencias entre las dos condiciones de almacenamiento en la adhesión de las bacterias a la carne ni en la cantidad de bacterias adheridas a los diferentes tejidos, sin embargo más del 50% de las bacterias inoculadas se adhirieron fuertemente a los tejidos (representado por los valores de SR), lo cual en una situación real, podría comprometer la inocuidad y calidad de la carne.

La composición superficial y topografía de los diferentes tejidos de la canal de bovino no parecieron influir en la adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I. Es importante observar que salvo algunas excepciones las dos bacterias tuvieron un comportamiento similar en los diferentes tejidos y en particular el comportamiento del grupo de cepas de E. coli fue similar al del grupo de cepas de Salmonella. De acuerdo con los resultados de estos experimentos, el grupo de cepas de E. coli biotipo I tendrían potencial para ser utilizadas como sustitutos de Salmonella en estudios de adhesión y para la validación de tratamientos de descontaminación.

## **8.5 Capacidad de agentes surfactantes para remover Salmonella y E. coli biotipo I adheridas a la superficie de canales de bovino.**

### **8.5.1 Diferencias entre la cantidad de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con agentes surfactantes**

El músculo fue el tejido con mayor cantidad de bacterias adheridas, lo cual podría indicar que en los tratamientos con las soluciones de SDS y de Tween 20 al 2% durante 10 min pudo haber interacciones entre los constituyentes del tejido, por ejemplo las proteínas (Gudiksen et al., 2006) y los detergentes interfiriendo en su acción al no permitir la exposición de las bacterias adheridas en a la carne con los surfactantes (Byelashov et al., 2008), a diferencia de fascia y hueso en donde hubo menor cantidad de bacterias adheridas tanto de BDA como de BFA.

### **8.5.2 Diferencias entre los grupos de bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino tratados con surfactantes expresadas en log UFC/cm<sup>2</sup>**

Existen algunos reportes en donde los surfactantes fueron aplicados para la remoción de bacterias de la superficie de algunos alimentos. Resulta importante mencionar que en esos estudios no se realizó la diferenciación entre las bacterias débil y fuertemente adheridas ya que el objetivo era evaluar la capacidad de productos químicos en la reducción de las bacterias inoculadas de la superficie de los alimentos. Raiden et al (2003) aplicaron enjuagues con soluciones de Tween 80 y SDS al 0.1% a 22 y 40°C

sobre la superficie de lechuga, tomates y fresas inoculadas con *Salmonella* y *Shigella* spp., en donde se logró la remoción de 4 y 3 log UFC/ml de la superficie de fresas y lechuga respectivamente, excepto para *Salmonella* inoculada en fresas y enjuagada con SDS en donde se removieron 1.5 log UFC/cm<sup>2</sup> a 22°C y <1 log UFC/cm<sup>2</sup> a 40°C. Las respectivas reducciones para tomates fueron de 1 y 1.5 log UFC/cm<sup>2</sup>. Los investigadores concluyeron que los detergentes no fueron más efectivos que el agua para remover a los patógenos. En otro estudio Byelashov et al (2008) obtuvieron una reducción inicial de  $2.0 \pm 0.4$  log UFC/cm<sup>2</sup> de *L. monocytogenes* inoculada en salchichas después de asperjarlas con SDS al 0.5%, aunque ésta reducción fue semejante a la causada por asperjado con agua destilada o ácido láctico al 5%. Los investigadores explicaron que este efecto pudo ser debido al pH elevado de la solución aplicada (8.34) o a la complejidad de interacciones con compuestos orgánicos. Por otra parte, cuando el SDS se aplicó solo (sin combinar con otros compuestos) para descontaminar la superficie de alas y piel de pollo inoculadas con *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, el compuesto tuvo limitada actividad antimicrobiana a concentraciones desde el 0.05 hasta el 0.5% y pH de 6.0, (Zhao et al., 2009).

Como se mencionó al inicio del párrafo anterior, en el presente estudio se realizó el recuento de BDA y BFA después de los tratamientos con surfactantes, por lo que resulta difícil comparar los resultados con los de los estudios referenciados anteriormente; sin embargo existe una concordancia entre dichos estudios y el actual, en ninguno de ellos los surfactantes resultaron ser mejores en la remoción de las bacterias que los tratamientos con agua destilada, o con la solución buffer utilizada en el presente estudio.

El SDS es un surfactantes ácido aniónico con propiedades antimicrobianas cuyo modo de acción involucra la lisis celular (Cornett, Shockman, 1978), desnaturalización de proteínas y enzimas, daño a la membrana celular y cambios en la permeabilidad. El SDS tiene mejor efecto antimicrobiano a pH entre 1.5 y 3.0 (Cords et al., 2005). Esta podría ser la principal razón por la cual las soluciones de SDS no tuvieron efecto en la

viabilidad de las bacterias del presente estudio, ya que el pH de las soluciones de SDS estuvo entre 6.16 y 7.78.

### **8.5.3 Diferencias entre la fuerza de adhesión (SR) de las bacterias adheridas a los tejidos de la canal de bovino en los experimentos con y sin tratamiento con surfactantes**

No se encontraron diferencias en los niveles de adhesión bacteriana entre los tejidos estudiados (determinada por las diferencias en la fuerza de adhesión SR de las bacterias adheridas), sin embargo después de los tratamientos con SDS y Tween 20 si pudieron detectarse diferencias. Esto podría indicar que los detergentes tuvieron algún efecto sobre la superficie de éstos tejidos favoreciendo de alguna forma la remoción de las bacterias, sin tener un efecto en particular sobre las bacterias.

