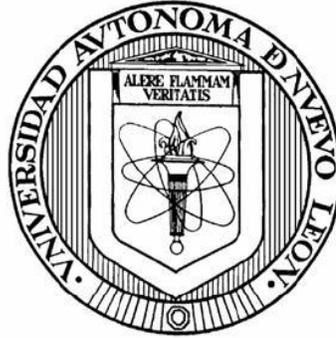


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS ENTERO-PATÓGENAS
(PATOTIPOS DE *E.coli* Y *Salmonella* spp.) PRESENTES EN TOMATE (*Solanum
lycopersicum*) EN PUNTOS DE VENTA EN EL ÁREA METROPOLITANA DE
MONTERREY, NUEVO LEÓN.**

POR

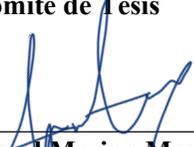
I.Q. JORGE ELI SAUCEDO CARRILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2024

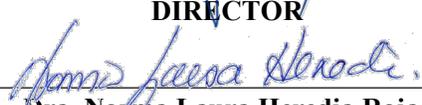
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS ENTERO-PATÓGENAS (*E. COLI* PATOTIPOS Y *SALMONELLA* SPP.) PRESENTES EN TOMATE (*SOLANUM LYCOPEPICUM*) EN PUNTOS DE VENTA EN EL ÁREA METROPOLITANA DE NUEVO LEÓN.

Comité de Tesis



Dr. José Ángel Merino Mascorro

DIRECTOR



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

SECRETARIO



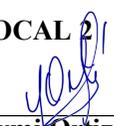
Dr. José Santos García Alvarado

VOCAL 1



Dr. Jorge Castro Garza

VOCAL 2



Dra. Yaraymi Ortiz Reyes

VOCAL 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS ENTERO-PATÓGENAS (*E. COLI* PATOTIPOS Y *SALMONELLA* SPP.) PRESENTES EN TOMATE (*SOLANUM LYCOPESICUM*) EN PUNTOS DE VENTA EN EL ÁREA METROPOLITANA DE NUEVO LEÓN.

Dirección de Tesis



Dr. José Ángel Merino Mascorro
Director

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, A1-S-25033.

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo en mi desarrollo académico y el financiamiento para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Biológicas, por el apoyo y el recibimiento.

Al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, por abrirme las puertas de su laboratorio y siempre recibirme con alegría.

Al Dr. Santos y la Dra. Norma, que a pesar de todo me apoyaron hasta el final y se preocuparon por mí aunque no les correspondiera, gracias por esa paciencia y tener fe en mi proceso, gracias de verdad.

Al Dr. Ángel quien fue mi copiloto en este proyecto, gracias por dejarme entrar un poco a su vida, por esas pláticas en su cubículo, el asesoramiento, los regaños y todo lo que aprendí de usted, agradezco cada parte de ello.

Al Dr. Eduardo, Dr. Jorge y la Dra. Luisa, que a pesar de que no les correspondía siempre recibieron mis dudas con una cálida respuesta.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron presentes, a Lorena, Frida, Axel, Héctor y Brenda, todos saben que los aprecio y los llevaré en mis memorias.

Y a los amigos que hice en el camino, gracias por estar, los llevo a cada uno en un pedacito de mi corazón.

A Carlos y Alexia, mis roomies con los que siempre podía platicar y quejarnos del calor y demás cosas.

Gracias a Angie, por ser mi otro pedazo de corazón y por el inmenso amor que me das y a pesar de que a veces no me lo mereciera, siempre estuvo a mi lado y alentándome a seguir, gracias por ser mi luz y mi compañera de vida. Me diste mucha fuerza en ocasiones que sentía que no era suficiente para seguir.

Además de a la Bonnie y Parvati por siempre, recibirme con tanto amor, así como a la Tsuki, que me acompaña.

A Kevin, por el aprecio que me tiene.

A mis padres, a mi Papa por creer en mí y siempre tener esa confianza en mi Madre, que siempre ha sido la que más me ha apoyado y le debo esto y muchas cosas mas, gracias papas. Y a mi hermano, por siempre ser tan gracioso y por estar ahí cuando necesitaba alguien. Además, a todas las personas que han sembrado un poco de ellas en mi mi tío Juan y Javi, Abue Bertha, Mama Fina, mi tia Soco y Christian, mi tío Juan, Gore, Ale, Regis y David y Yazz, gracias infinitamente.

A todos los que creyeron en mí y me acompañaron.

DEDICATORIAS.

A mis papás, por ser el motor de todo lo que soy, por todo lo que me apoyaron y creyeron en mí, los amo con todo mi corazón.

A Angie, gracias por todo, por creer en mí y darme ese aliento de amor en mi vida.

Al Dr. Santos y la Dra., Norma y el Dr. Ángel, gracias por todo, aprendí muchísimo y lo agradezco, siempre los llevare en mi corazón.

“Viaje antes que destino...”

-Brandon Sanderson.

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN	20
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).....	22
2.2 Patógenos responsables de las ETAs.....	22
2.2.1 Contaminación presente en vegetales.	23
2.3 Tomate.....	25
2.4 Contaminación en el tomate.	25
2.4.1 <i>Salmonella</i> spp.	26
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	27
2.5 Resistencia a antibióticos.	33
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO GENERAL.....	37
5.1 Objetivos específicos.....	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.1 Recolección de muestras.	38
6.1.1 Procesamiento de las muestras.....	38
6.2 Búsqueda de bacterias indicadoras de contaminación.....	38
6.3 Detección de bacterias patógenas.....	39
6.3.1 Aislamiento de enteropatógenos	39
6.3.2 Extracción ADN de cultivo bacteriano.	40
6.4 PCR de punto final.	40
6.5 Identificación de resistencia a antibióticos en las cepas aisladas.	42
6.6 Análisis estadístico.	43

7. RESULTADOS.	44
7.1 Indicadores de contaminación microbiológica.	44
7.2 Presencia de bacterias entero-patógenas en las muestras.	46
7.3 Confirmación de patotipos de <i>E. coli</i> mediante PCR punto final.	47
7.4 Determinación del perfil de resistencia a antibióticos.	50
8. DISCUSION.	56
9. CONCLUSIONES.	59
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	61

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Número de casos, hospitalización y muertes causadas por enfermedades de transmisión por alimentos, reportados en Estados Unidos por la FDASN.	24
2	Características para la sospecha de microorganismos (<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.).	40
3	Factores de virulencia de interés en <i>E.coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.	40
4	Temperaturas de reacción para PCR punto final.	41
5	Cebadores utilizados para la determinación de la presencia de bacterias patógenas en el tomate.	42
6	Antibióticos utilizados para prueba de susceptibilidad a antibióticos.	43
7	Promedio de indicadores en las muestras de tomate.	44
8	Indicadores de contaminación fecal en muestras de tomate adquiridas en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.	46
9	Distribución de las muestras colectadas.	47
10	Muestras positivas a los patotipos de <i>E. coli</i> .	48
11	Indicadores de contaminación fecal.	50
12	Perfil de resistencia a antibióticos por aislados de <i>E. coli</i> de muestras de tomate (n=61).	51
13	Zonas de inhibición estándar para bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	53
14	Zonas de inhibición y sensibilidad a antibióticos en aislados de <i>E. coli</i> por difusión en disco (n=17).	54
15	Resistencia de antibióticos de las cepas aisladas.	55

INDICE DE FIGURAS.

Figura	Título	Pagina
1	Modelo de adhesión a las células host de EPEC.	28
2	Modelo de 3 pasos de la patogénesis de EAEC.	30
3	Infección por DAEC.	31
4	Presencia de coliforme totales (log UFC/ml) en muestras de tomate.	45
5	Presencia de enterococos en muestras de tomate adquiridas en punto de venta en los municipios del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (n=100).	46
6	Crecimiento de <i>E. coli</i> en agares selectivos diferenciales.	47
7	Confirmación de <i>E.coli</i> STEC presente en una cepa aislada del tomate.	48
8	Confirmación de <i>E.coli</i> STEC presente en una cepa aislada del tomate	49
9	Muestras resistentes de <i>E. coli</i> a cada antibiótico.	50
10	Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> .	51
11	Resistencia a antibióticos en las cepas aisladas por municipio (n=61).	52
12	Evaluación de la resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E.coli</i> presentes en las muestras.	55

LISTA DE ABREVIATURAS.

WHO	World Health Organization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
OMS	Organización mundial de la salud
FDA	Food and Drug Administration
FDASN	Foodborne Diseases Active Surveillance Network
β -catorenos	betacarotenos
pH	potencial de hidrógeno
SUH	Síndrome urémico hemolítico
EPEC	<i>Escherichia coli</i> entero patogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> entero invasiva
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa
EAEC	<i>Escherichia coli</i> entero agregativa
Stx 1,2	Shiga toxina 1,2
UFC	Unidades formadoras de colonias
HGT	Transferencia horizontal de genes
AMR	Antimicrobial resistance
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido
AmpC	Adenosín monofosfato cíclico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ICC	Infusión cerebro corazón agar
LB	Luria Bertani agar
XLD	Xilosa lisina desoxicolato agar
BS	Bismuto sulfito agar
CT-SMAC	MacConkey Sorbitol agar
ADN	Ácido desoxirribonucleico

PBS	buffer fosfato salino
rpm	Revoluciones por minuto
Tris-HCl	Tris- clorhidrato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
NaCl	Cloruro de sodio
TBE 1X	Buffer Tris-Borato-EDTA
V	Volts
F	Forward
R	Reverse
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
SXT	Trimetoprima/sulfametoxazol
NA	Ácido nalidixico
TE	Tetraciclina
CN	Gentamicina
CIP	Ciprofloxacina
AMP	Ampicilina
CAZ	Ceftazidima
CTX	Cefotaxima
C	Cloranfenicol
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
M	Monterrey
GP	Guadalupe
AP	Apodaca
ES	Escobedo
SN	San Nicolas
SP	San Pedro Garza
NP	No patotipos
ECNP	<i>Escherichia coli</i> no patogena

Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causadas por el consumo de alimentos contaminados con agentes físicos, químicos o biológicos. Actualmente se ha observado un aumento en la presencia de bacterias con resistencia a antibióticos, ya sean patógenas o no patógenas. El incremento ha ocurrido a consecuencia de la adquisición de genes de resistencia en las bacterias, mal uso de antibióticos y/o transferencia de genes presentes en el microbioma.

Uno de los aspectos del control de la calidad microbiológica se enfoca en asegurar la ausencia de agentes bacterianos patógenos. En este estudio se analizó la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal, de *E. coli* enteropatógena y de *Salmonella* spp en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se tomaron 100 muestras compuestas de tomate, adquiridas en punto de venta de diferentes locaciones, las cuales fueron sometidas a análisis de recuento de coliformes totales, y enterococos obteniendo de 0.44 a 2.44 log UFC/g y 0.82 a 2.56 log UFC/g, respectivamente. Además se aislaron 61 cepas de *E. coli*, el análisis genético de las cepas de *E. coli* arrojó que 2/61 (3.28%) de los aislados portaban los genes *stx1*, *stx2* y *eae*, perteneciendo a *E. coli* productoras de Shiga toxina o STEC no-O157; no se encontró la presencia de *Salmonella* spp. Al evaluar la resistencia a antibióticos, en todos los municipios se encontraron cepas con resistencia al menos a 3 antibióticos, a excepción de Monterrey y Apodaca, donde algunas cepas fueron resistentes hasta a 7 antibióticos. Estos resultados demuestran la relevancia de los indicadores de calidad microbiológica, así como la presencia de algunos patitpos de *E.coli* en vegetales en punto de venta.

ABSTRACT.

Foodborne diseases (FBDs) are caused by the consumption of contaminated food with physical, chemical or biological agents. There has been a noted increase in the presence of antibiotic-resistant bacteria, whether pathogenic or non-pathogenic. This increase is attributed to the acquisition of resistance genes by bacteria, due to the misuse of antibiotics, and/or genes transfer within the microbiome.

One aspect of microbiological quality control focuses on ensuring the absence of pathogenic bacterial agents. This study analyzed the presence of fecal contamination indicator bacteria, pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. in the metropolitan area of Monterrey, Nuevo León, Mexico. A total of 100 composite tomato samples, obtained from various retail locations, were subjected to a microbiological analysis, total coliforms and enterococci, resulting in 0.44 to 2.44 log CFU/g and 0.82 to 2.56 log CFU/g, respectively. Additionally, 61 *E. coli* strains were isolated, Genetic analysis of these strains revealed that 2/61 (3.3%) carried the *stx1*, *stx2* and *eae* genes, identifying them as Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) non-O157; no *Salmonella* spp. was detected. Upon evaluating antibiotic resistance, *E. coli* strains with resistance to at least 3 antibiotics were found in all municipalities, except in Monterrey and Apodaca, where some strains were resistant to up to 7 antibiotics. These results underscore the significance of microbiological quality indicators and the presence of *E. coli* pathotype strains in retail vegetables.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública global que sigue en incremento y se estima que para 2050, los microorganismos resistentes a los antibióticos podrían causar alrededor de 10 millones de muertes anuales (WHO, 2019). La iniciativa One Health de la OMS tiene como objetivo optimizar la salud de las personas, los animales y los ecosistemas. Una parte importante de esta iniciativa es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos. Muchos agentes infecciosos solían ser controlados por algún antibiótico específico, pero con el paso del tiempo surgieron microorganismos resistentes a ellos que han dificultado el tratamiento de enfermedades, por lo que este tema ha adquirido suma importancia en el área médica y veterinaria, para el manejo del medio ambiente, así como los sectores de producción de alimentos para consumo humano y animal.

En la industria alimentaria, la presencia de bacterias resistentes a antibióticos es un problema actual que ha llegado a representar una crisis. Por ello es necesario un monitoreo y un sistema de vigilancia constante en todos los sectores de la cadena de producción y distribución para minimizar el riesgo de brotes infecciosos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos agrícolas se producen a partir de la contaminación de ellos en cualquier etapa del proceso. Desde el uso de antibióticos durante la cría que generan bacterias resistentes y son difíciles de eliminar o por la contaminación de la carne (res, aves, puerco, etc) por el manejo inadecuado durante el sacrificio, proceso de empaquetado y en los puntos de venta. Igualmente ocurre con vegetales que pueden contaminarse desde el cultivo, cosecha, empaquetado y en los puntos de venta. Incluso por bacterias existentes en el medio ambiente.

El incremento en la frecuencia de los brotes de enfermedades causados por alimentos atribuidos a frutas y verduras frescas contaminadas ha sido un foco de atención a nivel mundial (Ordaz *et al.*, 2019). La mayoría de estos brotes han sido asociados directa o indirectamente con el contacto con materia fecal humana o de animales en algún punto de la cadena de producción (Conrad *et al.*, 2017; Olaimat y Holley, 2012).

