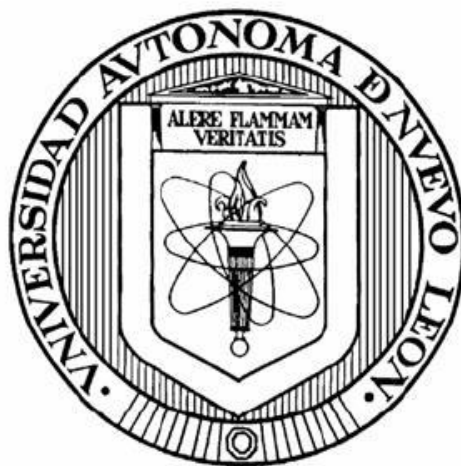


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DE SUSCEPTIBILIDAD A
ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* Y *Enterococcus* SPP. AISLADAS
EN EL PROCESO DE UN RASTRO PARA BOVINOS**

POR

JOSÉ VÁZQUEZ VILLANUEVA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DE SUSCEPTIBILIDAD A
ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* Y *Enterococcus* SPP. AISLADAS EN EL
PROCESO DE UN RASTRO PARA BOVINOS**

Aprobación de tesis por el comité particular de

JOSÉ VÁZQUEZ VILLANUEVA

Comité de Tesis

Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros
Presidente

Dr. Virgilio Bocanegra García
Secretario

Dr. Alfredo Wong González
Vocal

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Vocal

Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS
DE *Escherichia coli* Y *Enterococcus* SPP. AISLADAS EN EL PROCESO DE UN RASTRO
PARA BOVINOS**

Aprobación de tesis por el comité particular de

José Vázquez Villanueva

Dirección de Tesis

Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros
Director

Dr. Virgilio Bocanegra García
Director Externo

Dr. Alfredo Wong González
Co-Director

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Co-Director

Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del comité de tesis: Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros, Dr. Virgilio Bocanegra García, Dr. Alfredo Wong González, Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño y Dr. Gildardo Rivera Sánchez, por todo el apoyo otorgado y las facilidades que me permitieron para que este proyecto doctoral se hiciera realidad.

Al Programa de Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, por las estancias de entrenamiento recibidas y por el apoyo para llevar a cabo parte de los experimentos de este estudio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por permitirme continuar con el posgrado y por el apoyo para desarrollar parte del presente trabajo.

A Claudia Monserrat Cárdenas Carreón, por todo el apoyo en la realización de los muestreos y proceso bacteriológico. Por todas las horas que compartimos en el laboratorio.

Al Dr. Hugo Bernal Barragán, por las tutorías y charlas de apoyo para seguir con el proyecto, mi admiración para usted doctor.

A Reyna Rodríguez Ibarra, por apoyarme siempre en todo el proceso administrativo del programa y por tomarme las llamadas telefónicas en cualquier momento, aún y cuando sabía que era para darle lata.

A Diana, por su amor, entereza, espíritu y tolerancia; por ayudarme a ser mejor persona.

DEDICATORIA

A mi numerosa familia, mis padres: Enriqueta (+) y Mateo (+); hermanos: Lidia, Antonia, Juana, Jaime, Alicia, Sergio y Guadalupe; sobrinos y sobrinos-nietos, por su cariño, armonía, por ser y hacerme sentir siempre que somos una gran “tribu”

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. La inocuidad de los alimentos	3
2.2. Sistemas de sacrificio animal de bovinos en México	4
2.3. Condiciones microbiológicas de la carne de bovino	4
2.4. Resistencia antimicrobiana	4
2.5. Patógenos en estudio	5
2.5.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.5.2. <i>Enterococcus</i> spp.	6
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVOS	10
5.1. Objetivo general	10
5.2. Objetivo específico	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS	11
6.1. Muestreo	11
6.1.1. Heces	11
6.1.2. Canales de bovinos	11
6.1.3. Superficies de áreas de procesos	12
6.1.4. Agua	12
6.2. Determinaciones bacteriológicas	12
6.2.1. Conteo de mesófilos aerobios totales	12
6.2.2. Conteo de coliformes totales y coliformes fecales	13
6.2.3. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	13

6.2.4. Aislamiento e identificación de <i>Enterococcus</i> spp.	14
6.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	15
6.4. Detección de genes de resistencia	16
6.5. Detección de genes de virulencia	17
6.6. Clasificación en grupos filogenéticos	17
6.7. Análisis estadístico	18
7. RESULTADOS	19
7.1. Muestreo	19
7.2. Determinaciones bacteriológicas	19
7.2.1. Conteo de mesófilos aerobios totales	19
7.2.2. Conteo de coliformes totales y coliformes fecales	20
7.3. Prevalencia de <i>Escherichia coli</i>	21
7.4. Prevalencia de <i>Enterococcus</i> spp.	21
7.5. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	22
7.6. Detección de genes de resistencia	27
7.7. Detección de factores de virulencia	29
7.8. Clasificación en grupos filogenéticos	30
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES	37
10. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Agentes antimicrobianos utilizados para las pruebas de susceptibilidad en aislados de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	15
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en las reacciones PCR para la identificación de genes de resistencia en <i>E. coli</i>	16
Cuadro 3. Iniciadores para factores de virulencia de <i>E. coli</i>	17
Cuadro 4. Iniciadores para filogrupos de <i>E. coli</i>	18
Cuadro 5. Tipo de muestra, cantidad y frecuencia de toma de muestras	19
Cuadro 6. Prevalencia de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. en muestras de rastro	21
Cuadro 7. Especies de <i>Enterococcus</i> spp. en muestras de rastro	21
Cuadro 8. Porcentajes de multirresistencia en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de rastro	22
Cuadro 9. Perfiles de resistencia ante 16 antimicrobianos en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de rastro	23
Cuadro 10. Perfiles de sensibilidad de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de rastro, a 16 antibióticos	24
Cuadro 11. Patrones de resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>E. coli</i>	25
Cuadro 12. Perfiles de susceptibilidad a 16 antimicrobianos de cepas de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> aisladas de rastro	27
Cuadro 13. Prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de rastro en Tamaulipas	28
Cuadro 14. Prevalencia de factores de virulencia en cepas <i>E. coli</i> aisladas de rastro	30
Cuadro 15. Distribución de grupos filogenéticos en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de rastro	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección de genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> . Carril 1: control positivo de <i>tetB</i> , carril 2: control positivo de <i>tetA</i> , carril 4: control negativo, carril 6: marcador de 100 pb, carril 7-9: muestras positiva	28
Figura 2. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección del gen <i>strA</i> . Carril 1: control negativo, carril 2: control positivo de <i>strA</i> , carril 3: muestra positiva, carril 4-8: muestras negativas, carril 9: marcador de 100 pb	29
Figura 3. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección del gen <i>hlyA</i> . Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2: cepa positiva, carril 3-8: cepas negativas, carril 9: control positivo, carril 10: control negativo	30

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades)
CF	Coliformes Totales
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Coliformes Fecales
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECD	<i>Escherichia coli</i> diarreogénicas
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETA	Enfermedades Transmitidas por los Alimentos
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAO/RLC	Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación/Oficina Regional para América Latina y el Caribe
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
MAT	Mesófilos Aerobios Totales
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SRF	Solución Reguladora de Fosfatos
STEC	<i>Escherichia coli</i> shiga-toxigénica
TGH	Transferencia Genética Horizontal
TIF	Tipo Inspección Federal
TSA	Trypticase Soya Agar
UFC	Unidad Formadora de Colonias
WHO	World Health Organization

RESUMEN

A lo largo del proceso de producción cárnica, las prácticas inadecuadas durante la cría de ganado y/o su sacrificio, llegan a contaminar la carne y comprometer la salud del consumidor. Dentro de la industria alimentaria, *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. han sido ampliamente utilizados como “centinelas” o indicadores de falta de higiene. Si bien, la mayoría de sus cepas son comensales, existen algunas que han adquirido factores de virulencia específicos que les confiere la capacidad de infectar y producir enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos. Aunque la mayoría de las toxi-infecciones son autolimitantes, ocasionalmente el organismo humano elimina la enfermedad mediante el uso de antimicrobianos. Si los patógenos que las provocan han desarrollado mecanismos de resistencia, evadirán o inactivarán la acción de los fármacos, lo que trae como consecuencia mayor morbilidad y mortalidad, así como un incremento considerable en los gastos médicos. El objetivo de este estudio fue detectar en el proceso de un rastro para bovinos la prevalencia de *E. coli* y *Enterococcus* spp., caracterizar sus patrones de resistencia, factores de virulencia y distribución de grupos filogenéticos, para estimar el riesgo potencial que representan para la salud pública. El estudio se realizó en un matadero ubicado en el noreste de México, de enero a diciembre de 2017. Se analizaron un total de 336 muestras (agua=60, superficies=36, canales=120 y heces=120). Para las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos fueron utilizados 16 fármacos. *E. coli* estuvo presente en el 83.3% (280/336) de las muestras y *Enterococcus* spp. en un 75.5% (254/336). El 82.4% de los aislados de *E. coli* mostró resistencia para al menos un fármaco y el 41% presentó multiresistencia (de 3 a 8 fármacos). En las cepas de *Enterococcus* spp, ninguna fue resistente a más de 3 antibióticos. De los fármacos probados, tetraciclina fue el que tuvo mayor porcentaje de resistencia, lo cual concuerda con el gen de resistencia de mayor prevalencia (*tetA*), con una presencia del 23% en *E. coli* y 38.6% en *Enterococcus* spp. El gen de virulencia detectado con mayor frecuencia en *E. coli* fue *hlyA* con un 5.4%, seguido de *stx1* con 1.4% y *stx2* con 0.7%. En cuanto a la distribución de los grupos filogenéticos, las cepas se ubicaron principalmente como comensales (A y B1) en un 66.8%, por un 33.2% considerados patógenos (B2 y D). Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo en su tipo para Tamaulipas. La presencia de aislados con potencial patogénico y perfiles de resistencia y multiresistencia en muestras de agua, canales y superficies, pueden

ser una fuente importante de diseminación de cepas multi-resistentes y de representar un riesgo para el consumidor ante un manejo inadecuado de la carne y subproductos.