En la mayoría de los estudios reportados en la literatura que tienen como objeto eliminar a las bacterias de la superficie de los alimentos se han utilizados los surfactantes en combinación con otros compuestos en particular con ácidos orgánicos logrando tener un mejor efecto antimicrobiano al aplicarlos sobre la superficie de alimentos contaminados con bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. Cuando el SDS se aplicó en forma individual para descontaminar la superficie de alas y piel de pollo inoculadas con Salmonella y E. coli O157:H7 tuvo actividad antimicrobiana limitada, pero cuando el SDS al 2% se combinó con ácido levulínico al 3% por 1 min, se incrementó su actividad antimicrobiana hasta más de 5 log UFC/g (Zhao et al., 2009). Los mismos investigadores obtuvieron reducciones mayores a 4 log UFC/cm<sup>2</sup> de S. Enteritidis después de tratar canales de pollo con plumas con una mezcla de ácido levulínico al 3% y SDS al 2% (Zhao et al., 2011). En otro estudio realizado en salchichas inoculadas con L. monocytogenes (4.8 ± 0.1 log UFC/cm<sup>2</sup>), empacadas al vacío y almacenadas a 4°C por 90 días, se obtuvieron reducciones significativas después de asperjar con una mezcla de ácido láctico (0.5% v/v) y SDS (0.5% w/v) antes y después de la inoculación logrando reducciones de 1.8 ± 0.4 y 2.8 ± 0.2 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente (Byelashov et al., 2008).

Por otra parte, la adición de Tween 80 al 5% a las soluciones empleadas para lavar piel de pollo con fosfato trisódico (TSP) al 1%, ácido láctico al 1% y NaOH al 0.05% ayudó a mejorar su efectividad para reducir el número de células viables de *Salmonella* spp., pero no de *L. monocytogenes* (Cheng-An and Beuchat, 1994). Calicioglu et al (Calicioglu et al., 2002), obtuvieron reducciones significativas de *E. coli* O157:H7 (4 a 5 log UFC/cm<sup>2</sup>) inoculada en cuartos de canal y cortes sub-primarios cubiertos de grasa utilizando estiércol de bovino como vehículo de inoculación y almacenados de 1 a 3 días a 4°C. Después de realizar un pre-asperjado con Tween 20 al 5% seguido de asperjado con ácido láctico al 2% se incrementó la efectividad de éste último con reducciones de 2.8 y 3.2 log UFC/cm<sup>2</sup> comparado con el control (asperjado con agua) con reducciones de 1.0 y 2.0 log UFC/cm<sup>2</sup>. La adición de lauril sulfato de sodio (125 ppm) a la solución de ácido láctico (0.5 y 1%) al tanque de enfriamiento incrementó la actividad contra las células fuertemente adheridas de 0.16 (control) a 1.29 log UFC/cm<sup>2</sup> en piel de pechuga de pollo (Tamblyn and Conner, 1997) .

En esta etapa del estudio el grupo de cepas de *E. coli* biotipo I también tuvo un comportamiento similar al del grupo de cepas de *Salmonella* ante los tratamientos con SDS y Tween 20. Es posible utilizar a este grupo de bacterias para comparar la eficiencia de tratamientos para remover y reducir a *Salmonella* de la superficie de la canal de bovino.

## 9. CONCLUSIONES

Salmonella estuvo presente en el 15.4% de canales de las canales de bovino muestreadas en los rastros municipales de Jalisco. Los serotipos más prevalentes fueron S. enterica Give (24.4%), S. Typhimurium (17.7%) y S. Grupo B (14.1%).

El mayor porcentaje de aislamientos fueron resistentes a la tetraciclina (46.2%), a estreptomycin (42.3%) y a cloranfenicol (23.1%). La resistencia antimicrobiana fue más común en S. Typhimurium, donde el 93% de los aislamientos fueron resistentes al menos a cinco antimicrobianos.

E. coli estuvo presente en el 96% de las canales, demostrando la falta de control del proceso en los rastros municipales para prevenir la contaminación fecal.

La composición superficial y topografía de los diferentes tejidos de la canal de bovino no influyen en la adhesión de Salmonella y E. coli biotipo I.

Bajo las condiciones del presente estudio los tratamientos con SDS y Tween 20 al 2% durante 10 minutos no tuvieron un efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en la remoción de Salmonella y E. coli biotipo I adheridas al músculo, fascia y hueso.

Las cuatro cepas de E. coli biotipo I mostraron propiedades de adhesión similares a Salmonella, por lo que pueden ser utilizadas como microorganismos sustitutos del patógeno en estudios de adhesión en superficies bajo condiciones de producción.

## LITERATURA CITADA

Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 66: 2001-2005.

Alcaine SD, Warnick LD, Wiedmann M. 2007. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella. *J Food Prot* 70: 780-790.

Andrews HW, Hasmmack TS. 2007. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 5. Salmonella (Internet). U. S. Food and Drug Administration, USA. Disponible en el sitio de red:  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>. (Revisado el 10 de octubre de 2008).

APUA. 2010. Situation analysis of antibiotic misuse in U.S. food animals: APUA background paper, APUA Newsletter, vol. 28. Alliance for the prudent use of antibiotics, USA. 1-6.

