

1996 B/2001 A

193157281

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**“Desarrollo de un método rápido para la detección
de *Salmonella* en huevo de gallina utilizando la
técnica de PCR”**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

ALMA YAZMIN JOSEFINA TORRES LAGUNA

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Febrero 2002



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. ALMA YAZMÍN JOSEFINA TORRES LAGUNA
P R E S E N T E .**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DE Salmonella EN HUEVO DE GALLINA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE PCR", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 30 de abril del 2001

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Alma Rosa Villalobos
**DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO. - Director del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/ARVA/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:
Alma Yazmín Josefina Torres Laguna con el título:
Desarrollo de un método rápido para la detección de Salmonella en huevo de gallina utilizando la técnica de PCR consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 04 - Feb. del 2002

EL DIRECTOR DE TESIS



EL ASESOR

Rosalbe Gtz. R.
NOMBRE Y FIRMA

NOMBRE Y FIRMA

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

SINODALES

- | | | |
|-----|---|---------------------------|
| 1.- | <u>ASanterre</u>
Anne Santerre | <u>ASanterre</u>
FIRMA |
| 2.- | <u>Alfonso Islan Rodriguez</u>
NOMBRE COMPLETO | <u>[Firma]</u>
FIRMA |
| 3.- | <u>[Firma]</u>
NOMBRE COMPLETO | <u>[Firma]</u>
FIRMA |



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.**

**División de Patología y Biotecnología Ambiental
(DIPABIA)**

Lab. de Microbiología Molecular

Director: Dra. Rosalba Gutiérrez Rojo

Agradecimientos:

- ❖ A mis padres por su amor, apoyo y haberme inculcado el deseo de superación en la vida.
- ❖ A mí madrina Olivia por su gran apoyo incondicional.
- ❖ A Ricardo Aguilar por su amor, apoyo y comprensión en todo momento.
- ❖ A Alejandra Guerrero, Carmen Alvarez, Sandra y amigos, por su valiosa amistad.
- ❖ A la Dra. Rosalba Gutiérrez por ser guía en mi formación profesional y haber creído en mí.
- ❖ A la Universidad de Guadalajara y al CIATEJ mi reconocimiento y respeto por prepararme académicamente.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto "Diseño y desarrollo de un método rápido para la detección de *Salmonella* en alimentos. (CONACYT I-32961)".

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	
II.1 Importancia de los microorganismos patógenos en los alimentos	2
II.2 <i>Salmonella</i>	
II.2.1 Historia	3
II.2.2 Taxonomía	3
II.2.3 Factores que afectan el crecimiento	4
II.2.4 Infecciones por <i>Salmonella</i> en el ser humano	4
II.2.5 Detección y recuento	5
II.2.6 Identificación	7
II.2.7 Epidemiología y distribución en la naturaleza	8
II.3 Calidad higiénica del huevo	9
II.4 Métodos para la detección de microorganismos en alimentos	11
II.5 Utilización de la PCR en el diagnóstico de patógenos en alimentos	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1 Cultivos de microorganismos	17
VI.2 Diseño y desarrollo de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella</i>	
VI.2.1 Optimización de la extracción de ADN genómico de bacterias	18
VI.2.2 Optimización de la PCR	19
VI.2.3 Visualización del ADN y los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa	20

VI.3 Utilización de la PCR en la identificación de <i>Salmonella</i> en huevos frescos de gallina contaminados artificialmente con <i>S. enteritidis</i>	22
VI.4 Ensayo para incrementar la sensibilidad de la técnica de PCR	22
VI.5 Evaluación de la técnica en la detección de <i>Salmonella</i> en huevos Frescos de gallina	23
VII. RESULTADOS	
VII.1 Obtención de ADN genómico de bacterias	26
VII.2 Desarrollo de la PCR a partir de cultivos puros de <i>S. enteritidis</i> con lo cual se comprueba la eficacia de los cebadores seleccionados en la amplificación del fragmento de interés	26
VII.3 Evaluación de la técnica de PCR en la detección de <i>S. enteritidis</i> en huevos frescos de gallina contaminados artificialmente	29
VII.4 Evaluación de la técnica en la detección de <i>Salmonella</i> en huevos frescos de gallina	30
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES	37
X. BIBLIOGRAFÍA	38