ABSTRACT

Improper practices during cattle raising and / or slaughter, contaminate the meat and ultimately compromise the health of the consumer throughout the meat production process. Within the food industry, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. have been widely used as “sentinels” or indicators of poor hygiene. Although, most of their strains are commensals, some have acquired specific virulence factors that enable them to infect and produce intestinal and extra intestinal diseases in humans. Although most of the toxi-infections are self-limiting, occasionally the human organism gets rid of the disease by means of the use of antimicrobials. If the causal pathogens have developed resistance mechanisms, they will evade or inactivate the action of the drugs, which results in greater morbidity and mortality, as well as a considerable increase in medical expenses. The aim of this study was to detect the prevalence of *E. coli* and *Enterococcus* spp during processing in a cattle slaughterhouse. In order to estimate the potential risk they represent for public health, isolates were tested for resistance patterns; virulence factors and distribution of phylogenetic groups. This study took place in a slaughterhouse located in northeastern Mexico, from January to December 2017. A total of 336 samples were analyzed (water = 60, surfaces = 36, carcasses = 120 and feces = 120). Antimicrobial susceptibility for 16 drugs was tested. *E. coli* was present in 83.3% (280/336) of the samples and *Enterococcus* spp. in 75.5% (254/336). Of the *E. coli* isolates, 82.4% showed resistance to at least one drug, while 41% presented multi-resistance (from three to eight drugs). None of *Enterococcus* spp was resistant to more than three antibiotics. Tetracycline resistance showed the highest percentage, which is consistent with the most prevalent resistance gene (*tetA*). Present in 23% *E. coli* and in 38.6% of *Enterococcus* spp. The virulence gene most frequent in *E. coli* was *hlyA* with 5.4%, followed by *stx1* with 1.4% and *stx2* with 0.7%. Regarding the phylogenetic groups distribution, the strains were mainly tagged as commensals (A and B1) 66.8%, versus 33.2% considered pathogens (B2 and D). As far as we know, this is the first study of its kind carried out in Tamaulipas. The presence of isolates with pathogenic potential resistance and multi resistance profiles in water samples, carcasses and surfaces, can be an important source of dissemination of multi-resistant strains and represent a risk for the consumer in the face of improper handling of meat and by-products.

1. INTRODUCCIÓN

La industria cárnica juega un importante rol en la economía del país, y su éxito radica en brindar al consumidor un alimento de calidad. Como parte de esta calidad, ofrecer un alimento inocuo se ha convertido en un reto para proveedores y distribuidores, ya que perder la confianza del consumidor puede ocasionar un impacto socioeconómico negativo (Kopper et al., 2009). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), reporta como los patógenos más frecuentes de alimentos a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (CDC, 2011). De estas, particularmente a *E. coli*, es un bacilo Gram negativo que forma parte del microbiota natural del tracto intestinal de los bovinos, llegando a contaminar la carne como consecuencia de prácticas inadecuadas durante su sacrificio, por contaminación cruzada o durante el proceso de elaboración de productos o subproductos cárnicos (Niyonzima et al., 2015; Sofos & Geornaras, 2010). Si bien, la mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, existen algunas que han adquirido factores de virulencia específicos que les confiere la capacidad de infectar y producir enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos. Las cepas que causan infecciones entéricas se denominan *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) y se clasifican en seis patotipos: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y *Escherichia coli* productor de shigatoxinas (STEC) (Canizalez et al., 2013). Estos patotipos presentan sus propias características y cuadros clínicos, que pueden ocasionar desde infecciones severas hasta la muerte del paciente. Se ha sugerido una relación entre filogenia y patogénesis, desarrollando una técnica de clasificación en 4 grupos filogenéticos principales de *E. coli* denominados: A1, B1, B2 y D (Clermont et al., 2000). En esta clasificación la mayoría de las cepas virulentas responsables de infecciones se asocian con los grupos B2 y D, mientras que las cepas comensales pertenecen generalmente a los filogrupos A y B1 (Duriez et al., 2001; Johnson et al., 2004; Clermont et al., 2000). Así también, se han encontrado vínculos entre virulencia y resistencia a antibióticos. Los genes de virulencia, por ejemplo, aquellos asociados con la producción de enterotoxinas o la quelación del hierro, que incrementan la capacidad de invasión en sus hospederos, y los genes de resistencia a antibióticos pueden estar presentes en los mismos elementos genéticos móviles, transfiriéndose y expresándose de forma conjunta (Doyle & Erickson, 2006). Si bien la mayoría de las

toxi-infecciones son autolimitantes, si los patógenos que las provocan han desarrollado mecanismos de resistencia, evadirán o inactivarán la acción de los fármacos, lo que trae como consecuencia mayor morbilidad y mortalidad, así como un incremento considerable en los gastos médicos (WHO, 2014; OMS, 2012; Newell et al., 2010; Kaye et al., 2004; White et al., 2002). Dentro de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana se ubica al uso inadecuado e irracional de los antimicrobianos, en medicina humana y veterinaria, donde es habitual la aplicación de tratamientos sintomáticos sin realizar ningún diagnóstico clínico, ni pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos (Lindsay, 2010). Así también, como la utilización de antibióticos en los piensos para la alimentación de animales destinados a consumo humano (Anderson, 2003). Estas dosificaciones profilácticas aumentan considerablemente la resistencia a antibióticos de las bacterias presentes en el tubo digestivo de los animales, las cuales son microbiota normal, pero que pueden eventualmente contaminar la canal durante el proceso de faenado o en el posterior manejo de la misma y contaminar los subproductos y luego ser consumidos por el hombre (Schroeder et al., 2003). Para evaluar la resistencia a antimicrobianos presente en bacterias del ganado y en sus productos para consumo humano, un buen modelo de estudio es un rastro. Ya que permite determinar la presencia de estas bacterias en el bovino antes de su sacrificio (conocer si adquirió estas bacterias resistentes durante su crianza), y de la canal destinada a consumo (evaluando si se contaminó con estas bacterias resistentes durante el proceso). Para esto, *E. coli* y *Enterococcus* han demostrado ser un efectivo modelo de estudio, siendo consideradas bacterias indicadoras de contaminación de alimentos, con potencial patogénico y elevada frecuencia de mutación que favorece el desarrollo espontáneo de resistencia antimicrobiana y capacidad para transferirla a otros microorganismos (Miranda et al., 2010). Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue detectar en un rastro bovino la prevalencia de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., caracterizando sus patrones de resistencia, factores de virulencia y distribución de grupos filogenéticos para con esos datos, estimar el potencial riesgo que representan para la salud pública. Sirviendo como base, para establecer medidas de buenas prácticas de manejo dentro de la producción de carne.

2. ANTECEDENTES

2.1. La inocuidad de los alimentos

La seguridad alimentaria requiere del cumplimiento de las siguientes condiciones: disponibilidad y estabilidad de alimentos sin fluctuaciones ni escasez en función de la estación del año, acceso o capacidad para adquirir los alimentos, y la buena calidad e inocuidad (FAO/RLC, 2010). Sin embargo, mantener esta inocuidad ha representado una tarea complicada, si bien se han logrado avances en su control, a veces llegan a presentarse brotes de toxi-infecciones alimentarias ligeras a severas. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (Hudson et al., 2017; Harbarth et al., 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que globalmente se reportan alrededor de 600 millones de casos de ETA por año, de los cuales 420 000 derivan en la muerte (WHO, 2014). Sin embargo, varios autores argumentan que la cifra puede ser mayor, debido a que las personas afectadas no acostumbran a llevar un adecuado seguimiento clínico o historial de hospitalización (O'Neill, 2016; Harbarth et al., 2015). Dentro de los principales microorganismos etiológicos responsables de producir ETA, se encuentran cepas de *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Shigella* spp, *E.coli* productoras de toxina Shiga (STEC) no-O157, STEC O157, *Vibrio* spp y *Listeria* spp (Nei et al., 2011). Los alimentos de origen animal, y principalmente la carne, pueden ser fácilmente contaminados debido a su alto contenido de nutrientes y humedad que favorecen el crecimiento acelerado de microorganismos. Aunado a esto, la carne está expuesta fácilmente a contaminación durante su proceso, al requerir de muchas etapas antes de llegar a las manos de los consumidores, y por las complejidades de las crianzas de los animales. La carne puede ser portadora de patógenos que, dependiendo de la concentración, la resistencia del individuo, y otros factores, pueden constituir riesgos para la salud (Karesh et al., 2012). En países en vías de desarrollo aumentan los riesgos de contraer ETA, debido al desconocimiento sobre el manejo adecuado de los alimentos, la falta de preparación del personal, las malas condiciones higiénicas y procesos productivos inapropiados, muchas veces informales en instalaciones precarias (Grujić et al., 2010).

2.2. Sistemas de sacrificio animal de bovinos en México

México cuenta con dos tipos de centros de sacrificio animal; uno municipal y otro de Tipo Inspección Federal (TIF), que pueden ser privados o del sector público. Los rastros TIF se encuentran bajo vigilancia federal para que éstos trabajen bajo condiciones sanitarias que garanticen la inocuidad de los productos obtenidos y faciliten la comercialización tanto en el mercado nacional como internacional (SENASICA, 2010). Los sistemas regulatorios que rigen al sistema municipal, y en consecuencia a las medidas sanitarias y de bienestar animal, son por completo diferentes de los del sistema TIF, cuentan con infraestructura básica de operación. En México, el 52% del ganado bovino se faena en rastros municipales y sólo el 48% en plantas TIF (Rubio et al., 2012).

2.3. Condiciones microbiológicas de la carne de bovino

La vigilancia microbiológica constante y el establecimiento de sistemas para preservar la inocuidad de los alimentos son de suma importancia en el bienestar de las personas que los consumen. Para vigilar las condiciones sanitarias en las etapas de sacrificio, faenado y manipulación de las canales, se emplea el conteo de Mesófilos Aerobios Totales (MAT) como un indicador de los cambios microbiológicos sufridos. Sin embargo, esta determinación no señala las posibles fuentes de contaminación bacteriana, por lo que la enumeración de ciertos grupos bacterianos, como Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF), además del aislamiento específico de patógenos que puedan transmitirse al humano podrían ayudar marcando las deficiencias sanitarias y su repercusión en la salud pública (Galland, 1997). Las prácticas inadecuadas en el proceso de sacrificio y faenado (desangrado, desollado, eviscerado y despiece de la canal) facilitan la contaminación debido al contacto de la carne con suciedad, material fecal, piel y polvo (Hernández-SanJuan et al., 2007).

2.4. Resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antimicrobiano en la práctica clínica, se detecta en el laboratorio cepas resistentes. De manera general se considera que los mecanismos de resistencia a antimicrobianos pre-existen o se modifican en la naturaleza, ya sea por

transferencia de genes de resistencia o por mutaciones; por lo anterior se puede suponer que los agentes antimicrobianos tendrán actividad por un tiempo limitado, y esto dependerá de la presión selectiva que este fármaco ejerza sobre la población bacteriana. La presión selectiva resulta de la administración de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento susceptible de ciertas bacterias, pero selecciona cepas resistentes, ya sea que dicha resistencia se haya adquirido de manera natural o adquirida sobre el fármaco en cuestión. Es importante considerar que la resistencia bacteriana se ha desarrollado a partir de mecanismos que originalmente tenían otras funciones metabólicas o de síntesis para el microorganismo y la presencia de más de un mecanismo de resistencia puede ser consecuencia de errores en la replicación, que se transmiten de una célula a otra (en la misma especie u otra especie). Este último proceso, conocido como de Transferencia Genética Horizontal (TGH), constituye un proceso único de evolución bacteriana que ha conducido a cambios significativos en la composición de los genomas microbianos en periodos relativamente cortos de tiempo. Los genes bacterianos se transfieren entre diversos microorganismos por plásmidos, bacteriófagos, transposones simples, transposones conjugativos, integrones, y por islas genómicas (Mira et al., 2010; Smillie et al, 2010; Lim et al, 2010).