Arsenault J, Letellier A, Quessy S, Boulianne M. 2007. Prevalence and risk factors for Salmonella and Campylobacter spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *J Food Prot* 70: 1820-1828.

Arthur TM, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Kalchayanand N, King DA, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2008. Source tracking of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. *J Food Prot* 71: 1752-1760.

Arthur TM, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2007. Effects of a minimal hide wash cabinet on the levels and prevalence of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on the hides of beef cattle at slaughter. *J Food Prot* 70: 1076-1079.

Bacon RT, Sofos JN, Belk KE, Hyatt DR, Smith GC. 2002. Prevalence and antibiotic susceptibility of Salmonella isolated from beef animal hides and carcasses. *J Food Prot* 65: 284-290.

Bailey JS, Stern NJ, Fedorka-Cray P, Craven SE, Cox NA, Cosby DE, Ladely S, Musgrove MT. 2001. Sources and movement of Salmonella through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation. *J Food Prot* 64: 1690-1697.

Barham AR, Barham BL, Johnson AK, Allen DM, Blanton JR, Jr., Miller MF. 2002. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of Escherichia coli O157 and Salmonella spp. *J Food Prot* 65: 280-283.

Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancour M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. *J Food Prot* 66: 1978-1986.

Beach JC, Murano EA, Acuff GR. 2002. Serotyping and antibiotic resistance profiling of Salmonella in feedlot and nonfeedlot beef cattle. *J Food Prot* 65: 1694-1699.

Bell RG. 1997. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J Appl Microbiol* 82: 292-300.

Bello-Perez LA, Abarca-Mateos C. 1991. The incidence of Salmonella in the chorizos that are retailed in Acapulco, Guerrero. *Salud Pública Mex* 33: 178-183.

Bischoff KM, Edrington TS, Callaway TR, Genovese KJ, Nisbet DJ. 2004. Characterization of antimicrobial resistant Salmonella Kinshasa from dairy calves in Texas. *Lett Appl Microbiol* 38: 140-145.

Bosilevac JM, Arthur TM, Bono JL, Brichta-Harhay DM, Kalchayanand N, King DA, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2009. Prevalence and enumeration of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in U.S. abattoirs that process fewer than 1000 head of cattle per day. *J Food Prot* 72: 1272-1278.

Bouchrif B, Paglietti B, Murgia M, Piana A, Cohen N, Ennaji M M, Rubino S, M, T. 2008. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from food in Morocco. *J Infect Developing Countries* 3: 35-40.

Bouttier S, Linxe C, Ntsama C, Morgant G, Bellon-Fontaine MN, Fourniat J. 1997. Attachment of *Salmonella choleraesuis choleraesuis* to beef muscle and adipose tissues. *J Food Prot* 60: 16-22.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38: 2465-2467.

Brichta-Harhay DM, Guerini MN, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2008. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. *Appl Environ Microbiol* 74: 6289-6297.

Brinez WJ, Roig-Sagues AX, Hernandez Herrero MM, Guamis Lopez B. 2006. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *J Food Prot* 69: 86-92.

Busta FF, Suslow TV, Parish ME, Beuchat LR, Farber JN, Garrett EH, Harris LJ. 2003. The Use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. IFT/FDA 2: 179-185.

Byelashov OA, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Sofos JN. 2008. Control of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged frankfurters sprayed with lactic acid alone or in combination with sodium lauryl sulfate. *J Food Prot* 71: 728-734.

Cabedo L, Sofos JN, Schmidt GR, Smith GC. 1997. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 and other bacterial cells grown in two media to beef adipose and muscle tissues. *J Food Prot* 60: 102-106.

Cabrera-Diaz E, Moseley TM, Lucia LM, Dickson JS, Castillo A, Acuff GR. 2009. Fluorescent protein-marked *Escherichia coli* biotype I strains as surrogates for enteric pathogens in validation of beef carcass interventions. *J Food Prot* 72: 295-303.

Calicioglu M, Kaspar CW, Buege DR, Luchansky JB. 2002. Effectiveness of spraying with tween 20 and lactic acid in decontaminating inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous *Escherichia coli* biotype I on beef. *J Food Prot* 65: 26-32.

Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella. *J Anim Sci* 86: E163-172.

Campos-Bravo CA. 2001. Análisis de riesgos sanitarios y control de puntos críticos en el proceso de obtención de canales bovina y porcina, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Cancho Grande B, García Falcón M S, Simal Gándara J. 2000. El Uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3:1-39.

Carlson BA, Ruby J, Smith GC, Sofos JN, Bellinger GR, Warren-Serna W, Centrella B, Bowling RA, Belk KE. 2008. Comparison of antimicrobial efficacy of multiple beef hide decontamination strategies to reduce levels of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *J Food Prot* 71: 2223-2227.

Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff GR. 1998a. Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *J Food Prot* 61: 823-828.

Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff GR. 1998b. Use of hot water for beef carcass decontamination. *J Food Prot* 61: 19-25.

CDC-NARMS (CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria). 2006. 2003 Human isolates final report. U. S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

CDC-NARMS. 2012a. 2010 Retail Meat Report NARMS. Center for Veterinarian Medicine. Department of Health and Human Services (FDA).