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

I. RESUMEN

La seguridad microbiológica de las personas respecto a los alimentos continúa suscitando gran preocupación entre todos los componentes de la cadena alimentaria, desde el campo hasta la mesa. Los nuevos métodos de detección e identificación de patógenos microbianos, basados en el ADN, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha revolucionado todas las áreas de investigación científica, ya que por su rapidez, especificidad y sencillez resulta útil para la identificación, caracterización y cuantificación de microorganismos patógenos de los alimentos. Gracias a estos métodos basados en el ADN, se puede identificar rápidamente el origen de los patógenos y retirar de la venta los alimentos afectados. Es indudable que tanto los productores como los consumidores se benefician de estas técnicas, que permiten detectar oportunamente a los agentes patógenos, en comparación con otros métodos.

En la actualidad *Salmonella* es el patógeno más importante causante de intoxicaciones alimentarias en el mundo y en nuestro país. El huevo por su contenido en nutrientes representa un sustrato excelente para el crecimiento de bacterias, principalmente *Salmonella*, por lo tanto se considera un vehículo importante en la transmisión de enfermedades por el consumo de alimentos.

El presente trabajo aporta un método para la detección de *Salmonella* en huevo, mediante la técnica de PCR. Los resultados obtenidos, demuestran que la sensibilidad de la técnica desarrollada, permite determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*, con un límite de detección de 10^0 ufc ml⁻¹ (1 célula), en 18 horas. Asimismo, la especificidad queda demostrada al permitir únicamente la identificación de las especies del género *Salmonella* en las muestras.

II. ANTECEDENTES

II.1.- Importancia de los microorganismos patógenos en los alimentos.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo (Montarjemi, 1999). Se ha comprobado que los alimentos son una vía de transmisión de numerosos agentes patógenos de origen bacteriano, parasitario y viral. También puede ser el lugar de almacenamiento de varios productos químicos tóxicos producidos naturalmente o como resultado de la contaminación (Parrilla y col., 1993; Montarjemi, 1999). La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su transformación. Por tanto, el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o en el ambiente donde se almacena, maneja o procesa el alimento (Montarjemi, 1999).

Existen aproximadamente 250 enfermedades producidas por alimentos contaminados, donde los síntomas son variados y dependen del agente etiológico. Los agentes más frecuentes son: *Salmonella ssp.*, *Campylobacter sp.*, *E.coli O157*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium sp.*, *Vibrio cholerae*, virus y parásitos (Montarjemi, 1991; Parrilla y col., 1993).

Generalmente, los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse, hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (ICMSF, 1980). Las manifestaciones de las toxicoinfecciones alimentarias son generalmente de tipo gastrointestinal aunque en algunos casos el cuadro clínico es de tipo extraintestinal. Cada vez se presenta con más frecuencia la transmisión de patógenos por alimentos en síndromes tóxicos, respiratorios y enfermedades crónicas (Riley y col., 1983; Rose y col., 1987; Archer, 1985). Organismos patógenos de reconocida importancia se han aislado de alimentos en los que se creía no proliferarían. Algunos de ellos han mostrado resistencia a las técnicas de procesamiento y almacenamiento que antes se consideraban seguras, lo

que representa una preocupación para la industria alimentaria (Archer y Young, 1998). Esto determina que la protección alimentaria sea una prioridad para la salud pública, para la cual se deberían realizar grandes esfuerzos en busca de la prevención de estas enfermedades. Las dos herramientas más importantes a este respecto son la investigación y la vigilancia (Montarjemi, 1999).