2.5. Patógenos en estudio

2.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, móvil, perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*, que habita normalmente en el sistema digestivo de humanos y animales, formando parte del microbiota (Romero, 2007; Pascual & Calderón, 2000). Por ser un habitante normal del intestino, es un indicador desde hace tiempo de contaminación fecal en los alimentos. Aunque generalmente *E. coli* es inofensiva, algunas cepas son patógenas y producen cientos de miles de casos gastroentéricos en todo el mundo e incluso llegan a provocar muertes. La transmisión de *E. coli* se da principalmente por el consumo de alimentos contaminados, con mayor frecuencia en regiones de bajo desarrollo y mala higiene; las principales cepas adquiridas son la enterotoxigénica, enteroinvasiva y enteropatógena. El ganado bovino sano puede albergar a *E. coli* O157:H7 transitoriamente, sin síntomas patológicos

(Arthur et al., 2002) en la mucosa de la unión recto-anal que es el sitio principal de la colonización del tracto digestivo de la especie bovina, por lo cual la canal puede ser contaminada durante el proceso de faenado (Lim et al., 2010).

2.5.2. *Enterococcus* spp.

Las especies del género *Enterococcus* son bacterias Gram positivas, aerobias y anaerobias facultativas, inmóviles (excepto *E. gallinarum* y *E. avium*), y no producen esporas (Cowan & Steel's, 1993). Son reconocidas alrededor de 30 especies, de las cuales *E. faecalis* y *E. faecium* son las que se han detectado con mayor frecuencia en infecciones de humanos como endocarditis, bacteriemias, infecciones intra-abdominales y del tracto urinario (Fisher y Phillips, 2009; Jay et al., 2005). Los enterococos constituyen parte del microbiota intestinal de mamíferos; y como consecuencia de la contaminación fecal de éstos, se encuentran normalmente en el suelo, agua y plantas (Pasavento et al., 2014). También pueden estar presentes en vegetales, quesos y carne cruda, debido a la contaminación cruzada en las distintas fases de la cadena de producción, y estar presente en varios productos para consumo humano. *Enterococcus* en los últimos años ha emergido como uno de los géneros que incluye especies productoras de la mayoría de las infecciones nosocomiales (Franz et al., 1999). También ha sido reconocido como resistente a una amplia gama de antimicrobianos que son comúnmente utilizados en farmacoterapias en humanos, así como en el tratamiento de problemas clínicos en animales, como profilácticos y promotores de crecimiento (Jahan et al., 2013). Las especies patógenas de enterococos son reconocidas por su capacidad para intercambiar información genética mediante la conjugación (Clewell & Dunny, 2002) y su poder de diseminación de genes de resistencia a bacterias no patógenas (Fisher y Phillips, 2009; Cocconcelli et al., 2003). Con gran habilidad para transferir resistencia a antibióticos mediante plásmidos y transposones, intercambio cromosómico o mutaciones, lo que presenta un reto importante para la terapia (Coque, 2008).

Considerando lo anterior, asegurar la inocuidad de un alimento como la carne es indispensable para proteger la salud de los consumidores. Para lograr esto, es necesario realizar un monitoreo constante de los posibles patógenos presentes en el proceso de producción de la carne, desde el ganado destinado a consumo hasta el sacrificio del

mismo. Y así, en base a esta información establecer medidas o buenas prácticas de manejo que permitan mantener y mejorar la higiene de la carne.

3. JUSTIFICACIÓN

Las ETA generan preocupación de las instituciones de salud pública por al número de individuos afectados, principalmente niños y personas con un sistema inmune disminuido, ocasionando altos costos que implican su tratamiento y hospitalización. *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., son habitantes normales del microbiota intestinal de mamíferos, y son consideradas como bacterias indicadoras de contaminación de alimentos, de elevado potencial patogénico y frecuencia de mutación que favorece el desarrollo de resistencia antimicrobiana y capacidad para transferirla a otras bacterias. El ganado bovino es el principal reservorio de cepas patógenas de *E. coli*, las cuales pueden llegar a la canal como consecuencia de malas prácticas durante el proceso de sacrificio y faenado, o por contaminación cruzada.

La determinación de la prevalencia de *E. coli* y *Enterococcus* spp. y sus factores de virulencia, resistencia antimicrobiana y agrupación filogenética, en el proceso de sacrificio de un rastro para bovinos, ayudara a conocer el potencial patogénico que estos agentes representan para los consumidores de carne y subproductos.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. aisladas en el proceso de un rastro para bovino presentarán factores de virulencia, perfiles de multirresistencia y grupos filogenéticos comunes, que puedan estar correlacionados entre sí.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterización de patrones de resistencia a antimicrobianos, factores de virulencia y grupos filogenéticos de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. aisladas en el proceso de un rastro para bovinos.

5.2. Objetivos específicos

1. Estimar la prevalencia de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. aisladas en el proceso de sacrificio.
2. Identificar perfiles de resistencia fenotípica a antimicrobianos de aislados de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp.
3. Determinar factores de virulencia y resistencia en aislados de *Escherichia coli* y su prevalencia
4. Clasificar los aislados de *Escherichia coli* en grupos filogenéticos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestreo

Se realizó un estudio prospectivo y longitudinal en un rastro para bovinos, ubicado en el noreste de México. Los animales que son sacrificados en esta unidad provienen de distintos ranchos de esta zona. El muestreo se realizó durante doce meses (enero a diciembre de 2017), con toma de muestra quincenal de heces de bovino, superficies de canales de bovino y agua tratada. Así también, como muestras mensuales de superficies de áreas de proceso y agua (no tratada y residual). A continuación se describe cada una.

6.1.1. Heces

Fueron seleccionados al azar 5 animales en el corral del rastro para su sacrificio al día siguiente. Se utilizó un guante de palpación estéril, se obtuvo vía rectal aproximadamente 100 g de heces de cada bovino. Se retiró el guante con la muestra y se colocó en una bolsa de plástico estéril, se etiquetó y almacenó en hielo para su transporte al laboratorio. De cada bovino que se obtuvo muestra fecal se registró la clave de control.

6.1.2. Canales de bovino

La toma de muestras de canales y su manejo se realizó conforme a lo especificado en la NOM-109-SSA1-1994 y de acuerdo con el programa de reducción de patógenos para rastros TIF (SENASICA, 2010). Después del sacrificio de los bovinos, las canales permanecieron 12 horas en la cámara de refrigeración. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la toma de muestra de las superficies empleando esponjas estériles (Speci-Sponge®, Nasco Whirl-Pak) humedecidas con agua tamponada (Peptona 1%, NaCl 0.5%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35%, KH_2PO_4 0.15%). La toma de muestra consistió en tres sitios diferentes de la canal: falda, pecho y región perianal. Abarcando en total una superficie de 100 cm^2 en cada punto (300 cm^2 por canal). Cada esponja se colocó individualmente en una bolsa de plástico estéril, adicionando 25 mL

de agua tamponada. Cada bolsa con esponja fue etiquetada y almacenada en hielo para su transporte al laboratorio.

6.1.3. Superficies de áreas de proceso

Se utilizaron esponjas estériles con agua tamponada y se siguió un procedimiento similar al muestreo en canales. Se tomaron muestras de superficies de paredes, puertas del cuarto frío, y pisos del área de lavado de canales, abarcando una superficie de 300 cm² por zona de muestreo, considerando 3 puntos cercanos de 100 cm² cada uno. Cada esponja fue colocada individualmente en una bolsa de plástico estéril, etiquetada y almacenada en hielo para su transporte al laboratorio.

6.1.4. Agua

Se tomaron 3 tipos de muestras de agua: Agua sin tratamiento (cisterna), agua tratada (empelada para el lavado de canales) y agua residual (drenaje de degüelle y de lavado de vísceras). Para cada una, se utilizó un frasco de vidrio estéril de 250 mL, cada uno etiquetado y almacenado en hielo para su transporte al laboratorio.

6.2. Determinaciones bacteriológicas

6.2.1. Conteo de mesófilos aerobios totales

De las muestras de agua se tomó un mL y a partir de las muestras de canales y superficies, se tomó un mL de suspensión (esponja-agua peptonada tamponada) para realizar diluciones decimales (1 mL de la suspensión de la muestra en 9 mL de SRF) necesarias para la cuantificación bacteriana (NOM-110-SSA1-1994). El conteo en placa (metodología estándar) se realizó siguiendo los criterios descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA-1994). De tal manera, que se inocularon por duplicado cajas Petri con 1 mL de la muestra y sobre éstas se vertieron aproximadamente 15 mL de Agar para Métodos Estándar (Cat. 211724, Bioxon), mezclando hasta lograr una disociación homogénea. Una vez solidificados, se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 h. Para el conteo se consideraron las diluciones que

presentaron crecimientos entre 25 y 250 colonias, expresándose en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por cm², mL o g, dependiendo del tipo de muestra.

6.2.2. Conteo de coliformes totales y coliformes fecales

Se realizó de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM-110-SSA1-1994 y NOM-112-SSA1-1994). A partir de 1 mL de suspensión de la muestra, se realizaron diluciones decimales correspondientes hasta conseguir su cuantificación. Las diluciones se sembraron por triplicado en tubos con Caldo Lactosado (CL: Cat. 211700, Bioxon) con tubo Durham, incubando a 35°C con lectura a las 24 h. Los tubos que mostraron turbidez, con o sin producción de gas, se les realizó la prueba confirmatoria de CT. Para lo cual, se inocularon tubos con Caldo Bilis Verde Brillante (CBVB: Cat. 211500, Bioxon) y se incubaron a 35°C por 24. Para la determinación de CF, de los tubos positivos en CBVB, se inocularon por azada tubos con Caldo EC (Cat. 231420, Difco) y se incubaron por 24 h a 44°C. Se consideraron positivos para CF los tubos con turbidez y/o gas. Como testigo positivo para coliformes fecales se utilizó una cepa de referencia de *Escherichia coli*, ATCC 25922, proporcionada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

6.3. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Siguiendo los criterios descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994) y el Programa de Reducción de Patógenos (SENASICA, 2010). De las muestras positivas para CF en caldo EC, se tomó una azada y se sembraron por estría cruzada en Agar MacConkey (McC: Cat. 212123, Difco) y en Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB: Cat. 211215, BBL), incubando a 37°C por 24 h. Las colonias de características morfológicas presuntivas de *E. coli*, se aislaron en Agar Tripticasa Soya (TSA: Cat. 211043, BBL) e incubaron 37°C por 24 h, para obtener un cultivo puro. La identificación de las colonias se realizó mediante pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa (Triple Azúcar Hierro, TSI: Cat.226540), producción de indol, rojo de metilo, citrato de Simmons y Vogues-Proskauer.

6.4. Aislamiento e identificación *Enterococcus* spp.

De los tubos con muestras positivas a CF en caldo de EC, se tomó una azada y se sembraron en placas de Agar Sangre (AS: Cat. 211037, BBL) y Agar Bilis Esculina (ABE: Cat. 299068, BBL), incubando a 37°C por 24-48 h. Las colonias de aspecto presuntivo de *Enterococcus* sp, fueron sembradas individualmente en Agar Tripticosa Soya (TSA: Cat. 211043, BBL) y se incubaron a 37°C durante 24 h, para obtener un cultivo puro. Para su identificación, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de catalasa, prueba de hidrolisis de bilis esculina en tubo, prueba de hidrólisis de pirrolidonil-p-naftilamida (PYR). Así también, como pruebas bioquímicas complementarias se realizó hidrolisis de arginina, hidrolisis de piruvato y fermentación de azúcares (manitol, sorbitol, arabinosa, rafinosa). La identificación se realizó mediante el espectrómetro de masas por tiempo de migración (tiempo de vuelo) con desorción/ionización laser asistida por una matriz (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer).