CDC-NARMS. 2012b. National Antimicrobial Resistance Monitoring System For Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2010. U. S. Department of Health and Human Services. CDC, Atlanta, Georgia.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2000. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks — United States, 1993–1997. U.S. Department of Health & Human Services. Atlanta, GA. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49:1-72.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2004. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2003. U.S. Department of Health & Human Services. Atlanta, Georgia.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2006. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks — United States, 1998–2002. U.S. Department of Health & Human Services. Atlanta, Georgia. 55:1-10.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2008. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006. U.S. Department of Health & Human Services. Atlanta, Georgia.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2010. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, 2009. Morbidity and Mortality Weekly Report 59:1-36.

Cloete E, Molobela I, Van Der Merwe A, Richards M. 2009. Biofilms in the food and beverages industries: an introduction. In: Biofilm in the food and beverage industries. Fratamico P, Annous BA and Gunther IV NW (eds). CRC Press: Boca Raton, FL, pp 3-31.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test M2-A9.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute . 2008. Eighteenth Informational Supplement. Performance Standards for Susceptibility Testing; Eighteenth M100-S18.

Considine GD. 1999. Detergents. Surface Active Agents. In: Considine, GD, (Ed.), Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry. Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc.

Cords BR, Burnett SL, Hilgren J, Finley M, Magnuson AJ. 2005. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides. In: P. M. Davidson, JNS, and A. L. Branen, (Ed.), Antimicrobials in food, 3rd ed. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, EUA. 507-572.

Cornett JB, Shockman GD. 1978. Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with triton X-100. J Bacteriol 135, 153-160.

Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11: 217-221; discussion 237-219.

Cheng-An H and Beuchat LR. 1994. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J Food Prot* 58: 19-23.

Chia TW, Fegan N, McMeekin TA, Dykes GA. 2008. *Salmonella* Sofia differs from other poultry-associated *Salmonella* serovars with respect to cell surface hydrophobicity. *J Food Prot* 71: 2421-2428.

Chia TW, Goulter RM, McMeekin T, Dykes GA, Fegan N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol* 26: 853-859.

Chiu CH, Su LH, Chu C. 2004a. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 17: 311-322.

D'Aoust J-Y, Maurer J, Bailey JS. 2001. *Salmonella* Species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Ed.). *Food Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 872.

Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Koprak CA, Ferris KE, Headrick ML. 2003. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *J Appl Microbiol* 95: 753-761.

Davies RH, Dalziel R, Gibbens JC, Wilesmith JW, Ryan JM, Evans SJ, Byrne C, Paiba GA, Pascoe SJ, Teale CJ. 2004. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *J Appl Microbiol* 96: 750-760.

Dickson JS. 1991. Attachment of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* to beef tissue: effect of inoculum level, growth temperature and bacterial culture age. *Food Microbiology* 8: 143-151.

Dickson JS and Koohmaraie M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol* 55: 832-836.

Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 881-890.

Duggan SJ, Mannion C, Prendergast DM, Leonard N, Fanning S, Gonzales-Barron U, Egan J, Butler F, Duffy G. 2010. Tracking the Salmonella status of pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland. *J Food Prot* 73: 2148-2160.

EFSA-ECDC. 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA Journal* 2012 10: 1-233.

Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. 2000. Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2999-3003.

European Union. 2005. Reglamento (CE) no 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, vol. 1-26.

FDA. 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. A report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration (Internet). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100158.htm> (Revisado el 01 de agosto de 2012).

FDA. 2011. Part 178 Indirect Food Aditives: Adjuvants, production aids, and sanitizers, 21CFR178.3400. (Internet). U. S. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services, USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/cfrsearch.cfm?fr=178.3400SUBCHAPTER> (Revisado el 26 de agosto de 2012).

FDA. 2012. Part 172 Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Sodium lauryl sulfate. In: Services, USDoHaH, (Ed.), 21CFR172.822. (Internet). U. S. Food and Drug Administration. Disponible en el sitio de red: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.822> (Revisado el 01 de agosto de 2012).

Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. 2004. Quantification and prevalence of Salmonella in beef cattle presenting at slaughter. *J Appl Microbiol* 97: 892-898.

Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. 2005. A study of the prevalence and enumeration of Salmonella enterica in cattle and on carcasses during processing. *J Food Prot* 68: 1147-1153.

Fernández-Escartín E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Firstenberg-Eden R. 1981. Attachment of Bacteria to Meat Surfaces: A Review. *J Food Prot* 44: 602-607.

Flisser A, Velasco-Villa A, Martinez-Campos C, Gonzalez-Dominguez F, Briseno-Garcia B, Garcia-Suarez R, Caballero-Servin A, Hernandez-Monroy I, Garcia-Lozano H, Gutierrez-Cogco L, Rodriguez-Angeles G, Lopez-Martinez I, Galindo-Virgen S, Vazquez-Campuzano R, Balandrano-Campos S, Guzman-Bracho C, Olivo-Diaz A, de la Rosa J, Magos, C, Escobar-Gutierrez A, Correa D. 2002. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res* 33: 343-350.

Fluckey WM, Loneragan WG, Warner R, Brashears MM. 2007. Antimicrobial drug resistance of Salmonella and Escherichia coli isolates from cattle feces, hides, and carcasses. *J Food Prot* 70: 551-556.

Forsythe SJ and Hayes PR. 2002. Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 359-380.

Funk JA, Davies PR, Nichols MA. 2001. Longitudinal study of Salmonella enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet Microbiol* 83: 45-60.

Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Daube G. 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *J Food Prot* 71: 35-45.