II.2.- Salmonella

2.1 Historia.-

El nombre del género fue acuñado por Lignières en 1900 en honor de la investigación del Dr. Salmon (ICMSF, 1996). Mucho antes que se descubriera el bacilo de la fiebre tifoidea, la naturaleza infecciosa de esta enfermedad era evidente. En 1856, basándose en datos epidemiológicos, William Budd sugirió que la enfermedad se transmitía a través de aguas residuales contaminadas y que la fuente de infección eran las heces humanas. En 1880, Eberth encontró el bacilo tifoideo en el bazo y los nódulos mesentéricos de personas que murieron a causa de fiebre tifoidea (Ferreraz, 1996; Freeman, 1989). Posteriormente, fue aislado en 1884 por Gaffky. Desde entonces, las salmonelas han sido identificadas como la causa más importante de la fiebre tifoidea y de las salmonelosis (ICMSF, 1996).

2.2 Taxonomía.-

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae (Brenner, 1984). Los representantes de esta familia son gram-negativas, anaerobias facultativas, asporógenas, de forma bacilar. Suelen ser móviles e inmóviles; las móviles tienen flagelos peritricos, producen ácido, y a veces gas de la glucosa; suelen ser catalasa-positivas y oxidasa-negativas y reducen los nitratos a nitritos. La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos ó como comensales (ICMSF, 1996).

La familia de la *Salmonella* incluye más de 2,300 serotipos de la bacteria. Durante muchos años, los distintos grupos de organismos que constituían el grupo

"tifoideoparatífico" eran reducidos en número y se diferenciaban mediante el cultivo y reacciones bioquímicas. Con el desarrollo de las técnicas de análisis antigénico y su aplicación a los microorganismos en la década de los años 20, se describieron muchos tipos diferenciales serológicamente, de modo que actualmente el grupo de *Salmonella* está constituido por muchos cientos de serotipos (Ferreraz, 1996; Freeman, 1989), se ha determinado una sola especie, *Salmonella* entérica con numerosos serovares (Le Minor y Popoff, 1987). Bajo este nuevo sistema, la bacteria *S. enteritidis* se designa correctamente como *S. enteritidis*, subespecie entérica, serovar *enteritidis*.

2.3 Factores que afectan el crecimiento.-

Las temperaturas mínimas de crecimiento de las salmonelas en los alimentos oscilan entre 6 y 10°C su temperatura óptima es de 37°C. El intervalo de pH de crecimiento 4,1 y 9,0. Su actividad de agua (a_w) se encuentra entre 0,93 a 0,95. Las especies y cepas de *Salmonella* se diferencian por su termorresistencia y por la influencia que los factores ambientales ejercen en el crecimiento (Frazier, 1993).

2.4 Infecciones por *Salmonella* en el ser Humano.-

Los principales síndromes originados por *Salmonella* son:

- a) **Gastroenteritis:** consecuencia de la ingestión de células viables de origen alimentario. El periodo de incubación varía desde 5 horas a 5 días; los signos y los síntomas empiezan 12-36 horas después de la ingestión de un alimento contaminado, y son: diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos. El síndrome suele durar 2-5 días (ICMSF, 1996).

- b) **Fiebre tifoidea:** únicamente afecta a la especie humana. El agente etiológico es casi siempre *S. typhi*, cuando no está producida por *S. typhi*, se habla de fiebre paratifoidea, provocada por *S. paratyphi*. El período de incubación varía desde 7 a 28 días. Los síntomas son: malestar, cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo y debilidad, generalmente acompañados de una diarrea parecida al puré de guisantes o de estreñimiento. A veces, en el tronco,

en el dorso y en el tórax, aparecen manchas de color rosa. Otras veces se observan un ritmo cardíaco lento, abdomen sensible y dilatado, aumento del tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. La convalecencia es lenta de 1-8 semanas (ICMSF, 1996).

- c) **Bacteriemia con metástasis sépticas o sin ellas:** la bacteriemia o septicemia es causada por la presencia de salmonelas en la sangre. Ésta puede aparecer por metástasis cuando el sitio inicial de la infección es el tracto intestinal u otros focos. Los síntomas son fiebre alta y persistente, dolor en el dorso, en el abdomen y en el tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia, y pérdida de peso. El estado puede ser pasajero o crónico. Las secuelas identificadas incluyen: apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis, pleuritis, neumonía e infección de las vías urinarias (Archer y Young, 1998; Smith y col., 1993).
- d) **Portador asintomático:** se define como la persistencia de *Salmonella spp.* en heces, durante más de un año. La incidencia de portador fecal después de una enteritis por *Salmonella spp.* es del 0,2-0,6%; el foco crónico de infección suele ser el árbol biliar. La dificultad de erradicarla reside en la presencia de cálculos biliares. Algunos serotipos se relacionan con mayor frecuencia con un determinado síndrome. Así, *S. enteritidis*, *S. newport* y *S. anatum* originan predominantemente gastroenteritis; *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B y C son los responsables de la fiebre tifoidea; *S. choleraesuis* causa a menudo bacteriemia (Ferreraz, 1996; Freeman, 1989).