La epidemiología de las enfermedades producidas por alimentos contaminados ha cambiado con rapidez en las últimas décadas y algunos de los mayores patógenos en

humanos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Campylobacter* se diseminan fácilmente debido a que diversos animales actúan como reservorios (Hancock *et al.*, 1998).

Los vegetales frescos como los de hojas verdes, tomates, cucurbitáceas, chiles y nueces han sido registrados como los alimentos más comunes causantes de epidemias de enfermedades gastrointestinales causadas por *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* (Heaton y Jones, 2008). *Salmonella* spp. es uno de los agentes entéricos más frecuentemente asociados a las infecciones por bacterias transmitida por alimentos y al menos en 12 epidemias documentadas en los Estados Unidos, el tomate se ha involucrado como vehículo; este fruto ha sido responsable de al menos 1,990 casos confirmados y de aproximadamente 75,000 casos sospechosos (CDC, 2007).

El tomate es un cultivo muy importante en el mundo y es uno de los productos esenciales en la dieta de la mayoría de las personas. Nutricionalmente, los tomates son fuente de compuestos antioxidantes como β - caroteno, licopeno, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Georgé *et al.*, 2011). Es consumido en diferentes variedades y presentaciones, como fruta fresca lista para comer, puede estar presente en salsas, jugos, bebidas y muchos otros alimentos.

Según datos de la FAO la producción de tomate a nivel global en 2014 sobrepasaba las 4.8 millones de hectáreas equivalente a alrededor de 162 millones de toneladas por año. China es el principal productor de este fruto seguido de la India (FAO, 2014).

La producción del tomate en México se ha incrementado en los años recientes, y actualmente el país es uno de los mayores productores. Durante el periodo de 2003 a 2017, México produjo en promedio 2.5 millones de toneladas de tomate rojo por año, generando 14,759 millones de pesos (SIAP, 2020). La mayoría de los tomates consumidos en Estados Unidos durante el invierno del 2005 fueron importados desde México (Johnston *et al.*, 2006).

En este trabajo analizamos tomates (*Solanum lycopersicum*) recolectadas en punto de venta dentro del área metropolitana de Monterrey, N.L. para detectar enteropatógenos tales como *Salmonella* spp. y patotipos de *E.coli* que presenten resistencia a antibióticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva (Rosas, 2001), provocando enfermedades. En muchos de estos casos los vehículos han sido alimentos frescos. En Estados Unidos más de 25,000 casos de enfermedades y 600 brotes se han reportado en donde los alimentos involucrados fueron vegetales y frutas frescas (Heredia et al., 2016).

En países como Estados Unidos, Canadá y México, algunos frutos y vegetales como melón, tomates y jalapeños, han sido implicados como vehículos de enteropatógenos (Heredia et al., 2016b). La complejidad de los alimentos, aunado a la diversidad de patógenos que potencialmente estén asociados a enfermedades y la complejidad de los sistemas de inocuidad, hacen que esta área sea un reto en la priorización de los riesgos (Lake y Barker, 2018). Una revisión de estudios enfocados en la gestión de la inocuidad alimentaria y prevención de ETAs reveló los alimentos contaminados son generados por una manipulación incorrecta o faltas en los sistemas de higiene, además de otros errores de saneamiento (Palomino-Camargo et al., 2018).

2.2 Patógenos responsables de las ETAs.

Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2012), un brote de ETA se define como; “el acontecimiento de dos o más casos de una enfermedad similar resultante de la ingestión común de algún alimento”. Se clasifican en dos grupos (1) infección y (2) la intoxicación por ingesta de alimentos. En las infecciones suele haber un periodo de incubación, desde la ingestión hasta el tiempo que se presenta la aparición de los síntomas, suele ser mucho mayor dependiendo de la afección, a comparación con el periodo de aparición de síntomas en las intoxicaciones alimentarias. De la mayoría de los brotes reportados en Estados Unidos durante el 2015, el 33.7% fue asociado a agentes bacterianos tales como *Salmonella* spp. (21.8%) y *Campylobacter* spp. (8.9%) (Bintsis, 2017).

En Europa, los casos provocados por toxinas producidas por bacterias y albergadas en alimentos y agua han disminuido en los últimos años, por otro lado, se han reportado otros

agentes causantes de ETAs como virus (19.5%), y parásitos (< 3%). Sin embargo, existe aproximadamente un tercio (34%) de los brotes reportados hasta 2015, con un origen desconocido. Los vehículos implicados en la transmisión de las ETAs suelen ser principalmente de origen animal, particularmente huevos y sus subproductos al igual que las carnes de cerdo (10%), carnes de aves de corral y queso (9 y 8%, respectivamente), seguido del pescado y derivados (7%), leche y subproductos (5%), carne de bovino (4%) y crustáceos (3%). *Salmonella* spp. es la bacteria más frecuentemente implicada en ETAs (The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015, 2016).

Como se ha comentado, las bacterias suelen ser causas frecuentes de ETAs. Algunos de estos patógenos presentan características únicas que los hacen capaces de resistir a condiciones adversas e incrementan su habilidad de supervivencia, tales como la formación de esporas confiriendo resistencia a altas temperaturas como *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, y *B. cereus*. Otras especies bacterianas son capaces de producir toxinas resistentes al calor, como *Staphylococcus aureus*, y *Clostridium botulinum*. La mayoría de los patógenos suelen ser mesofílicos con temperaturas óptimas entre los 20 y 45°C; aunque hay excepciones como *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* que son capaces de desarrollarse en condiciones de refrigeración por debajo de los 10°C (Bacon y Sofos, 2003).

La contaminación en alimentos sigue siendo un problema actual. La detección y cuantificación de patógenos en ambientes es difícil por las bajas concentraciones en que suelen encontrarse, comparado con los microorganismos comensales. Existen especies de microorganismos que fungen como indicadores para la calidad y seguridad de algunos productos. Comúnmente suele utilizarse *Enterococcus* spp., bacterias coliformes (bacilos, oxidasas negativas, productoras de gases y con capacidad de fermentar lactosa), así como *E. coli*; estos organismos suelen ser indicativos de la presencia de condiciones insalubres o de una contaminación fecal persistente (Heredia et al., 2016a).

2.2.1 Contaminación presente en vegetales.

El grupo de referencia epidemiológica de la OMS estimó 33 millones de ETAs en 2010, 40% de los casos afectaron a infantes menores de 5 años. En la tabla 1, se muestran el

número de casos confirmados, hospitalizaciones y muertes causadas por los patógenos asociados a ETAs reportados por la red de vigilancia epidemiológica de la FDA, en Estados Unidos (Bintsis. 2017). Tan solo en este país, las enfermedades transmitidas por alimentos ocasionaron hasta 5,000 muertes y 300,000 hospitalizaciones al año, además de estar estrechamente ligado a la actividad económica registrando pérdidas de hasta casi \$7 billones de dólares por año (Jo y Park, 2019).

Tabla 1. Número de casos, hospitalización y muertes causadas por enfermedades de transmisión por alimentos, reportados en Estados Unidos por la FDASN (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) en 2015. Recuperado de Bintsis, 2017.

Patógeno	No. de casos	Hospitalización (%)	Muertes (%)
<i>Campylobacter</i> spp.	6309	1065 (17)	11 (0.2)
<i>Listeria</i> spp.	116	111 (96)	15 (12.9)
<i>Salmonella</i> spp.	7728	2074 (27)	32 (0.4)
<i>Shigella</i> spp.	2688	619 (23)	1 (0.0)
<i>Shiga</i> toxina producida por <i>Escherichia coli</i> O157:H7	463	180 (39)	3 (0.6)
<i>Shiga</i> toxina producida por <i>Escherichia coli</i> no O157:H7	796	126 (16)	1 (0.1)
<i>Vibrio</i> spp.	192	47 (24)	5 (2.6)
<i>Yersinia</i> spp.	139	37 (27)	1 (0.7)
Parásitos	1676	272 (16)	8 (0.5)
Total	20107	4531	77

La ingesta de productos frescos se ha incrementado en gran medida, por los beneficios que otorgan, así como el impacto de algunas campañas para la mejora de los hábitos alimenticios. El incremento de brotes de ETAs asociadas al consumo de productos frescos o vegetales ha sido reportado en todo el mundo. Actualmente es común escuchar que el consumo de frutas y vegetales es un factor de riesgo para la población, ya que pueden acarrear patógenos entéricos. Casos recientes de brotes relacionados al consumo de productos frescos han sido reportados que fueron provocados por *E. coli* (espinacas y lechuga), *Salmonella* Typhimurium y *S. Newport* (tomates y lechuga), *S. Thompson* (algunas hortalizas) y hepatitis A (cebolla).

2.3 Tomate.

Los tomates frescos son productos cotidianos en los hogares, restaurantes o servicios que proveen algún tipo de insumo alimentario a lo largo del mundo. Los nutrientes más comunes presentes en los tomates incluyen vitaminas, minerales, fibra, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos monoinsaturados, carotenoides y fitoesteroles (Abdullahi et al., 2016; Ramos-Bueno et al., 2017). Estos nutrientes desempeñan diversas funciones corporales, como la prevención del estreñimiento, la reducción de la presión arterial alta, la estimulación de la circulación sanguínea, el mantenimiento del perfil lipídico y de los fluidos corporales, la desintoxicación de las toxinas del cuerpo y el mantenimiento de la estructura ósea y la fuerza (Ali et al., 2021).

El tomate se consume de manera fresca o cruda y por lo tanto sin tratamientos para la eliminación de patógenos (Maitland et al., 2011). Los tomates también se utilizan en muchos productos alimenticios procesados, como salsas, sopas y pastas (Lenucci et al., 2006).

Hay muchos desafíos en la investigación y rastreo de brotes de enfermedades en los productos agrícolas, ya que llegan al final de su vida útil antes de detectar algún patógeno. Por lo que suele ser complejo poder identificar el punto de la contaminación a través de la cadena de producción (Lynch et al., 2009).

En Estados Unidos, los 38 brotes relacionados a consumo de tomates fresco desde 1990 hasta 2015, causaron alrededor de 4,000 enfermedades y 4 decesos. En 30 de estos se confirmó que el agente patógeno presente fue *Salmonella* spp. (Krug et al., 2020.).

2.4 Contaminación en el tomate.

Los productos frescos, como manzanas, uvas, lechugas, duraznos, pimientos, espinacas y tomates albergan grandes poblaciones bacterianas (King et al., 1991; Liao et al., 2001), tanto comensales como patógenas. Estas últimas pueden causar enfermedades gastrointestinales o extraintestinales. Dado que los productos frescos se consumen a menudo crudos, estos patógenos pueden causar brotes de enfermedades en la población que los consume, pero también puede representar un medio importante para introducir

nuevos linajes de bacterias comensales en el sistema gastrointestinal humano (Leff y Fierer, 2013).

Las diferentes condiciones de cultivo, los procedimientos de transporte y las condiciones de almacenamiento de vegetales influyen en la diversidad y composición de las comunidades microbianas asociadas a los productos de consumo fresco. Por otra parte, las prácticas agrícolas también tienen una influencia importante, aunque poco estudiada, en la composición de las comunidades microbianas asociadas a los productos (Leff y Fierer, 2013). Se ha encontrado que las comunidades bacterianas de los tomates están numéricamente dominadas por las gamma proteobacterias (Critzler et al., 2010).

2.4.1 *Salmonella*.

Salmonella spp. es el agente etiológico identificado más comúnmente en infecciones de productos frescos. En 2006 dos brotes de *Salmonella* relacionados con consumo de tomate en Estados Unidos representaron el 23.2% de los casos de *Salmonella* notificados (CDC, 2007). Estas bacterias llegan al suelo a través de agua de riego no tratada, contaminada con aguas residuales (Greene et al., 2008). Algunas de ellas se adhieren a la materia orgánica (como el estiércol, los residuos vegetales, etc.) manteniéndose en biopelículas. Estas bacterias migran tanto en el suelo como dentro de las plantas y llegan a los organelos, estos al ser ingeridos se propagan pudiendo infectar el intestino, hígado y bazo bovino, homóloga a la ruta de infección en humanos (Karmakar et al., 2019).

Salmonella es una bacteria mesofílica con crecimiento óptimo entre 25° y 43°C, aunque es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (4 a 10°C), es sensible a temperaturas superiores a 55°C. *Salmonella* crece activamente en el rango de pH de 3.6 a 9.5 y su pH óptimo es cercano a la neutralidad (D'Aoust et al, 2001).

Se encuentra ampliamente distribuido en animales, principalmente aves de corral y cerdos, en tanto que las fuentes ambientales incluyen agua, suelo, superficies de fábricas, superficies de cocina, así como puede estar presentes en insectos, heces animales, carne cruda, aves de corral crudas, pescados y mariscos crudos, entre otras (FDA, 2009).

Las serovariedades de *S. enterica* difieren en la especificidad del hospedero, así como en características clínicas y epidemiológicas. La serovariedad *Typhi* sólo infecta a humanos,

mientras que las serovariedades *Typhimurium* y *Enteritidis* infectan a una amplia variedad de hospederos, incluyendo humanos, roedores y aves de corral. También, las distintas serovariedades difieren en sus rutas de transmisión, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* infectan aves de corral; sin embargo, *S. typhimurium* es más probable que se transmita a humanos a través de carne de ave mientras que *S. enteritidis* lo hace a través de huevos de aves. Además, se observa variación geográfica en las principales serovariedades; *S. typhimurium* es la variedad más comúnmente asociada a salmonelosis en humanos en los países europeos y en Estados Unidos (Clavijo et al., 2006; García y Heredia, 2009).

2.4.2 *Escherichia coli*.

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa, Gram negativa que se encuentra presente en la microbiota intestinal de humanos y animales. Algunas cepas causan enfermedades desde leves hasta diarrea tipo colera y en algunos casos presentan complicaciones fatales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) (García y Heredia, 2009).

Las cepas patógenas se clasifican en al menos 6 grupos (patotipos) distintos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Todos los patotipos están asociados a la ingesta de alimentos, mientras que los primeros 4 son los que más comúnmente se ven involucrados (Feng y Weagant, 2002).

EPEC es una de las principales causas de la diarrea infantil humana, sobre todo en los países menos desarrollados. La infección por EPEC suele ser aguda y persistente. Estos patógenos colonizan el intestino delgado, induciendo la degeneración de las microvellosidades epiteliales y la adhesión a la célula huésped, originando lesiones que resultan en la reducción de la capacidad de absorción de la mucosa intestinal, como se muestra en la Figura 1 (Clarke et al., 2003; Nataro y Kaper, 1998).