6.5. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

Aquellas cepas identificadas como *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp, se les realizó la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en placa de Kirby–Bauer, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017; CLSI, 2012). Para *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., se utilizaron 16 antibióticos diferentes (cuadro 1).

Cuadro 1. Agentes antimicrobianos utilizados para las pruebas de susceptibilidad en aislados de *E. coli* y *Enterococcus* spp

<i>Escherichia coli</i>			<i>Enterococcus</i> spp.		
Agente antimicrobiano		Cantidad (µg)	Agente antimicrobiano		Cantidad (µg)
Amikacina	AK	30	Oxacilina	OX	30
Amoxicilina/ ácido clavulánico	AMC	25	Quinupristina/ dalfopristina	QD	25
Ampicilina	AM	25	Ampicilina	AM	25
Cefalotina	CF	30	Eritromicina	E	30
Cefepime	FEP	30	Linezolid	LI	30
Cefotaxima	CTX	30	Cefotaxima	CTX	30
Ceftriaxona	CRO	30	Minociclina	MI	30
Ciprofloxacina	CIP	5	Ciprofloxacina	CIP	5
Cloranfenicol	CL	30	Teicoplanina	TEI	30
Estreptomicina	STR	30	Estreptomicina	STR	30
Gentamicina	GE	10	Gentamicina	GE	10
Netilmicina	NET	30	Vancomicina	VAN	30
Nitrofurantoína	NF	300	Nitrofurantoína	NF	300
Levofloxacina	LEV	5	Levofloxacina	LEV	5
Trimetoprim/ sulfametoxazol	STX	25	Rifampicina	RI	25
Tetraciclina	TET	30	Tetraciclina	TET	30

A partir del crecimiento fresco de cada cepa en TSA, se ajustó a una turbidez de 0.5 de McFarland (ASM, 2013). A partir de esta concentración, se inocularon en placa agar Mueller-Hinton (MH: Cat. 225250, Difco), dejando secar 5 min. Después se colocaron los sensibilizadores de antibiótico y se incubaron a 37°C por 18 h. Los resultados fueron interpretados como describe el CLSI. Se midieron los halos de inhibición y se clasificaron en: Resistente (R) cuando no genera halo de inhibición o éste es casi nulo; Intermedio (I) cuando se presenta halo de inhibición, pero éste es inferior a los parámetros establecidos para el antimicrobiano; y Sensible (S) cuando el halo de

inhibición es amplio y no se observa crecimiento bacteriano (tener en cuenta siempre el parámetro establecido para cada fármaco).

6.6. Detección de genes de resistencia

Como primer paso, se prepararon los lisados a partir de cultivo fresco de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en Agar Soya Tripticasa (TSA). Se suspendieron las colonias en 500 µl de agua MiliQ estéril. Se homogenizaron y sometieron a un impacto térmico de 95°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 3 minutos, observándose una separación de fases de un sobrenadante transparente y un precipitado blanquecino. Se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para este estudio, se incluyeron los genes *tetA* y *tetB* para tetraciclinas, *strA* y *strB* para estreptomicinas y *aac(3)* y *aadA* para aminoglucósidos (Kosak, et al., 2009; Ng et al., 2001) (cuadro 2).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para la identificación de genes de resistencia en *E.coli*

Genes	Primer	Tm	Producto pb
<i>tetA</i>	F - GCTACATCCTGCTTGCCTTC	52	210
	R - CATAGATCGCCGTGAAGAGG		
<i>tetB</i>	F - TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	52	659
	R - GTAATGGGCAATAACACCG		
<i>strA</i>	F - ATGGTGGACCCTAAAACCTCT	42	893
	R - CGTCTAGGATCGAGACAAAG		
<i>strB</i>	F - ATGGTGGACCCTAAAACCTCT	42	893
	R - CGTCTAGGATCGAGACAAAG		
<i>aac(3)</i>	F - ATGGTGGACCCTAAAACCTCT	54	893
	R - CGTCTAGGATCGAGACAAAG		
<i>aadA</i>	F - GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	52	525
	R - AATGCCAGTCGGCAGCG		

F: Forward; R: Reverse Tm: Temperatura de alineación; pb: Pares de bases

La identificación de los genes se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de reacción de PCR consistió en buffer 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, iniciadores 10 mM, Taq ADN polimerasa 5 U y agua estéril en un volumen final de 15 µL. Las condiciones del programa de amplificación utilizado para los genes fueron: temperatura de desnaturalización inicial de 95°C/1 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C/45 s, alineamiento a 42-58°C/45 s (dependiendo de los iniciadores), y una extensión a 72°C/45 s, con un ciclo final de

extensión a 72°C/7 min. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, a 100 volts por 40 minutos. Las muestras corrieron en co-migración con un marcador de peso molecular de 100 pb y se empleó SYBR Green para la tinción de las bandas amplificadas.

6.7. Detección de factores de virulencia

Se utilizó el mismo lisado celular descrito previamente para la detección de genes de resistencia. Para identificar los genes de virulencia, se utilizó el protocolo descrito por Canizalez *et al.* (2013), incluyendo tres genes: *stx1*, *stx2* y *hlyA* (cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores para factores de virulencia de *E. coli*.

Gen	Secuencia 5'- 3'	pb
<i>stx1</i>	CAAAGACGTATGTAGATTCGC TTCGTTCAACAATAAGCCGTA	192
<i>stx2</i>	TATTATTTAAATGGGTACTGTGC CATAACTTTGTTGGGTCGAAA	96
<i>hlyA</i>	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC	569

pb: pares de bases

La mezcla de reacción de PCR consistió en buffer 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, iniciadores 10 mM, Taq ADN polimerasa 5 U y agua estéril en un volumen final de 15 µL. Las condiciones del programa de amplificación utilizado para los genes *stx1* y *stx2* fueron temperatura de desnaturalización inicial de 95°C/1 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C/45 s, alineamiento a 54°C/45 s, y una extensión a 72°C/45 s, con un ciclo final de extensión a 72°C/7 min. Para el gen *hlyA* los ciclos de desnaturalización fueron a 95°C/40 s, alineamiento a 60°C/40 s, y una extensión a 72°C/40 s. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, a 100 volts por 40 minutos.

6.8. Clasificación de grupos filogenéticos

Los aislados se clasificaron siguiendo los criterios de Clermont *et al.*, (2013 y 2000), en cuatro grupos posibles: A, B1, B2, D. Se realizó una PCR multiplex dirigida a 3 marcadores candidatos: *chuA*, un gen requerido para el transporte de hemo en *E. coli* enterohemorrágico O157:H7; *yjaA*, un gen identificado inicialmente en la

secuencia reciente del genoma completo de *E. coli* K-12, cuya función se desconoce; y un fragmento de ADN que se ha identificado recientemente como parte de un gen putativo lipasa esterasa, TSPE4 (Clermont *et al.*, 2013) (cuadro 4).

Cuadro 4. Iniciadores para filogrupos de *E. coli*.

Gen	Secuencia 5'-3'	pb
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288
<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211
TspE4C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152

pb: pares de bases

La mezcla de reacción de PCR consistió en: buffer 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, iniciadores 10 mM y Taq ADN polimerasa 5 U; en un volumen final de 15 µL. El programa de amplificación, tuvo las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 s, alineamiento a 54°C por 45 s, y una extensión a 72°C por 45 s, con un ciclo final de extensión a 72°C por 7 min. Los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, a 100 volts por 40 minutos. Las muestras corrieron en co-migración con un marcador de peso molecular de 100 pb, utilizando para su tinción Sybr green. Para la interpretación de la presencia y/o ausencia de bandas correspondientes a los genes y fragmentos estudiados, se utilizó la metodología de Clermont *et al.*, (2000 y 2013).

6.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico paramétrico (medidas de tendencia central y frecuencias relativas) y un análisis estadístico de asociación mediante X², para las variables de resistencia fenotípica, genes de resistencia, genes de virulencia y filogrupos.

7. RESULTADOS

7.1. Muestreo

Durante el periodo de enero a diciembre 2017, se obtuvieron un total de 336 muestras, distribuidas en: 120 muestras de heces, 120 muestras de canales, 36 muestras de superficies y 60 muestras de agua (cuadro 5).

Cuadro 5. Tipo de muestra, cantidad y frecuencia de toma de muestras

Tipo de muestra	No. de muestras		
	Quincenal	Mensual	Anual
Heces	5	10	120
Canales	5	10	120
Superficies		3	36
Agua	1	5	60
Total	11	28	336

7.2. Determinaciones bacteriológicas

7.2.1. Conteo de mesófilos aerobios totales

Heces: No se realizó la prueba en estas muestras.

Canales: Se identificó un promedio de 7,499 UFC/cm², con valores en un rango entre 83 a 68,333 UFC/cm².

Superficies: En cuanto a las superficies, para la pared del área de proceso el promedio fue de 20,025 UFC/cm², con valores entre 16 a 150,000 UFC/cm². Lo que fue la puerta y marco del cuarto frío tuvieron un promedio de 18,291 UFC/cm², con un mínimo de 150 UFC/cm² y un máximo de 125,000 UFC/cm². En cuanto a la superficie del camión el promedio fue 1,266 UFC/cm², entre 45 a 8,000 UFC/cm².

Agua: Las muestras de agua de la cisterna presentaron un promedio de 562 UFC/mL, oscilando en un rango de 0 a 3,400 UFC/mL. Las muestras de lavado de canales tuvieron un promedio de 153 UFC/mL, con valores entre un rango de 0 a 2,600 UFC/mL. En cuanto al agua de descarga de degüelle y el agua de descarga de vísceras, para ambos casos los resultados se definieron como “No Determinados”.

7.2.2. Conteo de coliformes totales y coliformes fecales

Heces: No se realizó la prueba en estas muestras.

Canales: Para coliformes totales (CT) el promedio fue de 42.4 NMP/cm², con un mínimo de 0.2 NMP/cm² y un máximo de 91.7 NMP/cm². En cuanto a coliformes fecales (CF) el promedio fue de 39.8 NMP/cm², con valores entre 0 a 91.7 NMP/cm².

Superficies: La pared del área de proceso reporto para CT un promedio de 4.3 NMP/cm², con valores entre 0 a 38.3 NMP/cm². En CF el promedio fue de 3.6 NMP/cm², oscilando valores entre 0 a 38.3 NMP/cm². En lo correspondiente a la puerta y marco del cuarto frío, el promedio de CT fue de 24.5 NMP/cm², en un rango de 0 a 91.7 NMP/cm². El valor promedio de CF fue de 22.4 NMP/cm², con datos entre 0 a 91.7 NMP/cm². Las muestras obtenidas de la superficie del camión dieron un promedio de CT de 12.2 NMP/cm², con valores entre 0 a 91.7 NMP/cm². Para CF el promedio fue de 12.0 NMP/cm², oscilando entre 0 a 91.7 NMP/cm².