Ghafir Y, China B, Korsak N, Dierick K, Collard JM, Godard C, De Zutter L, Daube G. 2005. Belgian surveillance plans to assess changes in Salmonella prevalence in meat at different production stages. *J Food Prot* 68: 2269-2277.

Giaouris E, Chorianopoulos N, Nychas GJ. 2005. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J Food Prot* 68: 2149-2154.

Giaouris ED, Nychas GJ. 2006. The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiol* 23: 747-752.

Gill CO. 2004. Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. *J Food Prot* 67: 413-419.

Goulter RM, Gentle IR, Dykes GA. 2010. Characterisation of curli production, cell surface hydrophobicity, autoaggregation and attachment behaviour of *Escherichia coli* O157. *Curr Microbiol* 61: 157-162.

Gudiksen KL, Glitin I, and Whitesides GM. 2006. Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS. *Proceedings of Natinal Academy of Sciencea of the USA*. 103: 7968-7972.

Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennish ML, Pickering LK. 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 32: 331-351.

Gurtler JB, Rivera RB, Zhang HQ, Geveke DJ. 2010. Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *Int J Food Microbiol* 139: 1-8.

Gutierrez-Cogco L, Montiel-Vazquez E, Aguilera-Perez P, Gonzalez-Andrade MC. 2000. *Salmonella* serotypes identified in Mexican health services. *Salud Publica Mex* 42: 490-495.

Hassan AN and Frank JF. 2004. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *Int J Food Microbiol* 96: 103-109.

Hernández-San Juan JS, Zúñiga-Estrada A, Sánchez-Ortega I, Castro-Rosas J, Román-Gutiérrez AD, Santos-López EM. 2007. Microbiological conditions during the

slaughter process at a municipal slaughterhouse in Hidalgo, Mexico. *Vet. México* 38: 187-195.

Heuvelink AE, Roessink GL, Bosboom K, de Boer E. 2001. Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *Int J Food Microbiol* 66: 13-20.

Hughes D, Dailianis AE, Hill L, Curiale MS, Gangar V. 2003. Salmonella in foods: new enrichment procedure for TECRA Salmonella Visual Immunoassay using a single rv(R10) only, TT only, or dual rv(R10) and TT selective enrichment broths (AOAC official method 998.09): collaborative study. *J AOAC Int* 86: 775-790.

Hur J, Jawale C, Lee JH. 2012. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45: 819-830.

Hurd HS, McKean JD, Griffith RD, Rostagno MH. 2004. Estimation of the Salmonella enterica prevalence in finishing swine. *Epidemiol Infect* 132: 127-135.

ICMSF. 2002. *Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Mangement* Springen, New York, USA.

IFT. 2006. Antimicrobial Resistance: Implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5: 71-137.

Ingham SC, Algino RJ, Ingham BH, Schell RF. 2010. Identification of Escherichia coli O157:H7 surrogate organisms to evaluate beef carcass intervention treatment efficacy. *J Food Prot* 73: 1864-1874.

Institute of Medicin. 1998. Antimicrobial resistance: issues and options. *Forum on Emerging Infections*. Harrison PF and Lederberg J (Ed.).

Jain S and Chen J. 2007. Attachment and biofilm formation by various serotypes of Salmonella as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *J Food Prot* 70: 2473-2479.

Jeong S, Marks BP, Ryser ET. 2011. Quantifying the performance of *Pediococcus* sp. (NRRL B-2354: *Enterococcus faecium*) as a nonpathogenic surrogate for Salmonella Enteritidis PT30 during moist-air convection heating of almonds. *J Food Prot* 74: 603-609.

Jimenez M, Martínez-Urtaza J, Chaidez C. 2010. Geographical and temporal dissemination of Salmonellae isolated from domestic animal hosts in the Culiacan valley, Mexico. *Microb Ecol* 61: 811-820.

Kaspar CW and Tamplin ML. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol* 59: 2425-2429.

Keeling C, Niebuhr SE, Acuff GR, Dickson, JS. 2009. Evaluation of *Escherichia coli* biotype 1 as a surrogate for *Escherichia coli* O157:H7 for cooking, fermentation, freezing, and refrigerated storage in meat processes. *J Food Prot* 72: 728-732.

Kim JK and Harrison MA. 2009. Surrogate selection for *Escherichia coli* O157:H7 based on cryotolerance and attachment to romaine lettuce. *J Food Prot* 72: 1385-1391.

Kim SH, and Wei CI. 2007. Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. *J Food Prot* 70: 22-29.

Larkin C, Poppe C, McNab B, McEwen B, Mahdi A, Odumeru J. 2004. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *J Food Prot* 67: 448-455.

Liu Y, Yang SF, Li Y, Xu H, Qin L, JH, T. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol* 10: 251-256.

Liu Y, Yang SF, Qin L, Tay JH. 2004. A thermodynamic interpretation of cell hydrophobicity in aerobic granulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 410-415.

Ma L, Kornacki JL, Zhang G, Lin CM, Doyle MP. 2007. Development of thermal surrogate microorganisms in ground beef for in-plant critical control point validation studies. *J Food Prot* 70: 952-957.

Madden RH, Murray KA, Gilmour A. 2007. Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in northern Ireland at time of slaughter. *Lett Appl Microbiol* 44: 115-119.