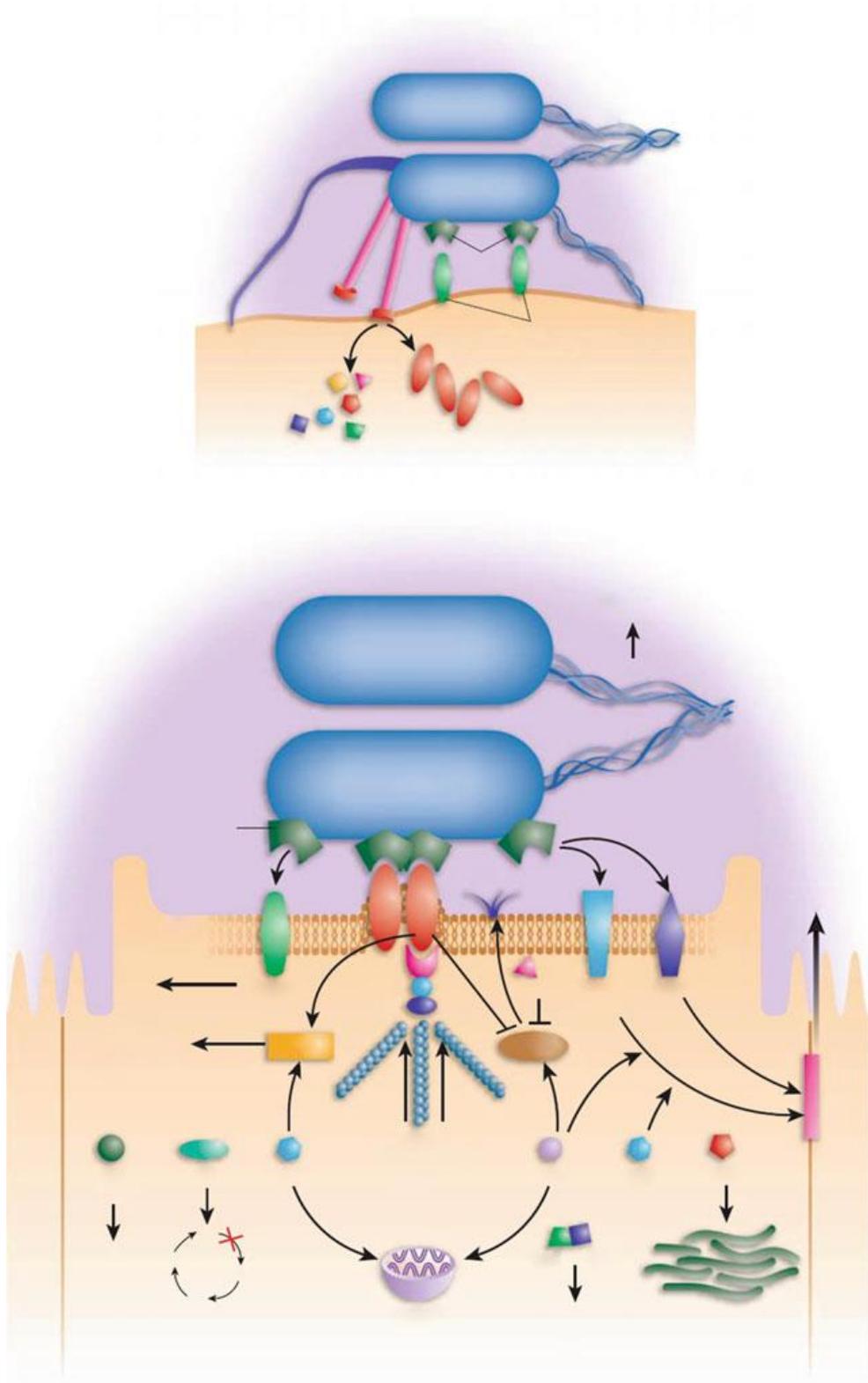


Figura 1. Modelo de adhesión a las células host de EPEC (Torres, 2006).

EHEC, también conocida como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), es responsable de infecciones humanas serias como diarrea, colitis hemorrágica y SUH. Esta cepa es conocida por la producción de toxina Shiga 1 (Stx 1) y/o toxina Shiga 2 (Stx 2). El periodo de incubación de la diarrea por EHEC suele ser de 3 a 4 días, aunque puede alargarse a 5 a 8 días o acortarse a 1 o 2 días. Los síntomas iniciales incluyen diarrea sin sangre y dolor abdominal tipo cólico, fiebre y vómitos. Después de 1 o 2 días, la diarrea aparece con sangre, el dolor abdominal aumenta y puede durar entre 4 y 10 días (Betts, 2000; Feng y Weagant, 2002).

EIEC consiste en 11 serogrupos conocidos y causa enfermedades en humanos sanos, con una dosis infectiva de 10^6 células o más. La infección se presenta como diarrea acuosa o disentería.

La ETEC es uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea en lactantes y viajeros. Las cepas pueden producir enterotoxinas, ya sea una toxina termolábil o una termoestable. La dosis infectiva está estimada en al menos 10^8 UFC (Nataro y Kaper, 1998).

EAEC, es considerada un enteropatógeno emergente, responsable de casos de diarrea aguda y crónica en niños y adultos a nivel mundial (Hebbelstrup Jensen et al., 2014). Está ha captado mayor atención debido a los brotes causados por una cepa híbrida hipervirulenta (Stx2-expressing EAEC) la cual ocasionó SUH (Navarro-Garcia, 2014). La adhesión al epitelio intestinal es facilitada por la fimbria y es el primer paso para la colonización bacteriana, como se muestra en la Figura 2, junto al mecanismo de patogénesis (Hicks et al., 1996).

Entre los síntomas más comunes reportados se encuentran: la diarrea acuosa algunas veces mucoide, con o sin sangre y dolor abdominal, náuseas, vomito y baja fiebre (Harrington et al., 2006).

Las cepas de EAEC son caracterizadas especialmente por su habilidad de formar un patron de ladrillos apilados o adherencia agregativa (AA) en las células HEp-2, la cual es mediada por la fimbria de adherencia agregativa (AAF) (Keper et al., 2004)

La transcripción de AAF y al menos otros 44 genes (incluyendo AAF/II biogénesis, dispersina y el sistema de secreción), están regulada por el Regulador de Adherencia

Agregativa (AggR) (Estrada-Garcia y Navarro-Garcia, 2012). Este es un activador transcripcional y regulador de la expresión de algunos factores de virulencia presentes en el cromosoma y en el plásmido pAA2 de la cepa EAEC 042 (Harrington et al., 2006).

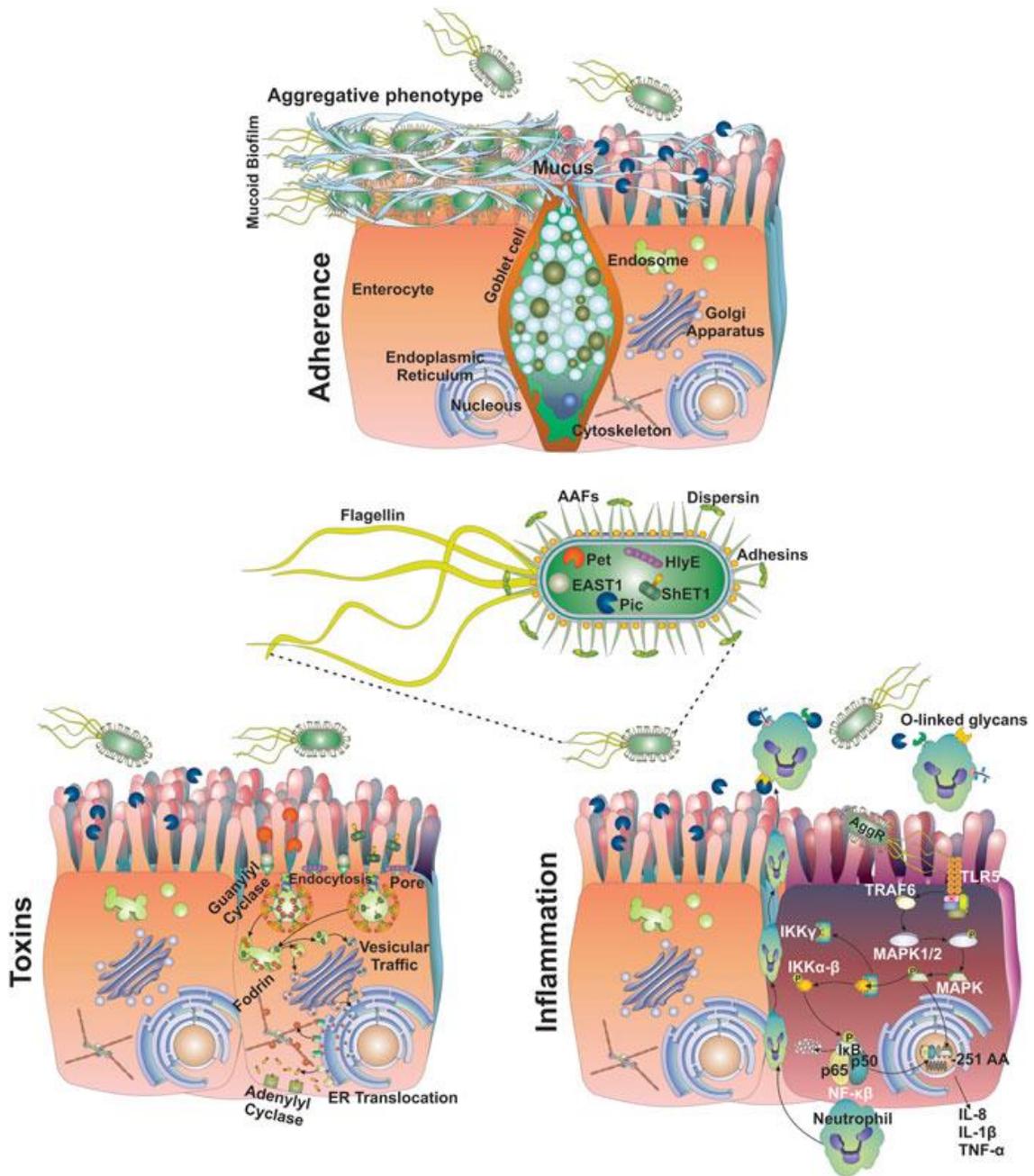


Figura 2. Modelo de 3 pasos de la patogénesis de EAEC. 1) adherencia abundante a la mucosa intestinal, 2) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas y 3) inducción de la respuesta inflamatoria (Elias W.P. y Navarro-Garcia., 2016).

DAEC, fue el último patotipo diarreico de *E.coli* que fue reconocido (Meza-Segura y Estrada-Garcia. 2016).

Las cepas de DAEC, están definidas principalmente por la presencia del patrón característico de adherencia difusa (AD) en las células HeLa y HEp-2 (Nataro et al., 1985). Este grupo está identificado en dos grupos basado en la expresión de adhesinas: Afa/Dr DAEC y AIDA-I DAEC, estas son responsables de los fenotipos de AD. Mientras que no todas las cepas de *E.coli* muestran la expresión de estas adhesinas (Scaletsky et al., 2002).

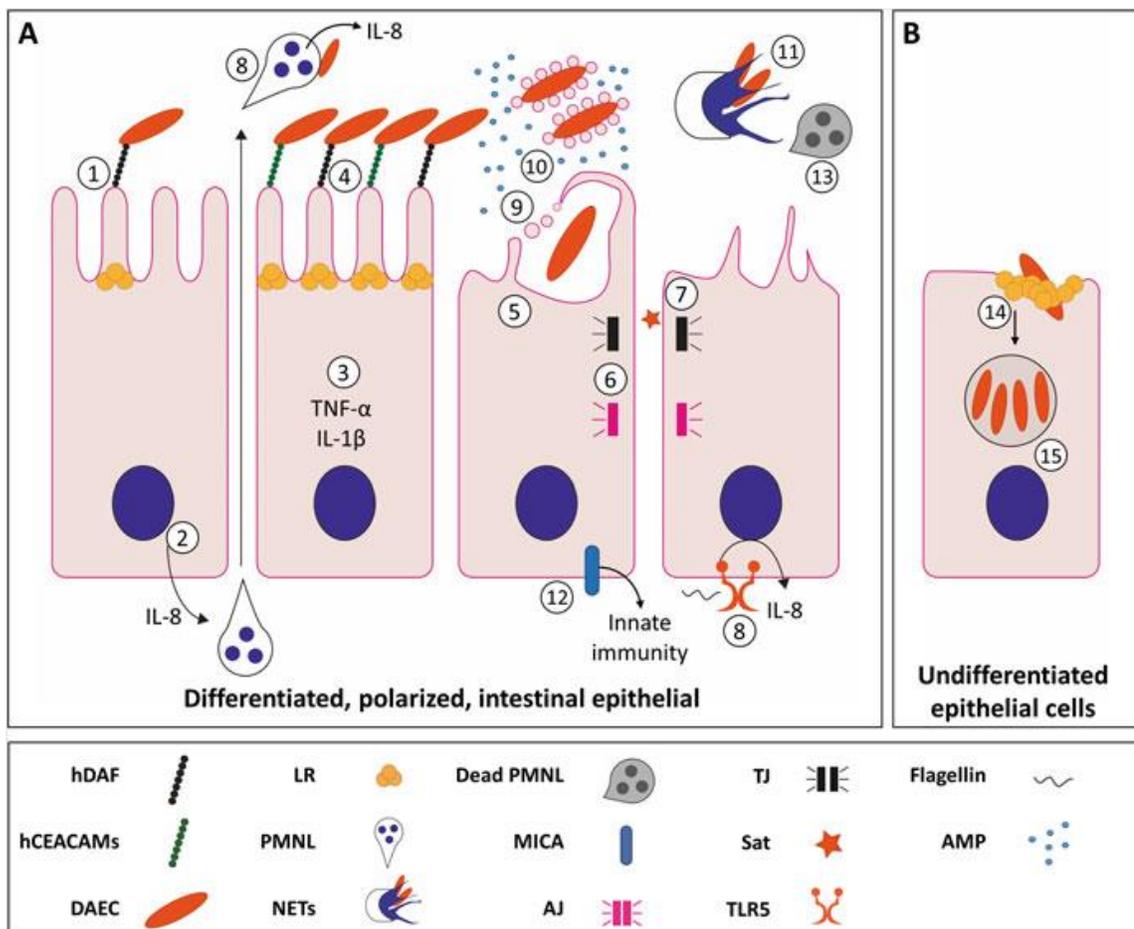


Figura 3. Infección por DAEC. a) los receptores hDAF y hCEACAMs en las superficie de las células epiteliales intestinales son reconocidas por las adhesinas Afa/Dr. 1) La infección por DAEC provoca la secreción de IL-8, lo que da lugar a la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNL), 2) La migración de PMNL induce TNF y -1βIL, 3) aumentan la expresión de hDAF y se induce la agrupación de hDAF y hCEACAMs acompañada de la movilización de las balsas lipídicas (LR), 4) la infección por DAEC causa daños en las células

epiteliales, incluida la pérdida de la estructura de las microvellosidades, 5) el deterioro de las actividades enzimáticas de las proteínas asociadas al borde funcional de los cepillos y la pérdida de las uniones adherentes (AJ), 6) la toxina auto transportadora secretada (Sat) induce daños en las células epiteliales y altera la integridad de las uniones estrechas (TJ), 7) los pili bacterianos de tipo 1 y la flagelina desencadenan una producción secundaria de IL-8 tras unirse a los PMNL y al TLR5, respectivamente, 8) por otro lado, las células enterocitarias provocan respuestas protectoras frente a la infección por DAEC, como la liberación de puntas de microvellosidades debajo de las bacterias adheridas, 9) la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP), 10) a liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), 11) y la expresión de moléculas MICA que pueden activar respuestas inmunitarias innatas contra la infección, 12) Sin embargo, la infección de PMNL con DAEC reduce su capacidad fagocítica e induce la apoptosis, b) Células epiteliales indiferenciadas son invadidas por DAEC. El proceso de internalización requiere la integridad de las balsas lipídicas y microtúbulos dinámicos inestables, 14). se han propuesto dos hipótesis. La primera sugiere que las subunidades de AfaD/DraD reconocen $\alpha 5\beta 1$ la integrina unida a la membrana y desencadenan la entrada de bacterias. 15) La segunda hipótesis propone una internalización mediada por AfaE/DraE a través de la interacción con hDAF o hCEACAM. Una vez dentro, DAEC forma inclusiones en las que son capaces de sobrevivir durante al menos 72 h (Meza-Segura y Navarro-García., 2016).