Agua: Los resultados para el agua de la cisterna fueron en CT un promedio de 13.2 NMP/mL, con un mínimo de 0 NMP/mL a un máximo de 110 NMP/mL. En cuanto a CF, el promedio fue de 5.6 NMP/mL, en un rango de 0 a 46 NMP/mL. Las muestras de lavado de canales tuvieron un conteo de CT promedio de 1.1 NMP/mL, en un rango de 0 a 15 NMP/mL. Para CF, el promedio fue de 0.6 NMP/mL, entre 0 a 9.3 NMP/mL. El agua de descarga de degüelle y el agua de descarga de vísceras, arrojaron resultados denominados como “No Determinados”.

7.3. Prevalencia de *Escherichia coli*

Del total de 336 muestras incluidas en este estudio, en el 83.3% (280/336) se identificó la presencia de *E. coli*. La mayor prevalencia se obtuvo en las muestras fecales con 98.3% (118/120) y la menor en superficies con 41.6% (15/36) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prevalencia de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en muestras de rastro

Tipo de muestra	No. de muestras	Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> No. (%)	Prevalencia de <i>Enterococcus</i> spp. No. (%)
Heces	120	118 (98.3)	88 (73.3)
Canales	120	117 (97.2)	112 (93.3)
Superficies	36	15 (41.6)	26 (72.2)
Agua	60	30 (50)	28 (46.6)
Total	336	280 (83.3)	254 (75.5)

7.4. Prevalencia de *Enterococcus* spp

Se obtuvo una prevalencia promedio de 75.5% (254/336) de *Enterococcus* spp en las muestras analizadas. Todas las muestras presentaron una prevalencia de *Enterococcus* spp superior al 40%. De estas, la mayor prevalencia se observó en las muestras de canales con 93.3% (112/120) y la menor en las de agua con 46.6% (28/60) (cuadro 5).

Así también, se logró determinar a nivel especie el 57% de estas cepas (145/254). Se identificaron 6 especies diferentes, que fueron: *Enterococcus faecalis* (6.2%; 9/145), *E. faecium* (26.2%; 38/145), *E. hirae* (44.8%; 65/145), *E. casseliflavus* (4.8%; 7/145), *E. gallinarum* (0.6%; 1/145) y *E. durans* (0.6%; 1/145) (cuadro 7).

Cuadro 7. Especies de *Enterococcus* spp. en muestras de rastro

Tipo de muestra	No. cepas	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. durans</i>	
		No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
Agua	8	0	0.0	1	12.5	6	75.0	0	0.0	0	0.0	1	12.5
Superficies	16	3	18.7	6	37.5	3	18.8	3	18.8	1	6.3	0	0.0
Canales	82	5	7.8	21	32.8	37	57.8	1	1.6	0	0.0	0	0.0
Heces	39	1	3.0	10	30.3	19	57.6	3	9.1	0	0.0	0	0.0
Total	145	9	6.2	38	26.2	65	44.8	7	4.8	1	0.6	1	0.6

7.5. Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos

En las 280 cepas identificadas como *E. coli* se realizó la prueba de susceptibilidad a 16 antimicrobianos. De estas cepas, el 17.6% (49/279) no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos incluidos en este estudio (cuadro 8). El 49.1% (117/279) de las cepas analizadas fueron resistentes ante menos de 2 antibióticos. Con base en la fórmula descrita por Selim et al (2014), se consideran multiresistentes aquellas cepas con resistencia simultánea a más de 3 antibióticos diferentes. Considerando esto, el 40.5% (113/279) de las cepas fueron multiresistentes ante 3 a 8 antibióticos (cuadro 8). Ninguna de las cepas de este estudio mostro resistencia a más de 8 antibióticos.

Cuadro 8. Porcentajes de multiresistencia en cepas de *E. coli* aisladas de rastro

Multiresistencia a antimicrobianos										
Número de antibióticos	Agua (n=30)		Superficie (n=15)		Canales (n=116)		Heces (n=118)		Total (n=279)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	11	36.7	6	40	19	16.4	13	11	49	17.6
1	6	20	5	33.3	27	23.3	26	22.0	57	20.4
2	2	7	1	6.7	27	23.3	30	25.4	60	21.5
3	5	17	0	0	25	21.6	25	21.2	55	19.7
4	2	6.7	1	6.7	9	7.8	15	12.7	27	9.7
5	3	10	1	6.7	10	8.6	6	5.1	20	7.2
6	10	33.3	0	0	5	4.3	3	2.5	79	28.7
7	0	0	0	0	1	0.9	0	0.0	1	0.4
8	0	0	1	6.7	0	0	0	0	1	0.4

Ahora bien, al analizar la resistencia de las cepas frente a cada antibiótico individualmente. Se observa que el mayor porcentaje de resistencia fue a tetraciclina (TE) con 51.3% (143/279), seguido de cefalotina (CF) con 4% (1130/279). Por su parte, ampicilina (AM) mostro resistencia ante 36.2% (101/279) de las cepas y estreptomicina (STR) a 39.8% (111/279). Solo una de 279 cepas de *E. coli* analizadas fue resistente a netilmicina (NET), y ninguna para cefotaxima (CTX) o ceftriaxona (CRO). El resto de los antibióticos presento valores de resistencia menores al 20% (cuadro 9).

Cuadro 9. Perfiles de resistencia ante 16 antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas de rastro

Resistencia a antimicrobianos										
Antibiótico	Agua (n=30)		Superficie (n=15)		Canales (n=116)		Heces (n=118)		Total (n=279)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
STR	9	30	4	26.7	61	52.6	37	31.4	111	39.8
LEV	0	0	1	6.7	1	0.9	0	0	2	0.7
NET	0	0	0	0	0	0	1	0.8	1	0.4
FEP	0	0	0	0	0	0	1	0.8	1	0.4
CF	6	20	3	20	57	49.1	64	54.2	130	46.6
GE	0	0	0	0	1	0.9	3	2.5	4	1.4
CTX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AK	1	3.3	0	0	0	0	7	5.9	8	2.9
AM	9	30	3	20	38	32.8	51	43.2	101	36.2
CRO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL	4	13.3	2	13.3	18	15.5	13	11	37	13.3
NF	5	16.7	1	6.7	3	2.6	6	5.1	15	5.4
TE	14	46.7	6	40	61	52.6	63	52.5	143	51.3
AMC	0	0	0	0	12	10.3	6	5.1	18	6.5
CIP	0	0	1	6.7	2	1.7	0	0	3	1.1
STX	6	20	3	20	18	15.5	18	15.3	45	16.1

Ahora bien, al analizar la resistencia a antimicrobianos por tipo de muestra, se observa que para tetraciclina (TE) el porcentaje de cepas resistentes es similar en todas las muestras, oscilando entre 40 a 52.6% (cuadro 9). Sin embargo, en el caso de cefalotina (CF), los porcentajes varían ampliamente por tipo de muestra, por un lado, las muestras de agua y superficies tiene un valor de 20%, mientras que para canales y heces es de 49.1-54.2%. En los resultados de ampicilina (AM) se obtiene un valor de resistencia mayor en aislados de heces con 43.2%, reduciendo entre 10 a 20% en los otros tipos de muestras (cuadro 9). Caso similar se observa para estreptomycin (STR), donde los aislados de canales exhiben una resistencia del 52.6%, y el porcentaje se reduce en los otros tipos de muestra entre un 10 a 20% menos que en canales.

Por otro lado, si observamos los resultados de sensibilidad a los antibióticos probados. El 99.3% (277/279) de las cepas *E. coli* probadas fueron sensibles a netilmicina (NET), a levofloxacin (LEV) y ceftriaxona (CRO) respectivamente. Así también, el 98.6% (275/279) de las cepas fue sensible ciprofloxacina (CIP) y un 96.8% (270/279) a gentamicina (GE) y 91.4% (255/279) a cefepime (FEP) (cuadro 10). El porcentaje de cepas sensibles ante el resto de los antibióticos probados fue entre 14.3 a 89.2% (cuadro 10).

Cuadro 10. Perfiles de sensibilidad de cepas de *E. coli* aisladas de rastro, a 16 antibióticos

Sensibles a antimicrobianos										
Antibiótico	Agua (n=30)		Superficie (n=15)		Canales (n=116)		Heces (n=118)		Total (n=279)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
STR	20	66.7	10	66.7	41	35.3	55	46.6	126	45.2
LEV	30	100	14	93.3	115	99.1	118	100	277	99.3
NET	30	100	15	100	116	100	116	98.3	277	99.3
FEP	29	96.7	15	100	109	94	102	86.4	255	91.4
CF	10	33.3	4	26.7	13	11.2	13	11.0	40	14.3
GE	28	93.3	15	100	114	98.3	113	95.7	270	96.8
CTX	26	86.7	15	100	94	81.0	93	78.8	228	81.7
AK	28	93.3	15	100	111	95.7	95	80.5	249	89.2
AM	18	60.0	11	73.3	45	38.8	44	37.3	118	42.3
CRO	30	100	15	100	115	99.1	117	99.2	277	99.3
CL	25	83.3	13	86.7	97	83.6	102	86.4	237	84.9
NF	18	60.0	14	93.3	68	58.6	77	65.3	177	63.4
TE	14	46.7	8	53.3	48	41.4	53	44.9	123	44.1
AMC	24	80.0	14	93.3	65	56.0	74	62.7	177	63.4
CIP	30	100	14	93.3	114	98.3	117	99.2	275	98.6
STX	24	80	12	80	93	80.2	97	82.2	226	81

Si revisamos los porcentajes de cepas sensibles por tipo de muestras, observaremos que mantienen valores similares para netilmicina (NET) entre 98.3 a 100%, para ceftriaxona (CRO) entre 99.1 a 100%, levofloxacina (LEV) y gentamicina (GE) entre 93.3 a 100%. En cefepime (FEP) se mantienen valores similares entre los aislados de canales, superficies y agua, entre 94 a 100%, reduciendo ligeramente este porcentaje en heces con 86.4% (cuadro 10). Ahora bien, al analizar la resistencia de las cepas de *E. coli* a los 16 antibióticos en conjunto, se detectaron 70 patrones de resistencia (cuadro 11). De los cuales, 35 son patrones únicos (que se presentan en una cepa y no se vuelven a repetir), y los otros 34 patrones se presentan cada uno en 1 a 7 cepas. Se presentaron 8 patrones diferentes, compuestos por un solo antibiótico (57 cepas); 13 patrones compuestos con 2 antibióticos (60 cepas), y 16 patrones diferentes con 3 antibióticos (55 cepas). En cuando a los patrones de multiresistencia, se identificaron 14 patrones diferentes, compuestos de 4 antibióticos (27 cepas); 11 patrones diferentes, compuestos de 5 antibióticos (20 cepas); 5 patrones diferentes, compuestos de 6 antibióticos (9 cepas); un solo patrón con 7 y 8 antibióticos (cuadro 11).