Marshall KM, Niebuhr SE, Acuff GR, Lucia LM, Dickson JS. 2005. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 meat processing indicators for fresh meat through

comparison of the effects of selected antimicrobial interventions. *J Food Prot* 68: 2580-2586.

Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* 4: 115-133.

McEldowney S and Fletcher M. 1986. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl Environ Microbiol* 52: 460-465.

McEvoy JM, Doherty AM, Finnerty M, Sheridan JJ, McGuire L, Blair IS, McDowell DA, Harrington D. 2000. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Lett Appl Microbiol* 30: 390-395.

McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. 2003. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J Appl Microbiol* 94: 693-700.

McEvoy JM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. 2004. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC. *Int J Food Microbiol* 92: 217-225.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging and Infectious Diseases* 5: 607-625.

Medina MB. 2001. Binding of collagen I to *Escherichia coli* O157:H7 and inhibition by carrageenans. *Int J Food Microbiol* 69: 199-208.

Medina MB. 2004. Binding interaction studies of the immobilized *Salmonella* Typhimurium with extracellular matrix and muscle proteins, and polysaccharides. *Int J Food Microbiol* 93: 63-72.

Meyer C, Thiel S, Ullrich U, Stolle A. 2010. *Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef. *J Food Prot* 73: 1780-1784.

- Miranda JM, Mondragon AC, Martinez B, Guarddon M, Rodriguez JA. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* 72: 966-971.
- Moe KK, Mimura J, Ohnishi T, Wake T, Yamazaki W, Nakai M, Misawa N. 2009. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J Vet Med Sci* 72: 411-416.
- Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, Ebbesen JM, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smidt P, Petersen AM, Wegener HC. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N Engl J Med* 341: 1420-1425.
- Nesbitt WE, Doyle RJ, Taylor KG. 1982. Hydrophobic interactions and the adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Infect Immun* 38: 637-644.
- Nguyen VT, Turner MS, Dykes GA. 2011. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiol* 28: 942-950.
- Niebuhr SE, Laury A, Acuff GR, Dickson JS. 2008. Evaluation of nonpathogenic surrogate bacteria as process validation indicators for *Salmonella enterica* for selected antimicrobial treatments, cold storage, and fermentation in meat. *J Food Prot* 71: 714-718.
- Oliveira CJ, Carvalho LF, Fernandes SA, TavechioAT, Domingues FJ, Jr. 2005. Prevalence of pigs infected by *Salmonella* Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. *Int J Food Microbiol* 105: 267-271.
- Palmer J, Flint S, Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 34: 577-588.
- Pawar DM, Rossman ML, Chen J. 2005. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* 99: 418-425.
- Payment P and Franco E. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 59: 2418-2424.

Phillips D, Jordan D, Morris S, Jenson I, Sumner J. 2006. A national survey of the microbiological quality of beef carcasses and frozen boneless beef in Australia. *J Food Prot* 69: 1113-1117.

Phillips D, Sumner J, Alexander JF, Dutton KM. 2001. Microbiological quality of Australian beef. *J Food Prot* 64: 692-696.

Poulsen LV. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Food Sci. Technol.-Leb* 32: 321-326.

Rahkio M and Korkeala H. 1996. Microbiological contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughtering lines. *Acta Vet Scand* 37: 219-228.

Raiden RM, Sumner SS, Eifert JD, Pierson MD. 2003. Efficacy of detergents in removing *Salmonella* and *Shigella* spp. from the surface of fresh produce. *J Food Prot* 66: 2210-2215.

Restaino. 1994. Antimicrobial Efficacy of a New Organic Acid Anionic Surfactant Against Various Bacterial Strains. *J Food Prot* 57: 496-501.

Rivas L, Dykes GA, Fegan N. 2006. Attachment of shiga toxigenic *Escherichia coli* to beef muscle and adipose tissue. *J Food Prot* 69: 999-1006.

Rivas L, Dykes GA, Fegan N. 2007a. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *J Microbiol Methods* 69: 44-51.

Rivas L, Fegan N, Dykes GA. 2005. Physicochemical properties of Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 99: 716-727.

Rivas L, Fegan N, Dykes GA. 2007b. Attachment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 115: 89-94.

Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, Reagan JO, Koohmaraie M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J Food Prot* 67: 295-302.

Rodriguez-Buenfil JC, Alvarez-Fleites M, Segura-Correa JC. 2006. Incidence of salmonellosis and identification of serogroups and serotypes in a pig commercial farm in Yucatan. *Rev Latinoam Microbiol* 48: 10-13.

Rosen MJ. 2004. Characteristics features of surfactants. In: Rose, MJ, (Ed.), *Surfactants and Intefacial Phenomena*. (Internet). 3rd ed. ed. Wiley-Interscience, USA. Disponible en el sitio de red: <http://site.ebrary.com/id/10114133?ppg=6> (Revisado el 31 de julio de 2012).

Ruby JR, Zhu J, Ingham SC. 2007. Using indicator bacteria and Salmonella test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for Salmonella. *J Food Prot* 70: 2732-2740.

Ryu JH and Beuchat LR. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71: 247-254.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganaderías, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2010. El mercado internacional. (Internet). Dirección General de Operaciones Financieras. Dirección de Estudios y Análisis de Mercados. Info ASERCA., México, D.F. Disponible en el sitio de red: <http://www.aserca.gob.mx/sicsa/fichas/ficha32-GanadoBovino201009.pdf> (Revisado el 26 de julio de 2012).