Las adhesinas Afa/Dr expresadas en la membrana externa en DAEC son las responsables del patrón de adherencia difusa y la adherencia al epitelio intestinal, como mecanismo de infección mostrado en la Figura 3. Este grupo engloba adhesinas fimbricas y afimbricas. Las primeras son apéndices filamentosos, mientras que las otras están compuestas por subunidades no-covalentes que presentan una apariencia similar a capsulas (Goldhar. 1996)

Debido a que las EPEC y DAEC Afa/Dr negativas puede producir patrones de adherencia en las células HEp-2 y HeLa, los ensayos de adhesión celular resultan inadecuados (Hernandes et al., 2009). Por tanto, se suelen utilizar ensayos moleculares dirigidos a los operones *afa* o *daa* para la identificación de estas cepas DAEC (Bilge et al., 1989)

En general, *E. coli* tiene características de crecimiento y supervivencia similares a otros microorganismos entéricos. Sobrevive a la refrigeración y congelación hasta -20°C.

Mientras que la *E. coli* O157:H7 tiene una resistencia inusual al calor y también tolera niveles de sal similares a los de otros patógenos típicos, algunas cepas tienen resistencia extrema al estrés ácido (Betts, 2000).

2.5 Resistencia a antibióticos.

Los antibióticos han sido los fármacos más eficaces que se han desarrollado hasta ahora para controlar enfermedades infecciosas. Tras su descubrimiento, el uso desmedido hizo evidente que las bacterias podían resistir. Durante varias décadas, este problema se ha solucionado con la introducción constante de nuevos antibióticos. El aumento de la resistencia a los antibióticos puede afectar a la salud humana al tener un efecto directo sobre la posibilidad de tratar las infecciones (Levy y Marshall, 2004). La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020), ha afirmado que la aparición y la desaparición de bacterias resistentes a los antibióticos en los hospitales significa que "*procedimientos médicos comunes que antes se daban por sentados*" podrían convertirse en un malestar médico.

La resistencia a los antibióticos en los patógenos bacterianos es un rasgo adaptativo que se adquiere tras el contacto con los antibióticos. Por definición, los patógenos son susceptibles (desde el punto de vista clínico) a un antibiótico recién lanzado al mercado y la resistencia se adquiere posteriormente. Las mutaciones que conducen a la resistencia a los antibióticos suelen producirse en tres tipos de genes: los que codifican los objetivos del antibiótico, los que codifican para sus transportadores y los que codifican para los reguladores que reprimen la expresión de los transportadores o de los elementos descontaminantes de los antibióticos (principalmente las enzimas modificadoras de los antibióticos codificadas por los cromosomas y las bombas de flujo múltiple) y aunque las mutaciones en estos elementos contribuyen a la adquisición de resistencia a los antibióticos, no son en sí mismas genes de resistencia a los antibióticos (Martínez, 2014).

En la transferencia horizontal de genes (HGT), los genes implicados proceden de bacterias ambientales o del medio ambiente, ya que no estaban en los patógenos humanos antes de usar antibióticos (Davies J, 2010).

La aparición de un fenotipo resistente a los agentes antimicrobianos depende de varios factores en la bacteria enfrentado un estrés; grado de expresión de la resistencia, capacidad

de un microorganismo para tolerar el mecanismo de resistencia, lugar de colonización inicial, etc. Cuando los determinantes de resistencia se encuentran en los plásmidos, se propagan rápidamente dentro del género e incluso en géneros bacterianos no relacionados. Cuando la resistencia está asociada a los genes de los cromosomas, los microorganismos resistentes se propagan más lentamente (Džidic et al., 2008; Vaičiuvėnas et al., 2005).

El uso de agentes antimicrobianos en los alimentos para animales está relacionado con la adquisición de resistencia bacteriana; *Salmonella* y *Campylobacter* adquieren resistencia a los antibióticos y transfieren estos genes a la microbiota intestinal humana, por ejemplo, a enterococos (De la Fuente-Salcido et al., 2015).

El uso extensivo de antimicrobianos por parte de los seres humanos y en la producción ganadera ha conducido a la resistencia a los antimicrobianos (AMR) entre cepas bacterianas. En algunas partes del mundo se ha informado de la presencia en alimentos de *Salmonella entérica* resistente a los medicamentos (Miko et al., 2005; Van et al., 2007). La alta resistencia de *E. coli* a la ciprofloxacina está asociada al uso de fluoroquinolonas en avicultura (Rice et al., 2003).

Los aislamientos de *Salmonella* resistente a fluoroquinolonas, quinolonas y cefalosporinas de espectro extendido son preocupantes porque estos antibióticos se usan para el tratamiento de enfermedades (Hur et al., 2012).

La resistencia a los antimicrobianos de *E. coli* se ha reportado en varios países, aunque las comparaciones pertinentes son difíciles. Hasta la fecha el panorama mundial indica que la susceptibilidad de *E. coli* a los antimicrobianos sigue siendo alta. En particular, las β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) o las cefalosporinas sobre-expresadas (AmpC). (Dahmen et al., 2013; Freitag et al., 2017; Su et al., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN.

La aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos merece la atención inmediata de los profesionales de la salud y los líderes políticos por igual. La naturaleza compleja y multifactorial de la resistencia a los antimicrobianos no se comprende bien, especialmente en términos de interacción entre humanos, animales y el medio ambiente.

Actualmente, los patógenos bacterianos son cada vez más propensos a resistir los medicamentos usados tradicionalmente para combatirlos, por su capacidad de adaptación a los ambientes desfavorables por la adquisición de elementos genéticos móviles (como transposones o plásmidos) y otros mecanismos de transferencia de genes.

Se ha considerado que las bacterias presentes en el ambiente agrícola son reservorios importantes de genes de resistencia a antibióticos. La presencia bacteriana en ambientes que favorecen la formación de biopelículas facilita la adherencia de comunidades microbianas, las cuales podrían incluir enteropatógenos de importancia médica como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.

La vigilancia efectiva en el medio ambiente amerita conocer la realidad del terreno y desarrollar estrategias y políticas para salvaguardar la salud pública. En concordancia con lo anterior, este estudio se realizó para analizar e identificar genes de resistencia a antibióticos presentes en enteropatógenos bacterianos comunes en la corteza del tomate obtenidos en puntos de venta.

4. HIPÓTESIS

Los tomates obtenidos en punto de venta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León tienen la presencia de las bacterias enteropatógenas *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos.

5. OBJETIVO GENERAL

Rastrear enteropatógenos tales como *Salmonella* spp. y patotipos de *E. coli* que presenten resistencia a antibióticos en muestras de tomate (*Solanum lycopersicum*) recolectadas en los puntos de venta dentro del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

5.1 Objetivos específicos

1. Aislar enteropatógenos, *Salmonella* spp. y patotipos de *E.coli* presentes en el tomate.
2. Determinación de los microorganismos indicadores de calidad microbiológica (enterococos y coliformes totales).
3. Confirmación por PCR punto final de las cepas aisladas.
4. Determinar la resistencia fenotípica a antibióticos en las bacterias aisladas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Como controles positivos se utilizaron las cepas, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 (EHEC), *E. coli* O111: NM ATCC 43887 (EPEC), *E. coli* O111: NM ATCC 35401 (ETEC), *E. coli* O78:H11 y *E. coli* 042 (EAEC); y como control no patógeno *E. coli* ATCC 25922. Las cepas conservadas a -80°C, se inocularon en agar infusión cerebro corazón (ICC) y se crecieron a 37°C durante 24 h, posteriormente se conservaron a 5°C hasta su uso.

6.1 Recolección de muestras.

Se recolectaron 100 muestras de tomate, siguiendo el criterio estadístico en el cual, para un nivel de confianza del 95% y una desviación media de 1.96 y un margen de error del 5% las muestras se tomaran aproximadamente 385 en poblaciones de 450,000 a 4,500,000 y en el área metropolitana de Monterrey la población se encuentra alrededor de 5,785,000 (INEGI, 2023) se realizó una relación y en nuestro estudio se colectaron un total de 500 tomates, esto se utilizó para determinar la cantidad en los diferentes puntos de venta. Cada muestra estuvo compuesta por 5 unidades de tomate para cumplir con el criterio de 500 unidades. Las muestras compuestas fueron colocadas en bolsa estériles Whirl-Park (Nasco, Fort Arkinson, WI), y se transportaron y almacenaron a 4 °C hasta el proceso de los análisis microbiológicos, los cuales se realizaron durante las primeras 48 h desde la colecta de las muestras.

6.1.1 Procesamiento de las muestras

Las bolsas fueron llenadas con 500 ml de agua peptonada al 0.15% estéril con 5 tomates en cada una con una relación 1:10 en peso. La corteza de los tomates se enjuaga por agitación durante 90 s a través de la bolsa, una primera agitación de 30 s, un masaje en la superficie por 30 s y, por último, 30 s de agitación final, según el método descrito por Heredia *et al.* (2016).

6.2 Búsqueda de bacterias indicadoras de contaminación.

Se realizó la búsqueda de bacterias indicadoras de contaminación fecal (coliformes totales y *Enterococcus* spp.) en las muestras de tomate, por el método de filtración por membranas descrito por Heredia *et al.* (2016). A los filtrados se le realizaron diluciones seriadas y fueron inoculadas en agar de Bilis y Rojo Violeta (RVBA; Difco, BD Dioxon),

para el crecimiento de *E. coli* y coliformes totales las cuales se incubaron a 45°C por 24 h. A la par, placas Petri con agar *Streptococcus* KF (Neogen) fueron inoculadas, las cuales se incubaron a 37°C por 48 h, para el crecimiento de *Enterococcus* spp. siguiendo el método descrito por Merino-Mascorro *et al.*, 2018. Posteriormente se realizó el conteo por UFC/ml según lo estipulado por la NOM-092-SSA1-1994.

6.3 Detección de bacterias patógenas.

Las muestras de 500 ml fueron filtradas según el método de filtración por membranas descrito por Heredia *et al.* (2016). Las membranas se añadieron a bolsas estériles (Nasco, Fort Arkinson, WI) con 90 ml de medio de enriquecimiento universal (Difco, BD, Sparks, MD) y se incubaron a 37°C durante 24 h para la detección de *Salmonella* spp. y patotipos *E. coli* (Bailey y Cox., 1992; Kim y Bhunia., 2008; Zhao y Boyle., 2001). Posteriormente se tomó un inóculo de 1:10, 100 µl de cada muestra y se utilizó un caldo de enriquecimiento para la detección de *Salmonella* spp, Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (BD Rappaport Vassiliadis Broth; Difco, BD) incubado a 41.5 ± 0.5 °C durante 18 a 48 h en un baño de calentamiento, para después subcultivarlo en medios selectivos.

Se prepararon placas con medios de cultivo selectivos diferenciales para la identificación del crecimiento bacteriano, se utilizaron el agar MacConkey con sorbitol (CT-SMAC, CondaLab) como medio selectivo diferencial de *E. coli* 0157:H7, el agar cromogénico para *E. coli* Rapid'*E. coli* 2 (BIO-RAD), para la detección y recuperación de los patotipos de *E. coli* y la utilización de agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD; Difco, BD) y el agar bismuto sulfito (BS; Difco, BD) para *Salmonella*. Todas las placas fueron incubadas por 20 h a 37°C.

6.3.1 Aislamiento de enteropatógenos

Se tomó una asada de las colonias típicas (Tabla 2) y se sembraron en placas Petri con agar infusión cerebro y corazón (ICC, BD Difco) las positivas a *Salmonella* spp. y en agar Luria Bertani (LB, Lennox MCD LAB) las positivas a *E. coli*, incubado durante 24 h a 37°C, y se almacenaron en caldo ICC en caso de *Salmonella* y caldo LB en caso de *E. coli* con glicerol al 20% a -20°C para su posterior estudio.

Tabla 2. Características para la sospecha de microorganismos (*E. coli* y *Salmonella* spp.).

Microorganismo	Agar	Colonias Características
<i>E. coli</i> O157:H7	CT-SMAC Agar	Colonias transparentes con aspecto marrón pálido y diámetro de ~1 mm.
Patotipos <i>E. coli</i>	RAPID' <i>E.coli</i> 2 Agar	Colonias de color violeta a rosa
<i>Salmonella</i> spp.	BS Agar	Colonias de negro a gris verdoso puede tener brillo metálico (Typhimurium), colonias negras con brillo metálico (Typhi)
	XLD Agar	Colonias rojo claro con centro negro.