Cuadro 11. Patrones de resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli*

Clave	Patrón de resistencia a antibióticos					
P1	TE					
P2		CF				
P3	TE	CF				
P4			AM			
P5	TE		AM			
P6	TE	CF	AM			
P7		CF	AM			
P8				STR		
P9			AM	STR		
P10		CF		STR		
P11	TE			STR		
P12	TE	CF		STR		
P13	TE		AM	STR		
P14	TE	CF	AM	STR		
P15		CF	AM	STR		
P16	TE				STX	
P17	TE		AM		STX	
P18	TE	CF			STX	
P19	TE	CF	AM		STX	
P20	TE		AM	STR	STX	
P21	TE	CF	AM	STR	STX	
P22						CL
P23		CF	AM			CL
P24	TE					CL
P25	TE				STX	CL
P26	TE			STR		CL
P27	TE			STR	STX	CL
P28			AM		STX	CL
P29	TE		AM		STX	CL
P30	TE	CF			STX	CL
P31	TE	CF	AM			CL
P32	TE	CF		STR		CL
P33	TE	CF		STR	STX	CL
P34	TE	CF	AM	STR		CL
P35	TE	CF	AM	STR	STX	CL
P36	TE		AM	STR		CL
P37	TE			STR		CL
P38	TE		AM		STX	CL
P39	TE		AM	STR	STX	CL
P40		CF		STR		GE
P41	TE		AM	STR	STX	CL GE
P42						AK
P43	TE					AK
P44	TE	CF		STR		AK
P45	TE	CF		STR	CL	AK
P46						NF

Continuación.

Cuadro 11. Patrones de resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli*

P47	TE						NF	
P48		CF					AK	NF
P49		CF						NF
P50		CF	AM					NF
P51	TE	CF	AM	STR	STX			NF
P52	TE		AM	STR	STX			NF
P53	TE		AM		STX			NF
P54	TE		AM	STR		CL		NF
P55							AK	AMC
P56								AMC
P57	TE				STX			AMC
P58	TE	CF						AMC
P59	TE	CF			STX			AMC
P60	TE	CF	AM	STR				AMC
P61	TE		AM		STX			AMC
P62	TE	CF	AM			CL		AMC
P63	TE		AM		STX	CL		AMC
P64	TE	CF	AM	STR		CL		AMC
P65	TE	CF	AM	STR				AMC
P66	TE	CF	AM	STR	STX		GE	AMC
P67	TE	CF	AM	STR	STX			AMC
P68		CF						CIP
P69	TE	CF	AM	STR	STX			CIP LEV
P70	TE	CF	AM	STR	STX	CL		CIP LEV

En cuanto a *Enterococcus* sp, se realizaron las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos únicamente para las cepas identificadas como *E. faecium* (38) y *E. faecalis* (9). De los 16 antibióticos incluidos en este estudio, las cepas mostraron resistencia solo al 50% (8/16) de estos. Para *E. faecium* el 31.5% de las cepas (12/38) no mostraron resistencia ante ninguno de los antibióticos probados. El 68.4% (26/38) de las cepas mostraron resistencia a 1 a 3 antibióticos. Ninguna cepa probó ser multiresistente (con resistencia a 4 o más antibióticos). El 65.3% (17/26) de las cepas fueron resistentes a un antibiótico, el 30.7% (8/26) mostraron resistencia a dos antibióticos y el 3.8% (1/26) fue resistente a 3 antibióticos. Ahora bien, al analizar la susceptibilidad por antibiótico, los mayores porcentajes de resistencia fueron ante tetraciclina (TE) con el 47.3% (18/38) de las cepas y a eritromicina (E) con el 18.4% (7/38) (cuadro 12).

Cuadro 12. Perfiles de susceptibilidad a 16 antimicrobianos de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de rastro

Antibiótico	Susceptibilidad a antimicrobianos											
	<i>E. faecium</i> n= 38						<i>E. faecalis</i> n= 9					
	R		I		S		R		I		S	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
CF	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
AM	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
OX	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
GE	0	0	0	0	38	100	1	11.1	0	0	8	88.8
STR	5	13.1	0	0	33	86.8	4	10.5	0	0	5	55.5
CIP	3	7.8	7	18.4	28	73.6	0	0	0	0	9	100
LEV	0	0	13	34.2	25	65.7	0	0	0	0	9	100
E	7	18.4	23	60.5	8	21.0	1	11.1	5	0	3	33.3
QD	0	0	3	7.8	35	92.1	9	100	0	0	0	0
LI	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
TEI	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
VAN	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100
MI	0	0	0	0	38	100	4	10.5	0	0	5	55.5
TE	18	47.3	0	0	20	52.6	4	10.5	0	0	5	55.5
NF	3	7.8	25	65.7	10	26.3	0	0	0	0	9	100
CLI	0	0	0	0	38	100	0	0	0	0	9	100

En las cepas de *Enterococcus faecium* se observó sensibilidad del 100% (38/38) ante el 56.2% (9/16) de los antibióticos, incluyendo: cefotaxima (CF), ampicilina (AM), oxacilina (OX), gentamicina (GE), linezolina (LI), teicoplanina (TEI), vancomicina (VAN), minociclina (MI) y clindamicina (CLI) (Cuadro 12). En las cepas de *Enterococcus faecalis* se registró el 100% (9/9) de sensibilidad ante el 62.5% (10/16) de los antibióticos probados, que fueron: cefotaxima (CF), ampicilina (AM), oxacilina (OX), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), linezolina (LI), teicoplanina (TEI), vancomicina (VAN), netilmicina (NET) y clindamicina (CLI).

7.6. Detección de genes de resistencia

Se incluyeron en el análisis 6 genes asociados a resistencia a antibióticos, de los cuales 5 estuvieron presentes en las cepas de *E. coli* (5/6). El gen *aac(3)* para aminoglucósidos, no se identificó en ninguna cepa. El gen con mayor prevalencia fue

tetA con 22.5%, seguido de *strB* con 15.7%, después *tetB* con 8.9%, *strA* con 2.1% y *aadA* con 1.7% (cuadro 13).

Cuadro 13. Prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas de rastro en Tamaulipas

Genes	Muestra									
	Agua (n=30)		Superficie (n=15)		Canales (n=117)		Heces (n=118)		Total (n=280)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>tetA</i>	7	23.3	2	13.3	35	29.9	20	16.9	63	22.5
<i>tetB</i>	2	6.6	1	6.6	15	12.8	7	5.9	25	8.9
<i>strA</i>	3	10	0	0	2	1.7	1	0.8	6	2.1
<i>strB</i>	6	20	1	6.6	26	22.2	11	9.3	44	15.7
<i>aadA</i>	1	3.3	0	0	3	2.5	1	0.8	5	1.7
<i>aac(3)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	19	63.3	4	26.6	80	68.3	40	33.8	143	51.0

En las figuras 1 y 2 se presenta la detección molecular de tres de los genes de resistencia estudiados (*tetA*, *tetB* y *strA*).

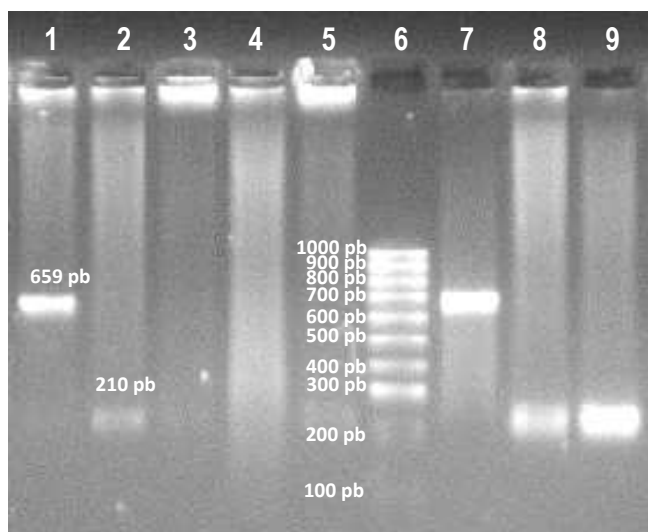


Figura 1. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección de genes *tetA* y *tetB*. Carril 1: control positivo de *tetB*, carril 2: control positivo de *tetA*, carril 4: control negativo, carril 6: marcador de 100 pb, carril 7-9: muestras positivas

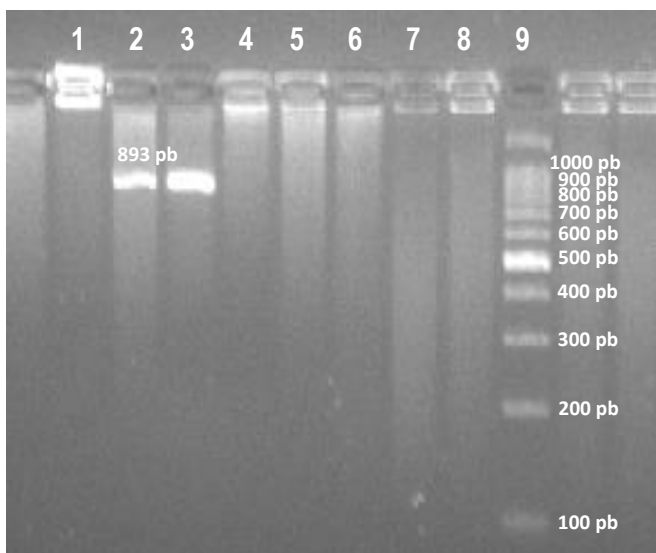


Figura 2. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección del gen *strA*. Carril 1: control negativo, carril 2: control positivo de *strA*, carril 3: muestra positiva, carril 4-8: muestras negativas, carril 9: marcador de 100 pb.

En las cepas de *Enterococcus* spp, se identificó únicamente la presencia de uno de los siete genes asociados a resistencia incluidos en este estudio. Siendo el gen *tetA* de tetraciclinas, detectado en el 38.6% (56/145) de las cepas analizadas. Distribuidas en un 57.1% (32/56) en cepas aisladas de canales, 16% (9/56) en agua y 26.7% (15/56) en aislados de superficies. No se detectó el gen *tetA* en muestras de heces.

7.7. Detección de factores de virulencia

Los 3 factores de virulencia incluidos estuvieron presentes en solo el 6% de las cepas analizadas (17/280) (cuadro 14). En 15 cepas *E. coli* se presentó uno de los 3 factores de virulencia (*stx1*, *stx2* o *hlyA*), y solo en dos cepas aisladas de canales se presentaron ambos genes *stx*. En ninguna cepa estuvieron presentes los 3 genes. En la figura 3 se presenta la detección del gen de resistencia *hlyA*.