Salager JS y Fernandez A. 2004. *Surfactantes Generalidades y Materias Primas*. Cuaderno FIRP S-301 PP. Universidad de los Andes. Escuela de Ingeniería Química. Laboratorio FIRP (Ed.). Mérida, Venezuela 1: 1-22.

Sawyer JE, Greiner ST, Acuff GR, Lucia LM, Cabrera-Diaz E, Hale, DS. 2008. Effect of xylitol on adhesion of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 to beef carcass surfaces. *J Food Prot* 71: 405-410.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7-15.

Secretaría de Salud. 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles

de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud, México.

Secretaría de Salud. 2010. Anuario Estadístico. (Internet). Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Secretaría de Salud de México, México. Disponible en el sitio de red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (revisado el 03 de mayo de 2012).

SIAP. 2010. Población Ganadera. (Internet). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., México, D.F. Disponible en el sitio de red: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=21&Itemid=330](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330) (revisado el 03 de mayo de 2012).

Siemon CE, Bahnson PB, Gebreyes WA. 2007. Comparative investigation of prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella between pasture and conventionally reared poultry. *Avian Dis* 51: 112-117.

Small A, James C, James S, Davies R, Liebana E, Howell M, Hutchison M, Buncic S. 2006. Presence of Salmonella in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. *J Food Prot* 69: 2342-2351.

Sofos JN, Kochevar SL, Bellinger GR, Buege DR, Hancock DD, Ingham SC, Morgan JB, Reagan JO, Smith GC. 1999a. Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *J Food Prot* 62: 140-145.

Sofos JN, Kochevar SL, Reagan JO, Smith GC. 1999b. Incidence of Salmonella on beef carcasses relating to the U.S. meat and poultry inspection regulations. *J Food Prot* 62: 467-473.

Sofos JN and Smith GC. 1998. Nonacid meat decontamination technologies: model studies and commercial applications. *Int J Food Microbiol* 44: 171-188.

Solomon EB, Niemira BA, Sapers GM, Annous BA. 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by Salmonella originating from produce, animal, and clinical sources. *J Food Prot* 68: 906-912.

SPSS Inc. 2008. Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics 17.0.1 for Windows.

Stanley NR and Lazazzera BA. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology* 52: 917-924.

Stepanovic S, Djukic N, Djordjevic V, Djukic S. 2003. Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by Staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 9: 955-958.

Stephens TP, Loneragan GH, Thompson TW, Sridhara A, Branham LA, Pitchiah S, Brashears MM. 2007. Distribution of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella* on hide surfaces, the oral cavity, and in feces of feedlot cattle. *J Food Prot* 70: 1346-1349.

Stevens A, Kabore Y, Perrier-Gros-Claude JD, Millemann Y, Brisabois A, Catteau M, Cavin JF, Dufour B. 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *Int J Food Microbiol* 110: 178-186.

Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Angulo FJ. 2007. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 195-197.

Sweet SP, MacFarlane TW, Lakshman P. S. 1987. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiology Letters* 48: 159-163

Takeuchi K and Frank JF. 2001. Direct microscopic observation of lettuce leaf decontamination with a prototype fruit and vegetable washing solution and 1% NaCl-NaHCO<sub>3</sub>. *J Food Prot* 64: 1235-1239.

Talavera-Rojas M, Vazquez-Chagoyan JC, Flores-Bello R, Robles-Gonzalez F, Lagunas-Bernabe S, Alonso-Fresan MU. 2007. GyrA gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *Vet Rec* 160: 630-632.

Tamblyn KC and Conner DE. 1997. Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella Typhimurium* attached to broiler skin. *Food Microbiol* 14: 477-484.

Tree JA, Adams MR, Lees, DN. 2005. Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for Norovirus) in wastewaters. *J Appl Microbiol* 98: 155-162.

Ukuku DO and Fett WF. 2002. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. *J Food Prot* 65: 1093-1099.

USDA-FSIS. 2012. FSIS Directive. (Internet). Food Service and Inspection Service. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C. 7120.1 Revision 12: 1-53. Disponible en el sitio de red: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1.pdf> (revisado el 26 de agosto de 2012).

USDA. 1994. Nationwide Beef Microbiological Baseline Data Collection Program: Steers and Heifers. (Internet). Food Safety and Inspection Service (FSIS). US Department of Agriculture. disponible en el sitio de red: <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/steer1.pdf> (revisado el 05 de mayo de 2009).

USDA. 1996. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Food Safety and Inspection Service, (Ed.). Washington D.C. 9 CFR, Part 304.

USDA. 1999. Nationwide Sponge Microbiological Baseline Data Collection Program Cattle. 1997-1998. (Internet). Food Safety and Inspection Service (FSIS). 15. Disponible en el sitio de red: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/Baseline\\_Data\\_Cattle.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Baseline_Data_Cattle.pdf) (revisado el 05 de mayo de 2009).

USDA. 2007. Antimicrobial resistance issues in animal agriculture. (Internet). Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services (VS). Centers for Epidemiology and Animal Health (CEAH), Center for Emerging Issues (CEI). U. S. Department of Agriculture. Disponible en el sitio de red: [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/emergingissues/downloads/antiresist2007update.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/antiresist2007update.pdf) (revisado el 02 de abril de 2011).