2.5 Detección y Recuento.

La detección rutinaria de las salmonelas por métodos microbiológicos supone una secuencia de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en placa de medios selectivos, aislamiento e identificación.

El pre-enriquecimiento se puede llevar a cabo o no, dependiendo de la probabilidad de que exista en el alimento. Se utiliza cuando se analizan alimentos que

han sido calentados, congelados y desecados y en aquellos alimentos en los que es de esperar que se encuentren células de salmonelas en escaso número. Los medios líquidos de pre-enriquecimiento (por ej., el caldo de peptona tamponado, los caldos nutritivos y lactosados) permiten el crecimiento de la flora natural y también el de las salmonelas. Los medios o el procedimiento pueden ser modificados con varias finalidades. A veces se hacen adiciones para superar los materiales inhibidores que pueden estar presentes en determinados alimentos. Los alimentos de pH bajo o alto pueden requerir la neutralización del caldo de pre-enriquecimiento después de haber sido preparada la suspensión del alimento. La rehidratación lenta de algunos alimentos desecados puede aumentar la sensibilidad de la detección de *Salmonella* (Van Schothorst y col., 1979).

El enriquecimiento selectivo tiene por finalidad inhibir el crecimiento de otros microorganismos a la vez que permite que las salmonelas crezcan. Se consigue mediante el empleo de compuestos químicos, inhibidores (por ej., colorantes, tetracionato, selenita), temperatura y tiempo de incubación determinados, que permiten que la proporción de salmonelas con respecto a los demás microorganismos aumente de modo que puedan ser identificadas en placas de medios selectivo-diferenciales o mediante otras técnica. Los tiempos de incubación suelen ser de 16-24 horas. Normalmente, las temperaturas de incubación varían desde 35 a 43 °C. Los caldos selectivos que se utilizan habitualmente son el caldo tetracionato con verde brillante, el caldo selenita con cistina, el caldo para bacterias Gram-negativas (GN) y el caldo con cloruro de magnesio-verde malaquita de Rappaport-Vassiliadis (Vassiliadis, 1983). Se recomiendan varios medios de enriquecimiento y varias rutinas de tiempo y de temperaturas de incubación.

La presencia de salmonelas se determina sembrando muestras de los caldos de enriquecimiento en placas de medios selectivos. Como agentes selectivos se emplean las sales biliares, el desoxicolato, el verde brillante, el sulfito de bismuto y los antibióticos. La diferenciación de las salmonelas de otros microorganismos se suele conseguir mediante los cambios de color que presentan los colorantes indicadores del

pH que responden a la fermentación de la lactosa o de la sacarosa, pero también se basa en la producción de ácido sulfídrico (H_2S) o en la descarboxilación de la lisina. Los medios para siembras en placa que se emplean habitualmente incluyen: el verde brillante con o sin sulfadiazina o sulfapiridina, el desoxicolato xilosa lisina, el sulfito de bismuto, el agar entérico de Hektoen, el agar de MacConkey, el agar citrato desoxicolato y el agar *Salmonella-Shigella*. En vista de la diversidad fisiológica del grupo *Salmonella* y de la flora existente en los alimentos, en los métodos de cultivo clásicos se deben utilizar dos o más de estos medios.

El recuento de salmonelas se realiza mediante la técnica del número más probable (ICMSF, 1978; Speck, 1984). Se trata de un procedimiento engorroso y excesivamente caro para utilizarlo en el examen de un número elevado de muestras. El método de la membrana con retículo hidrófobo se utiliza también para realizar el recuento de salmonelas en algunos alimentos (Warburton y col., 1994).