6.3.2 Extracción ADN de cultivo bacteriano.

Este procedimiento se realizó tomando las colonias presuntivas de *Salmonella* o *E. coli* crecidas en agar ICC o LB respectivamente. Las colonias se rasparon con una punta de pipeta; esta se suspendió en una solución tampón de PBS estéril (1.5 ml) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se trató con un buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 1M pH 7.4, EDTA 0.2M, NaCl 1M y Triton-X100 2%. La suspensión se homogenizó con ayuda de vórtex (alrededor de 15 s), luego se puso en baño maría a 100 °C por 15 min, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante.

6.4 PCR de punto final.

La presencia de enteropatógenos se confirmó por PCR con cebadores dirigidos para la amplificación de los genes que codifican para factores de virulencia para *E. coli* y *Salmonella* spp. (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de virulencia de interés en *E.coli* y *Salmonella*

<i>E. coli</i> entero hemorrágica		<i>E. coli</i> entero patogénica		<i>E. coli</i> entero toxigénica		<i>E. coli</i> entero agregativa	<i>Salmonella</i>
<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>lt</i>	<i>stII</i>	<i>aafII</i>	<i>invA</i>

La mezcla de PCR se realizó en una campana de flujo laminar previamente expuesta a luz UV. En microtubos de 200 µl en hielo, se añadían 0.4 µl de cada uno de los cebadores forward y reverse, posteriormente se adicionaba 10 µl de Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 1 µl de dNTPs Nucleotide Mix a 10 mM, 0.25 µl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/µL) y finalmente se añaderieron 5 µl de la muestra de DNA para resultar en un volumen total de 50 µl por muestra. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 4, utilizando un termociclador Thermo Fischer Scientific (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler).

Tabla 4. Temperaturas de reacción para PCR punto final.

Condiciones de reacción.			
Paso	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2	1
Desnaturalización	95°C	1	35
Alineamiento	60°C	1	
Extensión	72°C	1	
Extensión Final	72°C	5	1
Soak	4°C	∞	1
Tiempo total	-	95	-

A continuación, el producto amplificado para cada gen se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X, al cual se le agregaron 5 µl de GelRed® Nucleic Acid Stain para la tinción del gel, a continuación, se corrieron las muestras en una cámara de electroforesis (Cell GT BIO-RAD) a 100 V durante aproximadamente 1 h, para su posterior visualización en un fotodocumentador de imágenes (Gel Logic 200, Kodak, Rochester, NY, USA). En la Tabla 5, se muestran los cebadores para la determinación de la presencia de bacterias enteropatógenas en las muestras analizadas.

A continuación, se muestran los cebadores utilizados para la determinación de los patotipos de *E. coli*, basándonos en brotes mayormente reportados para el tomate las cuales son los patotipos: ETEC, EPEC, EAEC, STEC y EHEC, usando los genes ilustrados en la siguiente Tabla 3.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la determinación de la presencia de bacterias patógenas en el tomate.

<i>E. coli</i> entero hemorrágica (STEC)	<i>stx1</i>	F	5' CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG 3'	348 pb
		R	5' CACCAGACAATGTAACCGCTG 3'	
	<i>stx2</i>	F	5' ATCCTATTCCC GGGAGTTTACG 3'	584 pb
		R	5' GCGTCATCGTATACACAGGAGC 3'	
<i>E. coli</i> entero patogénica (EPEC)	<i>eae</i>	F	5' TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT 3'	482 pb
		R	5' GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG 3'	
	<i>bfp</i>	F	5' GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT 3'	300 pb
		R	5' GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT 3'	
<i>E. coli</i> entero toxigénica (ETEC)	<i>lt</i>	F	5' GCACACGGAGCTCCTCAGTC 3'	218 pb
		R	5' TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT 3'	
	<i>stII</i>	F	5' AAAGGAGAGCTTCGTCACATTTT 3'	129 pb
		R	5' AATGTCCGTCTTGCGTTAGGAC 3'	
<i>E. coli</i> entero agregativa (EAEC)	<i>aafII</i>	F	5' CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG 3'	378 pb
		R	5' ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC 3'	
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	F	5' TATCGCCACGTTCCGGGCAA '3	275 pb
		R	5' TCGCACCGTCAAAGGAACC '3	

6.5 Identificación de resistencia a antibióticos en las cepas aisladas.

Se realizó una prueba de dilución en placa, como un ensayo preliminar para el posterior estudio de la resistencia a antibióticos, por lo cual se realizó una preselección de las colonias de estudio analizando diversos antibióticos para analizar la resistencia de los aislados, siendo estos utilizando los criterios del manual M07–A09 del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2023), utilizando los antibióticos enlistados en la Tabla 6.

Tabla 6. Antibióticos utilizados para prueba de susceptibilidad a antibióticos.

Antibióticos	CMI (µg/ml)	Abreviación
Ciprofloxacina	5	CIP
Gentamicina	10	GE
Ampicilina	10	AMP
Kanamicina	30	KM
Espectinomicina	10	SCP
Eritromicina	15	E
Clindamicina	5	CN
Tetraciclina	30	TE
Rifampicina	5	RIF
Trimetoprima	5	TMP

Se utilizó la técnica de Kirby-Bauer de difusión en disco reportada en el manual M02–A11 del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2023).

Los antibióticos que se utilizaron son los más comúnmente usados para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas: ácido nalidíxico (NA, 30µg), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT, 1.25/23.75µg), tetraciclina (TE, 30µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), ampicilina (AMP, 10µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg) y cloranfenicol (C, 30µg) todos adquiridos de la compañía Oxoid (Cambridge, UK).

6.6 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis de medias para la comparación entre los controles y los genes analizados, por lo cual se utilizó el programa IBM SPSS Statistics, Windows, Version 20.0 (IBM Corp., Armonic, NY, EUA) con un valor de confianza del 95%.

7. RESULTADOS.

7.1 Indicadores de contaminación microbiológica.

Se analizó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en los tomates recolectados (Tabla 7, Figura 4). Obteniendo un rango entre 0.44 a 2.44 log UFC/g y 0.82 a 2.56 log UFC/g de indicadores de calidad microbiológica, valores para la presencia de coliformes fecales y enterococos respectivamente, esto por g de muestra recolectada de los tomates que fueron previamente pesados y estandarizados en un rango de peso de 250 g.

Tabla 7. Promedio de indicadores en las muestras de tomate.

Indicadores de contaminación fecal en tomates recolectados en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.			
UFC/g		Log UFC/g	
Coliformes t.	Enterococos	Coliformes t.	Enterococos
18384.25	14492.31	2.44 ± 1.99	2.56 ± 1.74

El porcentaje de los indicadores de contaminación fecal fue del 70% en el caso de coliformes totales y el 78% para enterococos en las muestras analizadas (n=100). Esto subdividido por regiones específicas del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (Tabla 8, Figura 4 y 5), la cual muestra una que dentro de los rangos de contaminación el municipio de Escobedo (ES), se encuentra con una incidencia mayor en la cantidad de log de Enterococos a comparación de las otras zonas de estudio, mientras el municipio de San Pedro muestra una mayor concentración de coliformes totales.

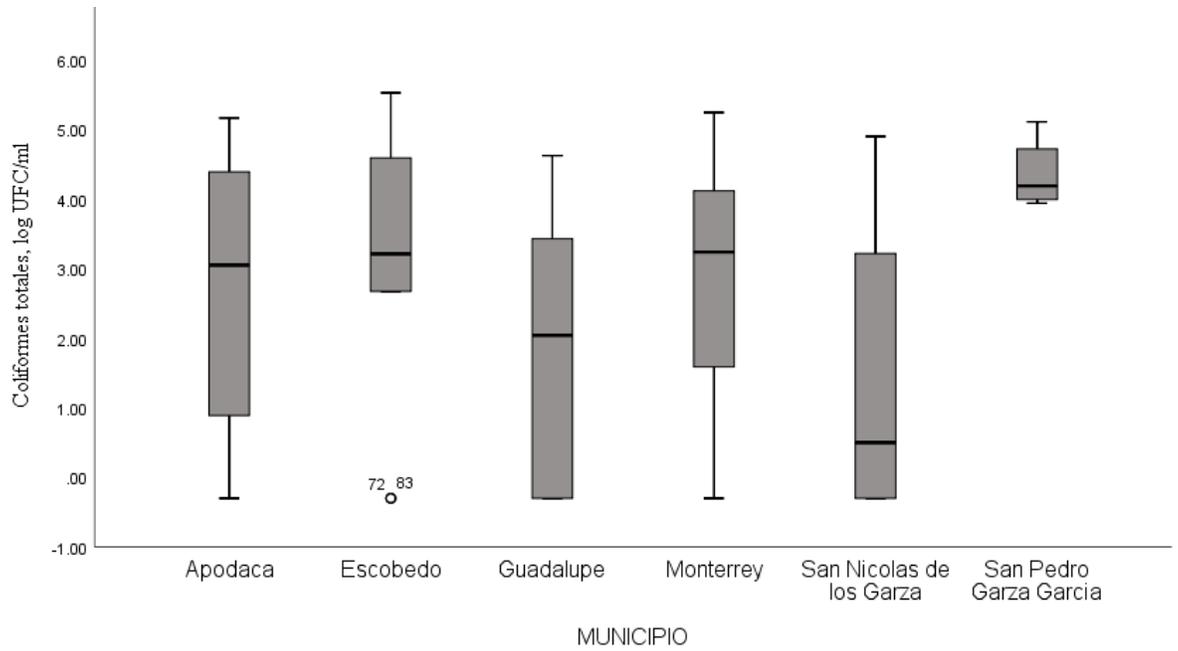


Figura 4. Presencia de coliforme totales (log UFC/ml) en muestras de tomate adquiridas en punto de venta en municipios del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (n=100).

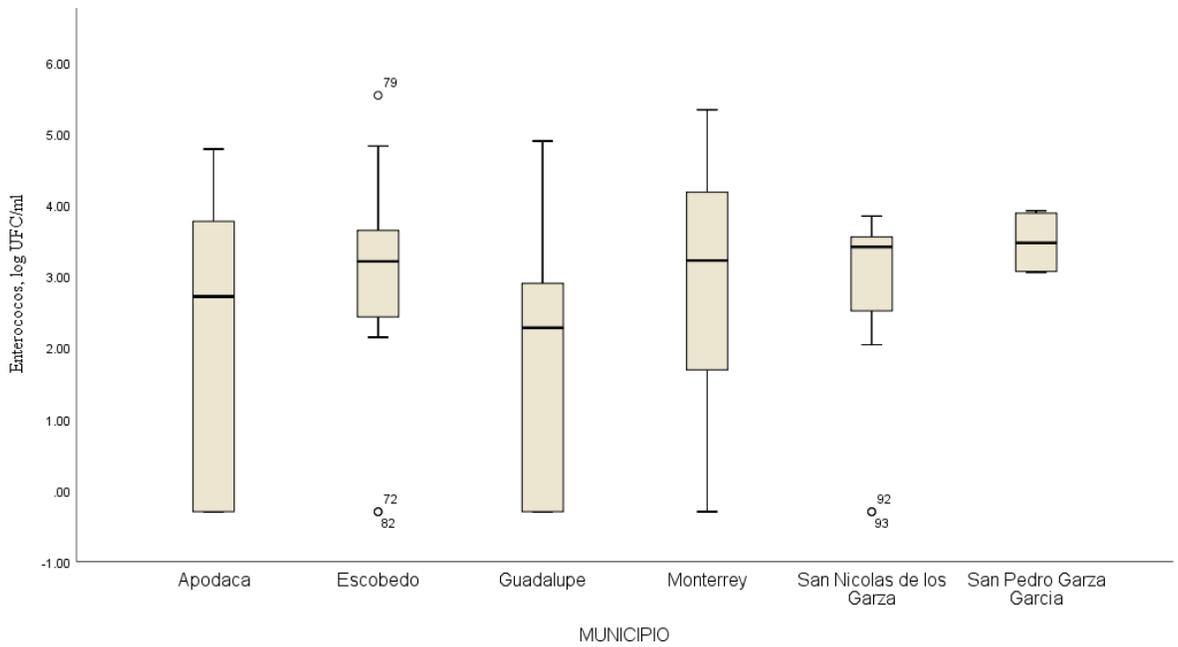


Figura 5. Presencia de enterococos en muestras de tomate adquiridas en punto de venta en los municipios del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (n=100).

Tabla 8. Indicadores de contaminación fecal en muestras de tomate adquiridas en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

Indicadores microbiológicos en el área metropolitana de Nuevo León.					
Muestra	Municipio	UFC/g		Log UFC/g	
		Coliformes	Enterococos	Coliformes t.	Enterococos
1	M	13452.58	22179.68	4.13 ± 1.81	4.35 ± 1.76
2	GP	3905.26	7168.42	3.59 ± 1.95	3.86 ± 1.81
3	AP	25442.11	6391.58	4.41 ± 2.04	3.81 ± 1.90
4	ES	39465.00	32019.29	4.6 ± 1.98	4.51 ± 1.65
5	SN	10914.17	2574.17	4.04 ± 2.08	3.41 ± 1.48
6	SP	42275.00	4437.50	4.63 ± 0.53	3.65 ± 0.47

7.2 Presencia de bacterias enteropatógenas en las muestras.

La evaluación de la presencia de bacterias enteropatógenas presentes en tomate, así como su resistencia a antibióticos, se realizó recolectando 100 muestras compuestas dentro del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México (Tabla 9). Los muestreos se realizaron entre mayo a noviembre de 2022, y se realizó la distribución estadística según los datos de densidad poblacional obtenidos por el INEGI, 2022. Los muestreos se realizaron en las fechas próximas a la temporada de cosecha del fruto.

Tabla 9. Distribución de las muestras colectadas (n=100).

Municipio	Supermercado	Mercados	Otros (Fruterías, etc.)	Total
Monterrey	13	9	2	32
Apodaca	6	7	1	19
Guadalupe	5	2	7	19
General Escobedo	5	4	1	14
San Nicolás de los Garza	3	4	2	12
San Pedro Garza García	1	2	1	4
Población total	68	15	17	100

Detectamos la presencia de *E. coli* en un total de 42 muestras (42%), mientras que no detectamos *Salmonella* (0%) en ninguna de las muestras procesadas (n=100).

Durante la aislamiento y determinación de las cepas presuntivas de *E. coli*, se verificó en el agar CT-SMAC que las colonias características para el grupo EHEC sorbitol negativas,

es decir incoloras y sorbitol negativas y en RAPID' *E. coli* 2 las cepas positivas presentaron una coloración morada como es característico (Figura 6).



Figura 6. Crecimiento de *E. coli* en agares selectivos diferenciales A) RAPID' *E. coli* 2 y B) CT-SMAC.