Cuadro 14. Prevalencia de factores de virulencia en cepas *E. coli* aisladas de rastro

Genes	Muestra									
	Agua (n=30)		Superficie (n=15)		Canales (n=117)		Heces (n=118)		Total (n=280)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>stx1</i>	1	3.3	0	0	2	1.7	0	0	3	1.0
<i>stx2</i>	0	0	0	0	1	0.8	0	0	1	0.3
<i>hlyA</i>	8	26.6	1	6.6	1	0.8	5	4.2	15	5.3
Total	9	30	1	6.6	4	3.4	5	4.2	19	6.7

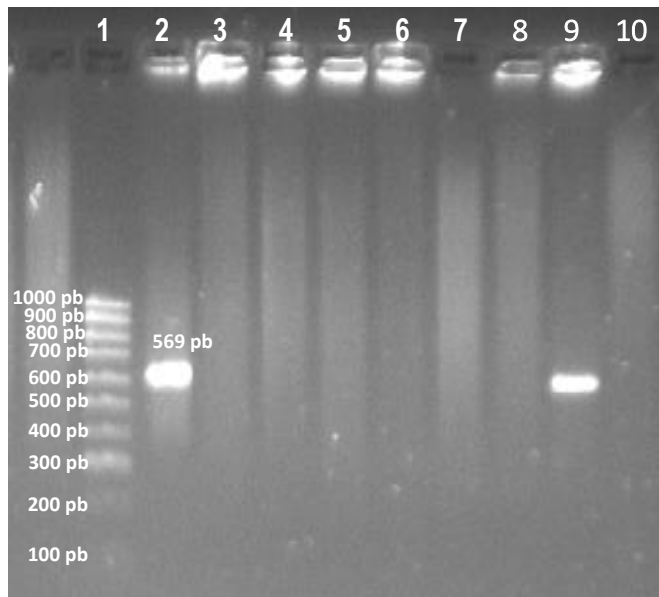


Figura 3. Gel de agarosa al 2%. PCR para detección del gen *hlyA*. Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2: cepa positiva, carril 3-8: cepas negativas, carril 9: control positivo, carril 10: control negativo.

7.8. Clasificación de grupos filogenéticos

Las 280 cepas de *E. coli* incluidas en este estudio, fueron clasificadas de acuerdo a la metodología de Clermont et al (2000 y 2013) en 4 filogrupos. El 49.2% (138/280) de las cepas perteneció al grupo A y el 17.5% (49/280) al grupo B1 (cuadro 15). Ambos grupos identificados como cepas comensales (A y B1), sumando un total de 66.8% (187/280). Por otro lado, las cepas patógenas fueron un 33.2% (93/280), distribuidas entre el grupo B2 con un 16.4% (46/280) y el grupo D con 16.71% (47/280) (cuadro 15).

Cuadro 15. Distribución de grupos filogenéticos en cepas *E. coli* aisladas de rastro

Muestras	Filogrupos							
	A		B1		B2		D	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Heces n=118	63	53.3	10	8.4	19	16.1	26	22
Canales n=117	55	47	26	22.2	17	14.5	19	16.2
Agua n=30	6	20	13	43.3	9	30	2	6.6
Superficies n=15	14	93.3	0	0	1	6.6	0	0
Total n=280	138	49.2	49	17.5	46	16.4	47	16.8

8. Discusión

La alta prevalencia de *E. coli* detectada en muestras de canales (97.5%), refleja prácticas inadecuadas en el proceso de faenado, ya sea por contaminación fecal cruzada o como consecuencia de un manejo inapropiado de la carne, lo que puede representar un riesgo latente de salud pública. Murutu y cols (2016) en Arusha (Tanzania), detectaron *E. coli* en un 70% de las canales estudiadas, valor por debajo del detectado en este estudio (97.5%), con un número similar de canales analizadas. Podríamos considerar que la prevalencia detectada en este estudio es alta comparada con otros trabajos similares [en Korea del Sur 47% (Park et al., 2015); en Australia 25% (Bass et al., 2011); en Canada 14.6% (Bohaychuk et al., 2011); en el noroeste de México 13.4% (Canizalez-Roman et al., 2013)]. La detección del 8.3% de las muestras de agua empleada para el proceso del rastro y lavado de canales, podría ser una de las principales fuentes de contaminación de las canales de estudio. La presencia de *E. coli* en el 33.3% de las muestras de agua de la cisterna, que, aunque es tratada por cloración previo a su uso en el rastro, este proceso de tratamiento requiere atención para minimizar los riesgos microbiológicos que puedan llegar a la canal y superficies de proceso. En este estudio se buscaron 3 genes de virulencia (*stx1*, *stx2* y *hlyA*). El gen *hlyA* fue el que se detectó con mayor frecuencia (5.4%, 15/280), presente en al menos un aislado de cada tipo de muestra. La prevalencia del gen *stx1* fue del 1.4% (4/280), presentes en aislados de canales y agua (área de descarga de vísceras). La frecuencia del gen *stx2* fue del 0.7% solo en canales. Los genes *stx1* y *stx2* fueron detectados en dos aislados de muestras de canales (cuadro 14). La presencia de aislados con genes de virulencia (*hlyA*) en una muestra de agua de la cisterna, hace suponer que la posible fuente de contaminación de las canales y superficies es el agua empleada para el proceso de limpieza del rastro; además, aunque los aislados detectados con los genes *stx1* y *stx2* fue baja, estos genes solo estuvieron presentes en aislados de canales.

Al asociar los resultados mediante un análisis de X^2 entre los aislados que presentaron factores de virulencia (variable independiente) con respecto a los filogrupos (variable dependiente), se obtuvo que los aislados agrupados como virulentos (filogrupos B2 y D) estadísticamente no dependen de la presencia de los genes de virulencia estudiados [*stx1*, *stx2* y *hlyA*] ($p > 0.05$). Sería importante utilizar mayor número de genes de virulencia de las cepas estudiadas para ampliar el estudio sobre el nivel de asociación entre los filogrupos considerados patógenos con relación a la presencia de factores de

virulencia. La adquisición de resistencia a antibióticos tanto en cepas comensales como de patógenas se ha convertido en un problema importante de salud pública (Park et al., 2015; Saeg et al., 2010). Los aislados de *E. coli* de los cuatro tipos de muestras del estudio (agua, canales, superficies del área de proceso y heces) mostraron altos perfiles de resistencia y multi-resistencia fenotípica; los aislados de canales y heces mostraron mayores porcentajes de resistencia, seguidos de agua y superficies (cuadro 2). Por tipo de antimicrobiano, los aislados mostraron mayor resistencia a la tetraciclina con un (51%), seguido de cefalotina (47%), estreptomycin (40%) y ampicilina (36%); al resto de antimicrobianos que se observó resistencia fue menor al 17%. En veterinaria el empleo de agentes antimicrobianos es una práctica común en la terapia de diversas patologías, de manera profiláctica o como promotores de crecimiento en animales de producción, situación que favorece la presencia de cepas bacterianas resistentes (WHO, 2014; Dibner & Richards, 2005). Las muestras de canales y heces de bovino estudiadas son de diferentes ranchos de la región (35 aproximadamente), mayoritariamente de sistemas extensivos y no se cuenta con información de los animales previo al sacrificio, de tal forma que no es posible asociar la presencia de aislados con altos perfiles de resistencia con el manejo de las explotaciones ganaderas concretas.

De acuerdo a la resistencia fenotípica observada en los aislados de estudio, se analizaron 2 genes para resistencia a tetraciclina (*tetA* y *tetB*) y 4 genes para resistencia a aminoglucósidos (*aac(3)*, *aadA*, *strA* y *strB*). De manera global, en el 37% (104/280) de los aislados se detectaron genes de resistencia; en la mayoría de los aislados que presentaron factores de virulencia solo se detectó un gen (74%, 77/104), en el 15.4% (16/104) dos genes, con tres genes el 8.7% (9/104) y en solo dos aislados (1.9%) con cuatro genes. Los genes *tetA* y *strB* fueron los que se detectaron con mayor frecuencia (23% y 16% respectivamente), ambos con mayor frecuencia en muestras de canales (30% y 22%), seguido de muestras de agua (23% y 20%), heces (17% y 9%) y superficies (13% y 7%). Los cuatro genes restantes fueron detectados en menores porcentajes. La presencia del gen *tetB* (9%) en los aislados, aunque en menores porcentajes que los genes *tetA* y *strB*, se mantuvo la misma constante por tipo de muestra (canales 13%, agua 7%, superficies y heces 6%). Aunque en porcentajes bajos, los genes *strA* y *aadA* fueron detectados en aislados de muestras de agua (10 y 3% respectivamente), de canales (2 y 3%) y en heces (1%); no fueron detectados en aislados de muestras de superficie. En ninguno de los aislados de las cuatro tipos de

muestras el gen *aac(3)* fue detectado. En los aislados de las muestras de canales se detectó el mayor número de genes de resistencia, mientras que la menor frecuencia ocurrió en las muestras de heces y superficies.

Un total de 236 cepas fueron analizadas para la detección de los genes *tetA*, solo el 23% 55/236 de las cepas albergaban el gen *tetA*, la mayoría de las cepas con *tetA* pertenecían a canales con 13.1% (31/236), heces 8.5%(20/236), superficie 1,7% (4/236), no se detectó el gen *tetA* en las cepas procedentes de agua. Para la detección del gen de resistencia a estreptomycin *strA* no se detectaron cepas que albergaban este gen en ninguna de las fuentes analizadas en este estudio.

Se observó que hay asociación entre la presencia de genes de resistencia y la resistencia fenotípica para tetraciclina ($p < 0.001$) y estreptomycin ($p < 0.01$). Considerando los perfiles de resistencia detectados, sería importante ampliar los estudios para la detección de genes de resistencia hacia otros antimicrobianos (como cefalosporinas y betaláctamicos) para medir la asociación o independencia entre los aislados que presentan factores de resistencia *versus* perfiles de resistencia fenotípica. Para el análisis filogenético, las 280 cepas de *E. coli*, aisladas de los cuatro tipos de muestras se clasificaron dentro de los 4 grupos filogenéticos. La frecuencia de cepas catalogadas dentro de los filogrupos considerados como comensales “de baja patogenicidad” (A y B1) fue del 67% (187/280) por un 33% (93/280) de los filogrupos con potencial patogénico [(B2 y D) (cuadro 15)]. El mayor % de filogrupos patógenos se detectaron en las muestras de heces (38%), seguido de agua (37%), canales (31%) y superficies (7%). De acuerdo con los conteos de coliformes totales y coliformes fecales detectados en las canales de estudio, y en el agua de la cisterna (almacén), pudiéramos pensar que las principales fuentes de contaminación podrían ocurrir particularmente en el eviscerado (ligadura de esófago y recto), y por fallas en el proceso del clorado del agua empleada para la limpieza de las canales e instalaciones de proceso del rastro.