USDA. 2008. Isolation and Identification of Salmonella From Meat, Poultry and Eggs Products. (Internet). Food Safety and Inspection Service, (Ed.), vol. MLG 4.04. Laboratory QA/QC Division. U. S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Athens, GA. Disponible en el el sitio de red: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG\\_4\\_04.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_04.pdf) (revisado el 12 de octubre de 2008).

USDA. 2010. Progress Report on Salmonella Testing of Raw Meat and Poultry Products, 1998-2009. In: Food Safety and Inspection Service. (Internet). U. S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington D.C. Disponible en el sitio de red: [http://www.fsis.usda.gov/Fact\\_Sheets/Salmonella/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Salmonella/index.asp) (revisado el 08 de julio de 2011).

USDA. 2011a. Progress Report on Salmonella and Campylobacter Testing of Raw Meat and Poultry Products, 1998-2010. (Internet). Food Safety and Inspection Service. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C. Disponible en el sitio de red: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/Progress\\_Report\\_Salmonella\\_Testing\\_1998-2011.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Progress_Report_Salmonella_Testing_1998-2011.pdf) (revisado el 25 de agosto de 2012).

USDA. 2011b. Serotypes Profile of Salmonella Isolates from Meat and Poultry Products, January 1998 through December 2009. (Internet). Food Safety Inspection Service. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. 114. Disponible en el sitio de red: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/Serotypes\\_Profile\\_Salmonella\\_2009.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Serotypes_Profile_Salmonella_2009.pdf) (revisado el 03 de marzo de 2011).

Van Donkersgoed J, Bohaychuk V, Besser T, Song XM, Wagner B, Hancock D, Renter D, Dargatz D. 2009. Occurrence of foodborne bacteria in Alberta feedlots. *Can Vet J* 50: 166-172.

van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, van Pelt W. 2002. Serotype and phage type distribution of Salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 40: 3980-3985.

van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53: 1898-1901.

Vieira-Pinto M, Tenreiro R, Martins C. 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of Salmonella sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 110: 77-84.

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14: 2535-2554.

Warriner K, Eveleigh K, Goodman J, Betts G, Gonzales M, Waites WM. 2001. Attachment of bacteria to beef from steam-pasteurized carcasses. *J Food Prot* 64: 493-497.

Whichard JM, Medalla F, Hoekstra RM, McDermott PF, Joyce K, Chiller T, Barrett TJ, White DG. 2010. Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States. *J Food Prot* 73: 445-451.

WHO (World Health Organization). 1997. The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. (Internet). Berlin, Germany. WHO/EMC/ZOO/97.4. Disponible en el sitio de red: <http://www.who.int/emc> (revisado el 31 de mayo de 2010).

WHO (World Health Organization). 2001. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. (Internet). Geneva. Disponible en el sitio de red: [http://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy.htm/en/](http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy.htm/en/) (revisado el 06 de septiembre de 2009).

WHO (World Health Organization). 2002. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. Fact Sheet No. 268. (Internet). Disponible en el sitio de red: <https://apps.who.int/inf-fs/en/fact268.html> (revisado el 10 de abril de 2011).

WHO (World Health Organization). 2008. Antimicrobial Resistance from Food Animals. INFOSAN Information Note No. 2/2008. (Internet). Antimicrobial Resistance. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN). Disponible en el sitio de red: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_02\\_Antimicrobial\\_Mar08\\_EN.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_Antimicrobial_Mar08_EN.pdf) (revisado el 19 de julio de 2010).

Young KD. 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 660-703.

Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez, E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis* 14: 429-435.

Zaidi MB, McDermott PF, Fedorka-Cray P, Leon, V, Canche C, Hubert SK, Abbott J, Leon M, Zhao S, Headrick M, Tollefson L. 2006. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis* 42: 21-28.

Zhao T, Zhao P, Cannon JL, Doyle MP. 2011. Inactivation of Salmonella in biofilms and on chicken cages and preharvest poultry by levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. *J Food Prot* 74: 2024-2030.

Zhao T, Zhao P, Doyle MP. 2009. Inactivation of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on lettuce and poultry skin by combinations of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. *J Food Prot* 72: 928-936.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

M. C. Julia Aurora Pérez Montaña

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

### **PRESENCIA DE *Salmonella* EN CANALES DE BOVINO, ANÁLISIS DE SUS PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y DE SUS PROPIEDADES DE ADHESIÓN EN COMPARACIÓN CON LAS DE MICROORGANISMOS SUSTITUTOS**

Campo de estudio: Microbiología e inocuidad de alimentos

#### **Biografía:**

Datos personales: Nacida en Guadalajara, Jalisco el 17 de marzo de 1962, hija de Manuel de Jesús Pérez Suárez y Aurora Montaña Lomelí.

#### **Educación:**

Egresada de la Universidad de Guadalajara, grado obtenido Químico Farmacobiólogo (1984).

Especialidad en Microbiología Sanitaria (1985).

Maestría en Ciencias de los Alimentos (1997).

#### **Experiencia Profesional:**

Montes y Cía. S.A. de C.V. (1985-1986).

Secretaría de Salud y Bienestar Social del Gobierno del Estado de Colima (1986-1988).

Personal docente de la Universidad de Guadalajara adscrito al Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías:

Técnico académico de tiempo completo (desde 1992 hasta 1999).

Profesor investigador asociado A-C de tiempo completo (desde 1999 a la fecha).

Responsable del Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Unidad de Vinculación con la Industria. CUCEI (desde enero de 1992 hasta septiembre de 2008).