7.3 Confirmación de patotipos de *E. coli* mediante PCR punto final.

De las 100 muestra de tomate recolectadas se obtuvieron 61 muestras presuntivas a *E. coli*, las cuales se analizaron para la determinación de la presencia de los patotipos. Se encontró que el 3.28 % (2/61) de las muestras fueron positivas para los genes buscados para la confirmación de la presencia de alguno de los patotipos (*aafII*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *eae* y *bfp*). perteneciendo a *E. coli* productoras de Shiga toxina o STEC no-O157 como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Muestras positivas a los patotipos de *E. coli*.

Cepa	Genes	Patotipo	Municipio
M003	<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> -	STEC	Monterrey
SP004	<i>stx1</i> +, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> -	STEC	San Pedro

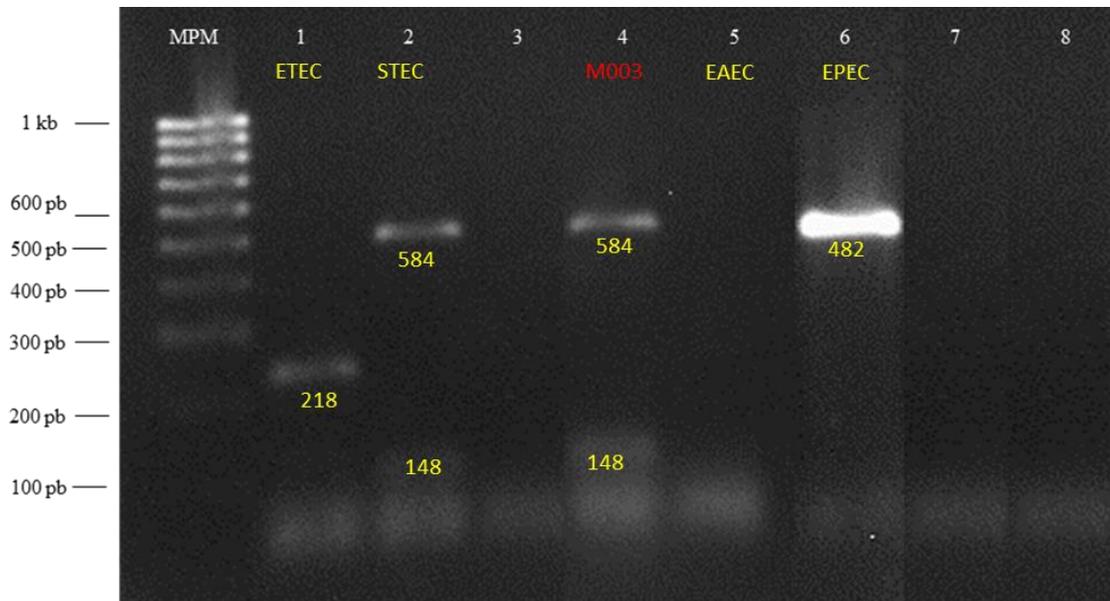


Figura 7. Confirmación de *E.coli* STEC presente en una cepa aislada del tomate.

En la Figura 7, se muestra la confirmación de las cepas positivas a patotipos de *E.coli*; donde MPM (marcador de peso molecular); 1) Control para gen *lt* *E. coli* O78:H11 (ETEC), 2) Control para *stx1,2*, *E. coli* O157:H7 (EHEC), 3,7) *E. coli* aislada M010, 4,8) *E. coli* aislada M003, 5) Control gen *aafII* *E. coli* O111 (EPEC), 6) Control gen *eae* *E. coli* O3.K2A,2B(L):H2 (EAEC).

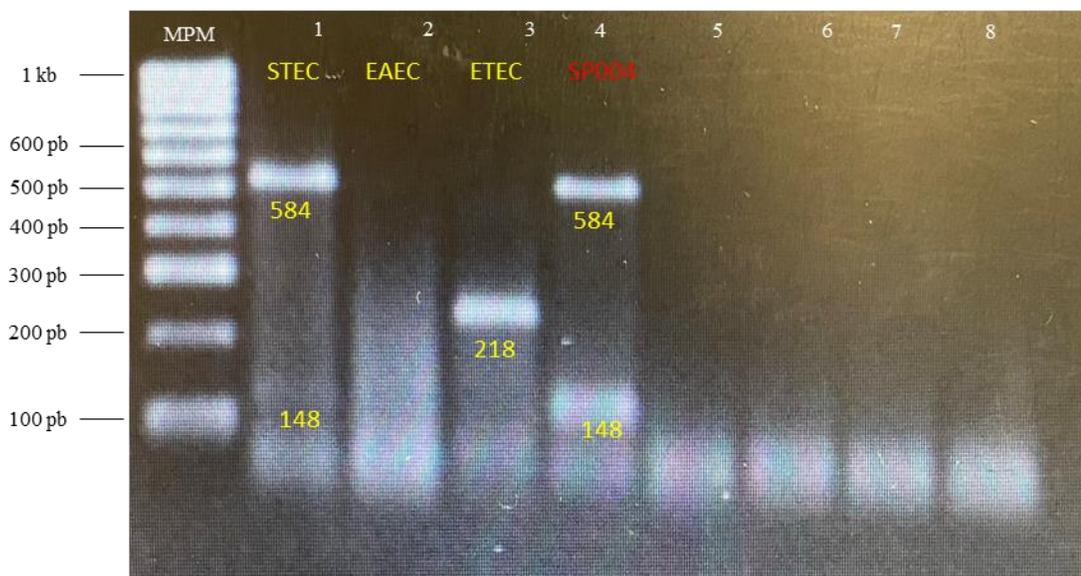


Figura 8. Confirmación de *E.coli* STEC presente en una cepa aislada del tomate.

Según lo mostrado en la Figura 8, el MPM (marcador de peso molecular); 1) Control para *stx1,2*, *E. coli* O157:H7 (EHEC), 2) Control gen *eae* *E. coli* O3.K2A,2B(L):H2 (EAEC), 3) Control para gen *lt* *E. coli* O78:H11 (ETEC) ,4) *E. coli* aislada SP004, 5 a 8) *E. coli* aisladas SP003, SP002, SN012, SN010.

Así mismo se realizó el estudio de los indicadores de calidad microbiológica destacando la concentración de las muestras positivas para los patotipos encontrados siendo la muestra M009 y SP004, se puede observar que estas tienen concentraciones por encima del promedio, principalmente la muestra M009.

Al revisar los indicadores de contaminación fecal en las muestras donde se detectó *E. coli* patotipo STEC, se observó que las cuentas de estos estaban por encima del promedio (Tabla 11).

Tabla 11. Indicadores de contaminación fecal.

Indicadores de contaminación fecal en las muestras positivas para <i>E. coli</i> patotipos.			
Muestra	Municipio	Log UFC/g	
		Coliformes t.	Enterococos
M009	M	4.69	5.21
SP004	SP	3.94	3.92

7.4 Determinación del perfil de resistencia a antibióticos.

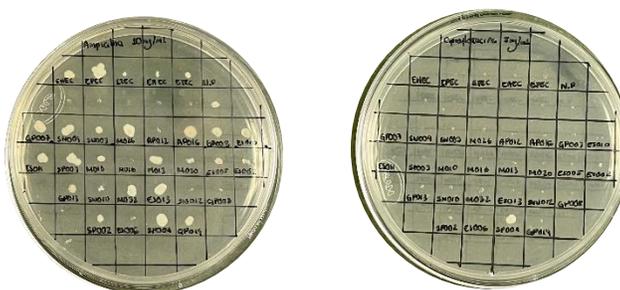


Figura 9. Muestras resistentes de *E. coli* a cada antibiótico.

De las 61 colonias presuntivas de *E. coli* enteropatógenas mostraron al menos una resistencia y se determinó un perfil de resistencia a antibióticos utilizando los principales para combatir las infecciones entéricas, para hacer un estudio más conclusivo se realizó un primer screening en el cual todas las cepas de *E. coli* recuperadas se sometieron a las concentraciones indicadas por el manual de la Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2023) para la determinación de microorganismos resistentes como se muestra en la Figura 9.

En la Figura 10, se muestra los resultados del cribado en los cual se muestran que la resistencia a eritromicina (E) con el 89.71% y a espectinomicina (SCP) con el 86.76 % fueron las más frecuentes. Mientras que los antibióticos que mostraron menos resistencia fueron ciprofloxacina (CIP) y gentamicina (CN) con el 1.47% y 5.88% respectivamente.

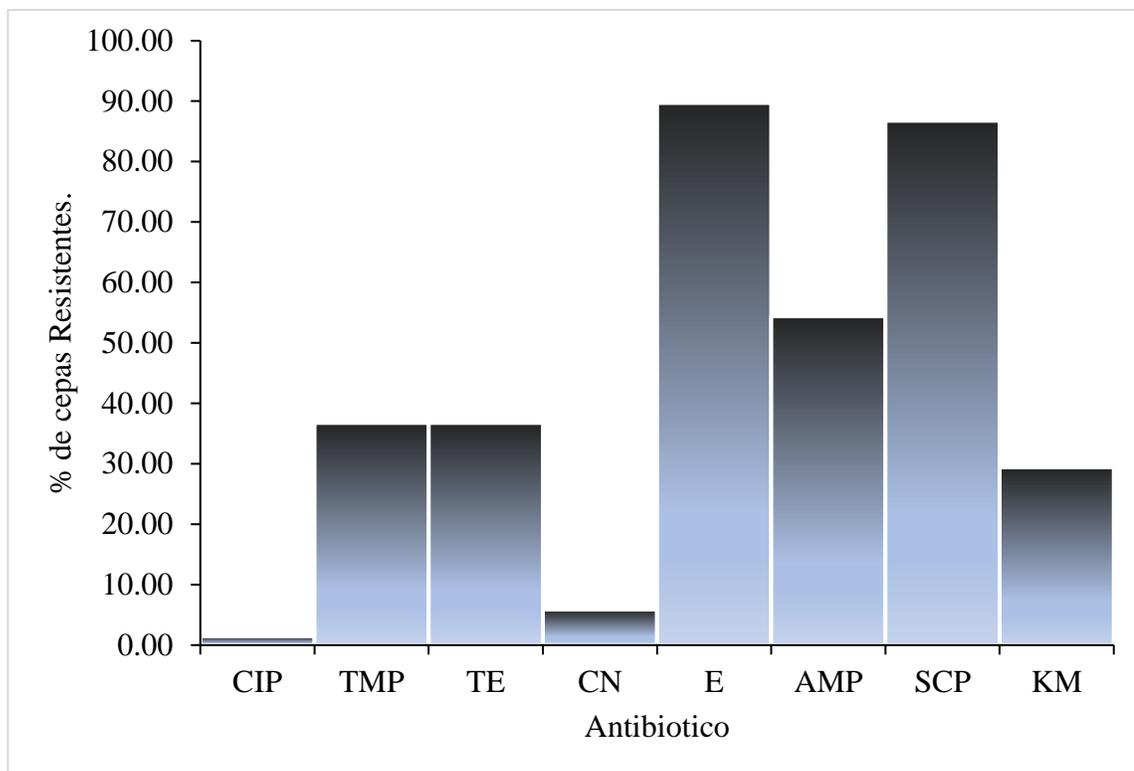


Figura 10. Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas de *E. coli*.

Tabla 12. Perfil de resistencia a antibióticos por aislados de *E. coli* de muestras de tomate (n=61).

Antibiótico	Resistencia	
	#aislamientos	%
CIP ¹	1	1.47
TMP ²	25	36.76
TE ³	25	36.76
CN ⁴	4	5.88
E ⁵	61	89.71
AMP ⁶	37	54.41
SCP ⁷	59	86.76
KM ⁸	20	29.41

En la Tabla 12, se muestra el porcentaje desglosado de todas las muestras analizadas. En la Figura 11, se desglosa el perfil de resistencia de las cepas a los antibióticos con su relación por municipio, destacando que los aislamientos en Monterrey, Apodaca y San Pedro Garza, los aislamientos tuvieron resistencia a más antibióticos.

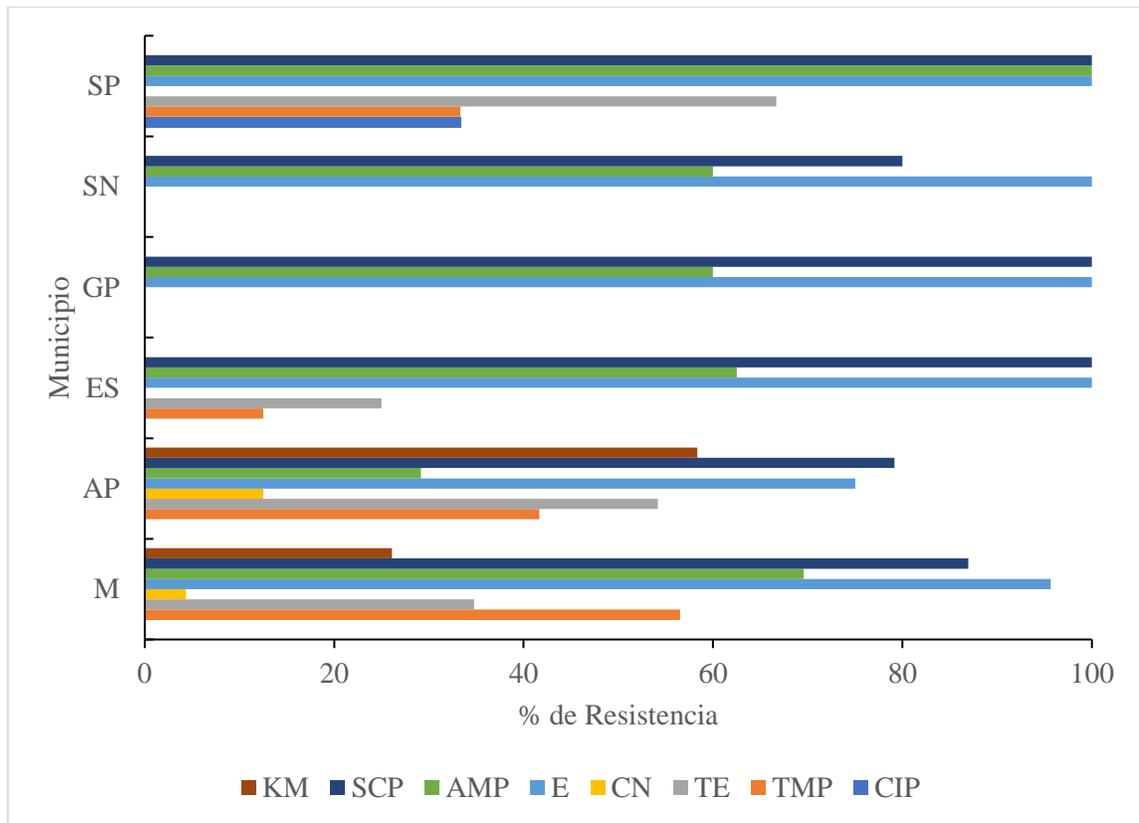


Figura 11. Resistencia a antibióticos en las cepas aisladas por municipio (n=61).