Los enterococos, *E. faecum* y *E. faecalis* son microorganismos caracterizados por encontrarse en el tracto digestivo de humanos y animales de sangre caliente, los cuales, son indicadores de contaminación fecal que a diferencia de las coliformes permanecen más tiempo en el ambiente. Furtula y cols., (2013) en Canadá, analizaron dos granjas de aves, desde el área de producción, así como el agua utilizada en la granja. Ellos identificaron 6 especies de *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E.*

casseliflavus, *E. gallinarum*, *E. hirae* y *E. durans*) siendo los más prevalentes *E. faecium* y *E. faecalis*, esto debido a que son cepas que se encuentran en intestino de animales como aves, ganado y caprinos, ellos probaron la resistencia antimicrobiana encontrando múltiples patrones de resistencia, pero la más alta resistencia se reportó en lincomicina con 80.3% y tetraciclina con 65.3%. En nuestro estudio se obtuvo mayor resistencia en tetraciclinas 47.3% y eritromicina con 18.4%, estos resultados concuerdan con lo publicado con Furtula y cols. A pesar de que la prevalencia en su estudio es mayor. Por otra parte, Said y cols., (2016) de Túnez ellos realizaron un estudio en diferentes fuentes de alimentos como los procedentes de granjas y agricultura, ellos encontraron resistencia a múltiples antibióticos entre los cuales la mayor resistencia fue a ciprofloxacina con 60%, seguido por eritromicina con 18.5% similar a lo que nosotros obtuvimos en este estudio, la prevalencia de tetraciclina en su estudio fue menor (15.4%) en comparación con la de nuestro estudio 47.3%. Ellos también detectaron la resistencia a vancomicina en las cepas de *E. faecium*, *E. hirae*, *E. faecalis* a excepción de *E. casseliflavus*, esto debido a que este género puede presentar resistencia intrínseca debido a la presencia del gen *VanC* como porción cromosomal. Nosotros no detectamos resistencia a vancomicina en las cepas analizadas. A pesar de que más de 40 genes que codifican para tetraciclinas han sido caracterizados y divididos en 11 clases. En este estudio se optó por el gen *tetA* debido a que en Estados Unidos de América es el segundo más frecuente gen de resistencia a tetraciclinas asociadas a aislados humanos y animales. En este estudio se encontró una prevalencia del 23% en todas las fuentes analizadas en comparación con estudios publicados con Tyson y cols., (2018) en USA, ellos detectan una alta prevalencia mayor al 60% en carne de supermercado. Para la identificación del gen *strA*, nosotros no detectamos aislados con este gen, cabe mencionar que, la resistencia a estreptomicina puede ser adquirida o cromosómica, esta es frecuentemente debido a mutaciones en los genes que codifican para la proteína ribosomal S12, *rpsL*. La presencia de resistencia a estreptomicina fenotípica ha sido reportada en otros trabajos como el de Laulund y cols., (2017). La presencia de indicadores de calidad microbiológica como son *Enterococcus* spp. y *E. coli* son alarmantes en los rastros, y las fuentes deben ser monitoreadas.

Cabe mencionar que el agua que se emplea para el proceso del rastro es obtenida de un pozo profundo cercano al rastro, por lo que la posibilidad de tener infiltraciones

del desagüe del rastro es factible. La prevalencia de genes de virulencia, de resistencia, perfiles de resistencia y multi-resistencia, y filogrupos considerados potencialmente patógenos en los aislados de las muestras de estudio, pone de manifiesto el riesgo para los consumidores de la carne y subproductos; por lo que se deberían implementar medidas correctivas y establecer sistemas de reducción de riesgos de contaminación para minimizar los riesgos de transmisión de patógenos.

9. CONCLUSIONES

El estudio realizado es el primero en su tipo en Tamaulipas, México, que considera factores de virulencia, resistencia y grupos filogenéticos en aislados de *E. coli*, recuperados en el proceso de un rastro para bovinos. La prevalencia de *E. coli* en canales fue del 97.5%. El 82.4% de los aislados presentó perfiles de resistencia fenotípica y 41% multirresistencia. El mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina (51%), cefalotina (47%), estreptomicina (40%), y ampicilina (36%). Se detectó una baja prevalencia de factores de virulencia (6.8%) y una prevalencia intermedia de genes de resistencia (37%). El 67% de los aislados se filo-agruparon como comensales por un 33% dentro de los patógenos. En forma integral, los hallazgos bacteriológicos y moleculares indican un proceso operativo del rastro inadecuado, lo que podría representar un riesgo para los consumidores de carne y subproductos.

10.BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson AD, Nelson JM, Rossiter S, Angulo FJ. 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance* 9(4):373–379.
2. Arthur TM, Barkocy-Gallagher GA, Rivera-Betancourt M, Koohmaraie M. 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10):4847-4852.
3. ASM. 2013. American Society for Microbiology. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. McFarland standard.
4. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4):493-496.
5. Canizalez-Roman A, Gonzalez-Nuñez E, Vidal JE, Flores-Villaseñor H, León-Sicairos L. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 164(1):36-45.
6. CDC. 2011. Centro para el Control de Enfermedades y Prevención de Enfermedades. Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en los EE.UU. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/>.
7. Clermont O, Bonacors S, Bingen E. 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4555-4558.
8. Clewell DB, Dunny GM. 2002. Conjugation and genetic exchange in enterococci. In: Gilmore MS (ed). *The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 265-300.
9. CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Information supplement. M100-S22; Vol. 32; N° 3, Wayne, PA, USA.
10. CLSI. 2017. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100, 27th ed. Wayne, PA, USA.

11. Cocconcelli PS, Cattivelli D, Gazzola S. 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 88(2-3):315-323.
12. Coque MT. 2008. Evolutionary biology of pathogenic enterococci. In: Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutierrez JA (eds). *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*, ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 501-521.
13. Cowan ST, Steel J. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
14. Dibner JJ, Richards JD. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84(4):634-643.
15. Doyle MP, Erickson MC. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science* 85(6): 960-973.
16. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E., Chaventré A, Elion J, Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147(6):1671-1676.
17. FAO/RLC. 2010. Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación/Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/animalwelfare/zoonoses_16page_report.pdf
18. Fisher K., Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155(Pt 6):1749-1757.
19. Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47(1-2):1-24.
20. Furtula V, Jackson C, Farrell E, Barrett J, Hiott L, Chambers P. 2013. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area of intensive poultry production. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(3):1020-1036.
21. Galland JC. 1997. Risks and prevention of contamination of beef carcasses during the slaughter process in the United States of America. *Revue Science et Technique* 16(2):395-404.
22. Grujić R, Ivanović M, Antić B. 2010. Implementation of food safety management system in food production and handling in Northern Serbia. *Quality of Life* 2:2-4.

23. Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan, R, Pittet D. 2015. Antimicrobial resistance: one world, one fight!. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 4(49).
24. Hernández SJS, Zúñiga-Estrada A, Sánchez-Ortega I, Castro-Rosas J, Román Gutiérrez AD, Santos-López EM. 2007. Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal del estado de Hidalgo, México. *Veterinaria México* 38(2):187-195.
25. Hudson JA, Frewer LJ, Jones G, Brereton PA, Whittingham MJ, Stewart G. 2017. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science & Technology* 69:131-147.
26. Jahan M, Krause DO, Holley RA. 2013. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *International Journal of Food Microbiology* 163(2-3):89-95.
27. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., USA.
28. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky JA. 2004. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000–2001. *The Journal of Infectious Diseases* 190(10): 1739-1744.
29. Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, Machalaba CC. 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet* 380(9857):1936-1945.
30. Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. 2004. Pathogens resistant to antimicrobial agents: Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Disease Clinics of North America* 18(3):467-511.
31. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y veterinaria n° 6. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
32. Kozak GK, Boerlin P, Janeck N, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from Swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 75(3):559-566.

33. Laulund S, Wind A, Derkx PM, Zuliani V. 2017. Regulatory and safety requirements for food cultures. *Microorganisms* 5(2):28.
34. Lim J, Hong JB, Sheng H, Shringi S, Kaul R, Besser TE, and CJ Hovde. 2010. Phenotypic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with the plasmid O157. *Journal of Microbiology* 48:347-357.
35. Lindsay AG, (ed). 2010. *Kucers' The Use of Antibiotics*. 6th Ed., Vol 1, ASM Press, London, UK.
36. Mira A, Martín-Cuadrado AB, D'Auria G, Rodríguez-Valera F. 2010. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *International Microbiology* 3(2):45-57.
37. Miranda J, Mondragón A, Rodríguez J, Guarddon M, Nebot C, Galán C, Coronel C. 2010. Presence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from isolate from foodstuffs in Hidalgo State (México). *Journal of Food* 8(1):15-21.
38. Murutu R, Luanda C, Rugumis B, Mwanyika G, Subbiah M, Call DR, Buza J. 2016. Detection of microbial surface contamination and antibiotic resistant *Escherichia coli* on beef carcasses in Arusha, Tanzania. *African Journal of Microbiology Research* 10(30):1148-1155.
39. Nei D, Latiful BM, Enomoto K, Inatsu Y, Kawamoto S. 2011. Disinfection of radish and alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* by a gaseous acetic acid treatment. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(10):1089-1094.
40. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threfall J, Scheutz F, Van Der GJ, Kruse H. 2010. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139 Suppl 1:S3-15.
41. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* 15:209-215.
42. Niyonzima E, Ongol MP, Kimonyo A, Sindic M. 2015. Risk factors and control measures for bacterial contamination in the bovine meat chain: A review on *Salmonella* and pathogenic *E.coli*. *Journal of Food Research* 4(5):8-121.
43. NOM-092-SSA1-1994: Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
44. NOM-109-SSA1-1994: Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

45. NOM-110-SSA1-1994: Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
46. NOM-112-SSA1-1994: Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
47. NOM-194-SSA1-2004: Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
48. OMS. 2012 Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva N°194.
49. O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. United Kingdom. p. 84.
50. Park H, Yoon JW, Heo EJ, Ko EK, Kim KY, Kim YJ, Yoon HJ, Wee SH, Park YH, Moon JS. 2015. Antibiotic Resistance and Virulence Potentials of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolates from Raw Meats of Slaughterhouses and Retail Markets in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(9):1460-1466.
51. Pascual M, Calderón V. 2000. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Segunda edición, Editorial Díaz de Santos. p. 22-25
52. Pasavento G, Calónico C, Ducci B, Magnanini A, A Lo Nostro A. 2011. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology* 41:1-7.
53. Romero C. 2007. *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Escherichia coli*. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. 68:p. 751.
54. Rubio LMS, Méndez Medina, RD. 2012. Matanza y procesamiento. TIF vs. Municipal slaughter and processing. Federal inspected regulations vs municipal. *Ciencias Agrícolas Informa* 21(1):58-62.
55. Saeg HD, Ahmadi E, Kazemnia A, Ahmadiania M. 2010. Molecular identification and antibiotic susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolates from sheep faeces samples. *Comparative Clinical Pathology* 21(4):467-473.
56. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 74(3):434-452.

57. Ben Said L, Klibi N, Dziri R, Borgo F, Boudabous A, Ben Slama K, Torres C. 2016. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(5):1627-1633.
58. Schroeder CM, White DG, GB, Zhang Y, McDermott PF, Ayers S, Zhao S, Meng J. 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, EUA. *International Journal of Food Microbiology* 85(1-2):197-202.
59. SENASICA. 2010. Sistemas de Reducción de Riesgos y Contaminantes. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=3446>
60. Sofos JN, Geornaras I. 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science* 86(1):2-14.
61. Tyson GH, Nyirabahizi E, Crearey E, Kabera C, Lam C, Rice-Trujillo C, Tate H. 2018. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. *Applied and Environmental Microbiology* 84(1):e01902-17.
62. White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott FP. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection* 4(2):405-412.
63. WHO. 2014. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Press. Ginebra Suiza. Disponible en http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf?ua=1