Durante el primer filtro para la selección de las cepas, se seleccionaron las cepas multirresistentes, las cuales se decidieron a partir de 3 o más resistencias presentes en el estudio preliminar y se tomaron para realizar el perfil de resistencia utilizando sensidiscos y la metodología estándar para la determinación de la difusión en disco utilizando la técnica de Kirby-Bauer reportada por el manual del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2023) en la tabla 13, se muestran los criterios para la evaluación para las cepas (n=17) usando las reportadas en el suplemento M100-Ed33 (2023) se tomaron las muestras positivas a los 2 patotipos de *E. coli* y 15 cepas de *E. coli* no patógenas.

Tabla 13. Zonas de inhibición estándar para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, CLSI (2023).

Antibiótico	Concentración (µg)	Zona de inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
AMP	10	>17	14 - 16	<13
SXT	1.25/23.75	>16	11 - 15	<10
TE	30	>15	12 - 14	<11
C	30	>18	13 - 17	<12
NA	30	>19	14 - 18	<13
CN	10	>15	13 - 14	<12
CAZ	30	>21	18 - 20	<17
CTX	30	>26	23 - 25	<22
CIP	5	>26	22 - 25	<21

Para analizar los perfiles de resistencia, elegimos los 2 patotipos de *E. coli* encontrados y 15 cepas de *E. coli* no patógenas, las cuales mostraron las mayores resistencias en el ensayo inicial de resistencia y se analizaron por la técnica de difusión en disco obtenido los resultados mostrados en la Tabla 14. La cepa control fue *E. coli* ATCC 25922. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los descritos en las tablas suplementarias del Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2023) en el anexo M100–Ed33 (2023).

Tabla 14. Zonas de inhibición y sensibilidad a antibióticos en aislados de *E. coli* por difusión en disco (n=17).

Cepas	Patotipo	OD ₆₀₀	Promedio de inhibición (mm)								
			NA	CAZ	CIP	CN	CTX	TE	AMP	C	SXT
M009	STEC	0.085	18±0.47 (S)	26±0.47 (S)	35±0.47 (S)	12±2.05 (I)	29±0.62 (S)	SI (R)	SI (R)	SI (R)	SI (R)
SP004	STEC	0.09	SI (R)	14±2.25 (R)	10±0.55 (R)	21±0.82 (S)	7 (R)	8±0.82 (R)	SI (R)	7 (R)	SI (R)
M025	NP	0.086	26 (S)	32 (S)	37 (S)	19 (S)	33 (S)	18 (S)	20 (S)	25 (S)	26 (S)
ES013	NP	0.1	20 (S)	21 (S)	24 (I)	14 (I)	25 (I)	17 (S)	13 (R)	20 (S)	17 (S)
ES005	NP	0.097	20 (S)	11 (R)	24 (I)	17 (S)	13 (R)	25 (S)	25 (S)	23 (S)	SI (R)
AP019	NP	0.085	12 (R)	30 (S)	31 (S)	21 (S)	10 (R)	25 (S)	9 (R)	22 (S)	8 (R)
AP017	NP	0.087	10 (R)	26 (S)	35 (S)	SI (R)	17 (R)	17 (S)	SI (R)	16 (I)	10 (R)
GP007	NP	0.107	22 (S)	19 (I)	35 (S)	20 (S)	18 (R)	21 (S)	11 (R)	23 (S)	27 (S)
SN009	NP	0.1	8 (R)	23 (S)	36 (S)	20 (S)	15 (R)	14 (I)	SI (R)	8 (R)	SI (R)
M004	NP	0.098	19 (S)	27 (S)	34 (S)	SI (R)	29 (S)	7 (R)	SI (R)	SI (R)	SI (R)
M026	NP	0.1	26 (S)	31 (S)	26 (S)	22 (S)	30 (S)	15 (S)	10 (R)	25 (S)	26 (S)
M032	NP	0.082	18 (I)	24 (S)	38 (S)	20 (S)	25 (I)	25 (S)	15 (I)	22 (S)	26 (S)
SP004	NP	0.092	34 (S)	32 (S)	40 (S)	22 (S)	35 (S)	15 (S)	21 (S)	30 (S)	35 (S)
M010	NP	0.084	11 (R)	SI (R)	36 (S)	25 (S)	10 (R)	20 (S)	30 (S)	17 (I)	34 (S)
M013	NP	0.08	SI (R)	31 (S)	31 (S)	24 (S)	23 (I)	15 (S)	SI (R)	20 (S)	22 (S)
AP016	NP	0.085	SI (R)	29 (S)	39 (S)	23 (S)	18 (R)	13 (I)	SI (R)	SI (R)	12 (I)
AP015	NP	0.092	16 (I)	31 (S)	36 (S)	24 (S)	15 (R)	19 (S)	12 (R)	20 (S)	25 (S)

*Sin Inhibición (SI), Sensible (S), Intermedio (I) y Resistente (R).

Como resultado del estudio se pudo determinar que de las 17 cepas analizadas el 70.6 %, fue resistente a ampicilina, seguido el 52.9 % de las cepas fueron resistentes a cefotaxima, el 41.2 % fue resistente a ac. nalidixico y trimpetroprima/sulfametoxazol, 29.4 % a cloranfenicol, 17.65 % a ceftazidima y tetraciclina, 11.8% a gentamicina y 5.9 % a ciprofloxacina, es importante mencionar que la mayor resistencia que se presentó fue ante ampicilina y la menor de estas a la ciprofloxacina en las cepas estudiadas, como se muestra en la Tabla 15 y Figura 12.

Tabla 15. Resistencia de antibióticos de las cepas aisladas.

Antibiótico	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
	%		
A. nalidíxico	47.06	11.76	41.18
Ceftazidima	76.47	5.88	17.65
Ciprofloxacina	82.35	11.76	5.88
Gentamicina	76.47	11.76	11.76
Cefotaxima	29.41	17.65	52.94
Tetraciclina	70.59	11.76	17.65
Ampicilina	23.53	5.88	70.59
Cloranfenicol	58.82	11.76	29.41
Trimethoprim-sulfamethoxazole	52.94	5.88	41.18

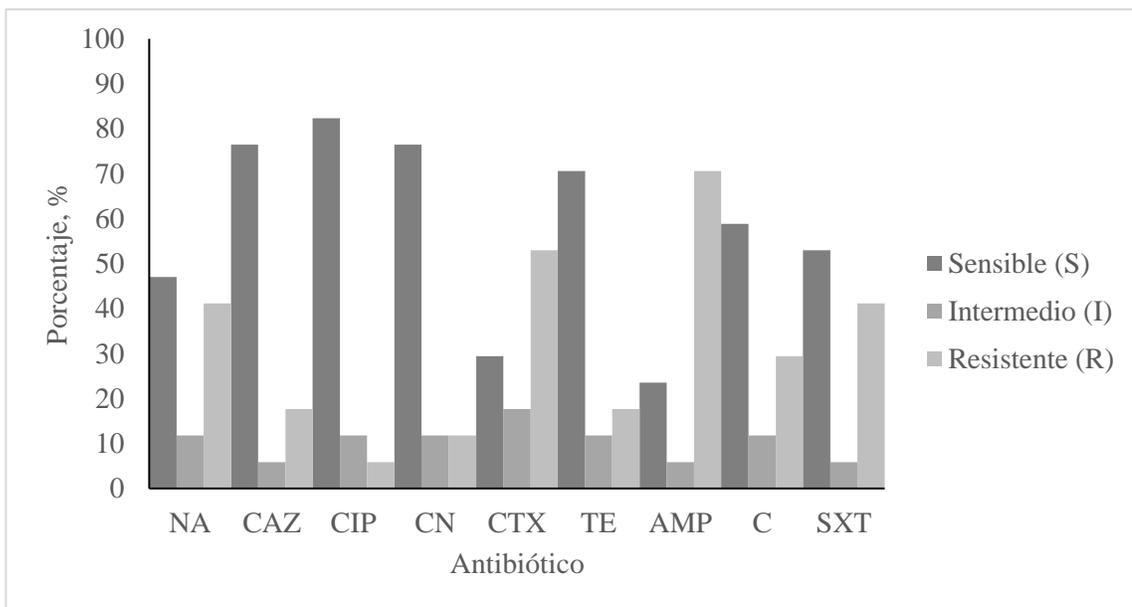


Figura 12. Evaluación de la resistencia a antibióticos de las cepas de *E.coli* presentes en las muestras.

8. DISCUSION.

México, es un país con una elevada tasa de enfermedades entéricas asociadas al consumo de agua o vegetales contaminados (Corzo-Ariyama et al., 2019). Estas enfermedades se han asociado con frecuencia a *Salmonella* a través de tomates contaminados principalmente con el agua de irrigación en los cultivos (Zarkani et al., 2019)

En nuestros resultados no se observó correlación entre la presencia de *Salmonella* y *E. coli*, aunque en estudios previos se han reportado prevalencias del 22 al 51% de *Salmonella entérica* en tomates deshidratados en puntos de venta en dónde (Vázquez et al., 2022).

La presencia o proliferación de patógenos como *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* en las superficies en contacto con los alimentos pueden ser fuentes de contaminación cruzada. En caso de los tomates puede ocurrir durante las prácticas posteriores a la cosecha, como el preenvasado y la distribución (Topalcengiz et al., 2022).

En estudios realizados en Querétaro, México en tomates, los coliformes totales estaban presentes en rangos de 0.5 a 3.0 log UFC/g (Vázquez et al., 2022). Un estudio realizado a tomates de tiendas locales en Sudáfrica en 2020 encontró coliformes en rangos de 0 a 8.2 log UFC/g de tomate (Richter et al., 2021). Mientras que los resultados obtenidos muestran que estos se encuentran por lo general, en el rango promedio de 0.19 a 5.52 UFC/g. Mientras que las muestras con presencia de cepas patógenas superaron hasta 2 veces este parámetro.

Las cepas STEC son en su mayoría bacterias comensales en animales, pero cuentan con un alto potencial de transmisión a seres humanos (Caprioli et al., 2005). En nuestro estudio encontramos la presencia de 61 cepas de *E. coli* y el único patotipo presente entre estas, fue la STEC, lo cual concuerda con un estudio realizado en tomates de mercados mexicanos se reportó que el patotipo más común de *E. coli* fue el STEC (Gómez-Aldapa et al., 2013). Además, algunas cepas de STEC no-O157 se han encontrado en alimentos crudos, como frutas, ensaladas de verduras y zumo de zanahoria (Castro-Rosas et al., 2012; Torres-Vitela et al., 2013). Lo cual sugiere que la presencia de este patotipo sigue esta tendencia de ocurrencia. Esta incluso puede ser debido al manejo desde la línea de

producción, la cadena de distribución o incluso eventos de contaminación cruzada con otros reservorios; como las manos de trabajadores, materiales o incluso otros elementos orgánicos con los cuales se pudo tener contacto.

El tratamiento postcosecha de frutas y hortalizas también influye en la contaminación de los alimentos, así como la manipulación, almacenamiento, transporte y limpieza (Faour-Klingbeil et al., 2016).

Actualmente, la aparición de cepas resistentes a antibióticos es común a nivel global, generalmente debido al uso de estos compuestos en tratamientos de humanos, animales o como suplementos alimentarios en el ganado. Los aislados de *E.coli* en la cadena de producción del tomate mostraron una mayor resistencia a los antibióticos, especialmente a la ampicilina y la tetraciclina (29.9 y 28.6% de los aislados, respectivamente) (Corzo-Ariyama et al., 2019). En México, solo se dispone de muy pocos informes sobre los perfiles de resistencia a antibióticos en aislados de *E. coli* de alimentos, esto puede aportar información sobre el abuso de antimicrobianos y la dinámica de transmisión (Martínez-Vázquez et al., 2021). Amézquita-López et al, en 2016, reportaron que en el noreste de México se encontraron cepas STEC multirresistentes en agua de canales y fueron correlacionadas con heces de bovinos. Estas cepas pueden transferir las resistencias a cepas sensibles a humanos, además de que pueden propagarse al suelo, los alimentos y las aguas subterráneas mediante la aplicación de abonos/estiércol a los campos agrícolas (Wichmann et al., 2014).

En el 100% de las muestras se encontraban al menos 3 resistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados como primera línea para el tratamiento de infecciones por bacterias entéricas, mientras que un estudio realizado en 2019, en el agua para riego de vegetales en Sinaloa estableció que el 90% (26/29) de las cepas de *E. coli* diarreinogénicas encontradas en las muestras, eran resistentes al menos a un antibiótico; el 51% (15/29) eran resistentes al menos a dos; y el 17% (5/29) eran multirresistentes a fármacos (Canizalez-Roman et al., 2019). Por otro lado, según nuestros resultados el 90% de nuestras cepas analizadas muestran multirresistencia a los fármacos utilizados.

En diversos estudios alrededor del mundo (China, Irán, Corea, Egipto, México) las cepas de *E. coli* fueron muy resistentes a la amoxicilina, el trimetoprim-sulfametoxazol amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, ampicilina, estreptomicina y kanamicina, así como completamente sensibles a los antibióticos norfloxacin y azitromicina (Pakbin et al., 2021).

9. CONCLUSIONES.

Según los análisis de calidad microbiológica realizados muestran; la presencia de coliformes totales las cuales fueron encontradas en el 89 % de las muestras, en valores de menos de 0.19 a 5.52 log UFC/g, manteniéndose en rangos normales según la literatura, mientras que los Enterococos, se encontró en el 98% de las muestras, en valores de 0.97 a 5.98 log UFC/g.

De las 100 muestras compuestas analizadas, se obtuvieron 61 cepas aisladas de *E. coli*, mientras no se detectó a *Salmonella* spp.

De las cepas aisladas de *E. coli* el 97.5 % (n=59) fueron no patógenas y el 2.5 % (n=2) se identificaron como patógenas del pato grupo STEC.

En todos los municipios que conforman el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León se encontraron cepas con resistencia al menos a 3 antibióticos, pero en los tomates adquiridos en Monterrey y Apodaca, algunas cepas fueron multirresistentes.

10. PERSPECTIVAS

Realizar ensayos más robustos, en los que se considere la presencia de diferentes patógenos entéricos, para la determinación de la seguridad alimentaria del producto.

Desarrollar un análisis más exhaustivo de la trazabilidad de la cadena de producción para determinar las posibles fuentes de brotes y poder contar con una respuesta adecuada para evitar un problema a mayor escala.

Evaluar los parámetros de obtención y transporte de las muestras, para lograr realizar una asociación más concreta de la presencia bacteriana.

Evaluar y analizar la procedencia y los posibles genes de resistencia a antibióticos presentes en el microbioma de las muestras.

Determinar la multiresistencia de estas cepas de interés a través de estudios metagenómicos y el uso de herramientas de nueva generación.

Así pudiendo utilizar estos estudios como fuente de información para la mejora de los servicios de inocuidad alimentaria.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abdullahi, I.I.; Abdullahi, N.; Abdu, A.M.; Ibrahim, A.S. 2016. Proximate, Mineral and Vitamin Analysis of Fresh and Canned Tomato. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 13, 1163–1169.
2. Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., Kabir, A., Khalil, M. I., & Gan, S. H. 2021. Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health and disease: A review. *Foods*, 10(1).
3. Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Soto-Beltran, M., Lee, B. G., Yambao, J. C., Lugo-Melchor, O. Y., & Chaidez, C. 2016. Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1).
4. Arah, I. K., Amaglo, H., Kumah, E. K., & Ofori, H. 2015. Preharvest and Postharvest Factors Affecting the Quality and Shelf Life of Harvested Tomatoes: A Mini Review. *International Journal of Agronomy*, 2015, 1–6.
5. Bacon RT, Sofos JN. 2003. Characteristics of Biological Hazards in Foods, En: Schmidt RH, Rodrick GE, Editors, *Food Safety Handbook*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 157–195.
6. Bailey, J. S., and N. A. Cox. 1992. Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of Salmonella and Listeria in foods. *J. Food Prot.* 55:256–259.
7. Betts GD. 2000. Controlling *E. coli* O157. *Nutrition and Food Science* 30:183-186.
8. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Bacteriol* 171:4281–4289
9. Bintsis, T. 2017. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563.
10. Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Valdez-Flores, M. A., Flores-Villaseñor, H., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Guadron-Llanos, A. M., Gonzalez-

- Nuñez, E., Medina-Serrano, J., Tapia-Pastrana, G., & León-Sicairos, N. 2019. Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 304, 1–10.
11. Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., & Oswald, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36(3), 289–311.
 12. Castro-Rosas, J., Cerna-Cortes, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D. W., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-García, T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 176–180.
 13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2007. Preliminary Foodnet data on the incidence of pathogens transmitted commonly through food, 10 states, 2006. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 56:336-339.
 14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2012. what is a foodborne disease outbreak and why do they occur [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html#whatisanoutbreak>.
 15. Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P., & Williams, P. H. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 365–378.
 16. Clavijo, R. I., Loui, C., Andersen, G. L., Riley, L. W., & Lu, S. 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1055–1064.
 17. Conrad, C.C., Stanford, K., Narvaez-Bravo, C., Callaway, T., McAllister, T., 2017. Farm fairs and petting zoos: a review of animal contact as a source of zoonotic enteric disease. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 59–73.
 18. Corzo-Ariyama, H. A., García-Heredia, A., Heredia, N., García, S., León, J., Jaykus, L., & Solís-Soto, L. 2019. Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates in farms and packing facilities

- of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 96–104.
19. Critzer FJ, Doyle MP. 2010. Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Curr Opin Biotechnol* 21: 125–130.
 20. D. Faour-Klingbeil, M. Murtada, V. Kuri, and E. C. D. Todd. 2016. “Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East,” *Food Control*, vol. 62, pp. 125–133.
 21. Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. 2013. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol* 162:793–799.
 22. D'Aoust, J.-Y., J. Maurer, and J. Stan Bailey. 2001. Salmonella species, p. 141-178. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
 23. Dashti, Ali & Jadaon, Mehrez & Abdulsamad, Abdulsamad & Dashti, Hussain. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*. 41.
 24. Davies J, Davies D. 2016. Origins, and evolution of antibiotic Resistance. *MicrobiolMolBiolRev*; 74:417 33.
 25. De la Fuente-Salcido, Norma Margarita, Villarreal-Prieto, Jesús Ma., Díaz León, Miguel Ángel, & García Pérez, Ada Patricia. 2015. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(2), 7-16
 26. Džidic S, Šuškovic J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol*. 46:11-21.2.
 27. Elias, W.P., Navarro-Garcia, F. 2016. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). In: Torres, A. (eds) *Escherichia coli in the Americas*. Springer, Cham.
 28. Enayati, M., Sadeghi, J., Nahael, R. M., Aghazadeh, M., Pourshafie, R. M., and Talebi, M. 2015. Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*. 61:339-345

29. Estrada-Garcia, T., and Navarro-Garcia, F. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 281–298.
30. Fagan, P. K., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic. 1999. Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:868–872.
31. FAO STAT, Global Tomato Production in 2012, FAO, Rome, Italy, 2014.
32. Feng P, Weagant S. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological Analytical Manual* [Online]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bamtoc.html>
33. Freitag C, Michael GB, Kadlec K, Hassel M, Schwarz S. 2017. Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 200:151–156
34. García S, Heredia N. 2009. Foodborne pathogens and toxins: an overview. In: *Microbiologically safe foods*, Heredia N, Wesley I, García S. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, pp. 15-52.
35. Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., & Caris-Veyrat, C. 2011. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, 124(4), 1603–1611.
36. Goldhar J. 1996. Nonfimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 408:63–72
37. Gómez-Aldapa, C. A., Del Refugio Torres-Vitela, M., Acevedo-Sandoval, O. A., Rangel-Vargas, E., Villarruel-López, A., & Castro-Rosas, J. 2013. Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, and Enterotoxigenic *E. coli* on Tomatoes from Public Markets in Mexico. *Journal of Food Protection*, 76(9), 1621–1625.
38. Greene, S.K., Daly, E.R., Talbot, E.A., Demma, L.J., Holzbauer, S., Patel, N.J., Hill, T.A., Walderhaug, M.O., Hoekstra, R.M., Lynch, M.F., Painter, J.A., 2008.

- Recurrent multistate outbreak of Salmonella Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. *Epidemiol. Infect.* 136, 157–165.
39. Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriott, and L. V. Carpenter. 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* 0157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* 35:11-19.
 40. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 254(1):12–18
 41. Heaton, J. C., and K. Jones. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J. Appl. Microbiol.* 104:613-626.
 42. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 27(3):614–630.
 43. Heredia, N., Caballero, C., Cárdenas, C., Molina, K., García, R., Solís, L., Burrowes, V., Bartz, E. F., de Aceituno A. F., Jaykus, L. A., García, S., and Leon, J. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern Mexico. *Journal of Food Protection.* 79(7):1197-1209.
 44. Heredia, N., Caballero, C., Cárdenas, C., Molina, K., García, R., Solís, L., Burrowes, V., Bartz, F. E., Fabiszewski De Aceituno, A., Jaykus, L. A., García, S., & Leon, J. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern Mexico. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1197–1209.
 45. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TA (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 297:137–149
 46. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 64(11):4751–4760.
 47. Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819–830.

48. Jo, S. H., & Park, J. M. 2019. The dark side of organic vegetables: interactions of human enteropathogenic bacteria with plants. In *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 13, Issue 2, pp. 105–110). Springer Tokyo.
49. Johnston, L. M., Jaykus, L.-A., Moll, D., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C.L. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112:83-95.
50. Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
51. Karmakar, K., Nair, A.V., Chandrasekharan, G., Garai, P., Nath, U., Nataraj, K.N., P., N.B., Chakravorty, D., 2019. Rhizospheric life of *Salmonella* requires flagella-driven motility and EPS-mediated attachment to organic matter and enables cross-kingdom invasion. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95.
52. Kim, H., and A. K. Bhunia. 2008. SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4853–4866.
53. King AD, Magnuson JA, To'ro'k T, Goodman N. 1991. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *J Food Sci* 56: 459–461.
54. Krug, M. D., Valadez, A. M., Chapin, T. K., Schneider, K. R., & Danyluk, M. D. (n.d.). Outbreaks of Foodborne Diseases Associated with Tomatoes [Online]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/>
55. Lake, I. R., & Barker, G. C. 2018. Climate Change, Foodborne Pathogens and Illness in Higher-Income Countries. *Current Environmental Health Reports*, 5(1), 187–196.
56. Leff, J. W., & Fierer, N. 2013. Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE*, 8(3).
57. Lenucci, M. S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., & Dalessandro, G. 2006. Antioxidant Composition in Cherry and High-Pigment Tomato Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2606–2613.
58. Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges, and responses. *Nat Med*;10(Suppl): S122–9.

59. Liao CH, Fett WF. 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *J Food Prot* 64: 1110–1115.
60. Luna-Guevara, J., Arenas-Hernandez, M., De La Peña, C. M., Silva, J. R. H., & Luna-Guevara, M. L. 2019. The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*, 2019, 1–10.
61. Lynch, M. F., R. V. Tauxe, and C.W. Hedberg. 2009. “The Growing Burden of Foodborne Outbreaks Due to Contaminated Fresh Produce: Risks and Opportunities.” *Epidemiology and Infection* 137:307–315.
62. Maitland, J. E., R. R. Boyer, J. D. Eifert, and R. C. Williams. 2011. “High Hydrostatic Pressure Processing Reduces *Salmonella enterica* Serovars in Diced and Whole Tomatoes.” *International Journal of Food Microbiology* 149:113–117.
63. Marti, R., Scott, A., Tien, C. Y., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., and Topp, E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(18):5701-5709.
64. Martinez, J. L. 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. In *Drug Discovery Today: Technologies* (Vol. 11, Issue 1, pp. 33–39). Elsevier Ltd.
65. Martínez-Vázquez, A. V., Vázquez-Villanueva, J., Leyva-Zapata, L. M., Barrios-García, H., Rivera, G., & Bocanegra-García, V. 2021. Multidrug Resistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Bovine Feces and Carcasses in Northeast Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
66. Meza-Segura, M., Estrada-Garcia, T. 2016. Diffusely Adherent *Escherichia coli*. In: Torres, A. (eds) *Escherichia coli in the Americas*. Springer, Cham.
67. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., & Helmuth, R. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1025–1033.
68. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology*

69. Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 48:378–383
70. Navarro-Garcia F. 2014. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli* / Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol Spectr* 2(6).
71. Número de habitantes en Nuevo León, Banco de Información Económica, Instituto Nacional De Estadística y Geografía (INEGI), [Online]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=19#collapse-Resumen>
72. Olaimat, A.N., Holley, R.A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* 32, 1–19.
73. Oliveira Vieira, V., Almeida Conceição, A., Raisia Barbosa Cunha, J., Enis Virginio Machado, A., Gonzaga de Almeida, E., Souza Dias, E., Magalhães Alcantara, L., Neil Gerard Miller, R., & Gonçalves de Siqueira, F. 2022. A new circular economy approach for integrated production of tomatoes and mushrooms. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
74. Ordaz, G., Merino-Mascorro, J. Á., García, S., & Heredia, N. 2019. Persistence of Bacteroidales and other fecal indicator bacteria on inanimated materials, melon, and tomato at various storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 299, 33–38.
75. Pakbin, B., Allahyari, S., Amani, Z., Brück, W. M., Mahmoudi, R., & Peymani, A. 2021. Prevalence, Phylogroups and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolates from Food Products. *Antibiotics*, 10(11), 1291.
76. Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y., Pérez-Sira, E., & Aguilar, V. H. 2018. Delphi methodology in food safety management and foodborne disease prevention. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(3), 483–490.
77. Ramos-Bueno, R.P.; Romero-Gonzalez, R.; Gonzalez-Fernandes, M.J.; Guil-Guerrero, J.L. 2017. Phytochemical composition and in vitro anti-tumour activities of selected tomato varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 488–496 *Reviews* 11:142-201.

78. Rice LB, Sahn D, Binomo RA. 2003. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press. p. 1074-101.
79. Richter, L., Du Plessis, E. M., Duvenage, S., & Korsten, L. 2021. High prevalence of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from fresh vegetables sold by selected formal and informal traders in the most densely populated Province of South Africa. *Journal of Food Science*, 86(1), 161–168.
80. Rosas GA, Acosta VM. Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F.: Secretaría de Salud, 2001.
81. Scaletsky ICA, Fabbricotti SH, Silva SOC, Morais MB, Fagundes-Neto U. 2002. HEP-2 adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* 8:855–858
82. SIAP. 2020. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agropecuaria y pesquera. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>.
83. Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee C, Chu C. 2016. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 49:892–90
84. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. 2016. *EFSA Journal*, 14(12).
85. Topalcengiz, Z., Friedrich, L. M., & Danyluk, M. D. 2022. *Salmonella* transfer potential between tomatoes and cartons used for distribution. *Journal of Food Protection*, 86(1), 100016.
86. Torres AG (2006) Adhesins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *ASMScience/EcoSalPlus* 1–19.
87. Torres-Vitela, M. R., Aldapa, C. a. G., Cerna-Cortes, J. F., Villarruel-López, A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. 2013. Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*, 56(3), 180–185.

88. Vaičiuvėnas V. 2005. Antimikrobinio gydymo mikrobiologija. (Anti-microbial microbiology.) Lasinskaitė-Čerkasina A, Pavilionis A, Vaičiuvėnas V, editors. *Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai. (Basics of medical microbiology and virology.)* Kaunas: Vitae Litera. p. 287-335.
89. Van, T. T. H., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L. T., & Coloe, P. J. 2007. Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6885-6890.
90. Vázquez, J. L., Oviedo, A., Mejía, J. a. S., D'Souza, D. V., Marmolejo, A. P., & Iturriaga, M. H. 2022. Microbiological Profile, Prevalence, and Characterization of *Salmonella enterica* in Peanuts, Pecans, Raisins, Sun-Dried Tomatoes, and Chocolate Sprinkles Sold in Bulk in Markets in Querétaro, Mexico. *Journal of Food Protection*, 85(9), 1265–1272.
91. Wang, R. F., W. W. Cao, and C. E. Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83:727–736.
92. Wichmann, F., Udiković-Kolić, N., Andrew, S., & Handelsman, J. 2014. Diverse Antibiotic Resistance Genes in Dairy Cow Manure. *MBio*, 5(2).
93. World Health Organization. Overcoming antibiotics resistance. En: World Health Organization Reportin Infectious Disease; 2020
94. World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. En: World Health Organization Reportin Infectious Disease; 2019
95. Zarkani, A. A., Schierstaedt, J., Becker, M., Krumwiede, J., Grimm, M., Grosch, R., Jechalke, S., & Schikora, A. 2019. *Salmonella* adapts to plants and their environment during colonization of tomatoes. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11).
96. Zhao, T., and M. P. Doyle. 2001. Evaluation of universal preenrichment broth for growth of heat-injured pathogens. *J. Food Prot.* 64:1751–1755.