2.6 Identificación.

La primera selección se realiza en medios de agar diferenciales no selectivos, por ejemplo en el medio sólido con tres azúcares y hierro (TSI), en el agar lisina hierro (LI), en los medios de agar de Gillies I y II o en el agar TSI con urea. La identificación definitiva se puede realizar mediante pruebas bioquímicas en cultivos puros, que pueden requerir tiempo. En la primera selección generalmente se usan las pruebas de la lisina, de la ureasa y del indol. Para identificar Enterobacteriaceae a nivel de género, se utiliza una primera batería de 14 pruebas; para asignar a especies todas las Enterobacteriaceae actualmente admitidas, son necesarias otras 14 pruebas (Kelley y col., 1985). Las salmonelas suelen ser lactosa-negativas, sacarosa-negativas, ureasa-negativas, indol-negativas, H_2S -negativas y lisinodecarboxilasa-positivas, aunque existen cepas atípicas (D'Aoust, 1989). Existen dispositivos comerciales (por el., Micro ID, Minitek, API 20E, Enterotube II, Vitek) para identificar sus características bioquímicas.

El serotipado es valioso en las investigaciones epidemiológicas y para identificar las fuentes de salmonelas en la elaboración de alimentos. Las pruebas

serológicas son utilizadas con frecuencia en la industria alimenticia con preferencia a las pruebas bioquímicas, como un medio rápido y específico para confirmar la presencia de salmonelas en un alimento. Los antisueros se pueden adquirir en el comercio y en organismos de salud pública. Las biovariedades constituyen indicadores epidemiológicos útiles en aquellos serotipos para los que no se dispone de otro método de tipado o en conjunción con otros métodos, por ejemplo con el fagotipado (Barker y Old, 1989).

Las fagovariedades se determinan mediante la determinación de la sensibilidad de los cultivos a una serie de bacteriófagos en diluciones apropiadas (Anderson, 1964; Anderson y col., 1977; Parker, 1984). Ejemplos de serotipos que pueden ser tipados por medio de fagos son: *typhi*, *paratyphi A* y *B*, *typhimurium*, *enteritidis*, *dublin*, *thompson*, *gallinarum*, *virchov*, *panama* y *newport*. Otras subdivisiones y otros indicadores epidemiológicos se pueden basar en la sensibilidad a las bacteriocinas, en la resistencia a los antibióticos y en el DNA de los plásmidos (D'Aoust, 1989).

2.7 Epidemiología y distribución en la naturaleza.

Las salmonelas se encuentran en todas partes y están reconocidas universalmente como agentes zoonóticos. Han sido identificados numerosos reservorios animales como, gatos, perros, cerdos, bovinos, roedores, pollos, pavos, patos y gansos. Algunos alimentos, especialmente los de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, han sido identificados como vehículos para transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos a los ambientes de elaboración y las cocinas.

Las salmonelas se alojan en el tracto intestinal de los animales infectados (incluyendo a los seres humanos). Se eliminan en las heces y pueden ser transmitidas por contacto a las manos de los seres humanos como consecuencia de los movimientos del intestino, por las patas, el pelo y la piel de los animales, cuando andan, se posan o descansan sobre el suelo o sobre la yacija. Los vehículos principales son los alimentos, los piensos y el agua. La mayoría de los individuos

colonizados se convierten en excretos sanos, ocasionando la contaminación del ambiente. La contaminación se disemina entre los animales durante el transporte, durante la permanencia en locales o alojamientos cerrados y durante el sacrificio. La contaminación cruzada es producida por alimentos crudos contaminados durante sus posteriores elaboración y preparación. Las salmonelas también se pueden establecer y multiplicar en el ambiente y en el material de las diversas instalaciones de elaboración de alimentos (ICMSF, 1996).

II.3.- Calidad higiénica del Huevo.

Al huevo se le puede considerar como una fuente poco energética, de proteínas perfectamente equilibradas y de grasas fácilmente digeribles. Constituye una importante fuente de fósforo, hierro y vitaminas A, B1, B2 y D. Por el contrario, es deficiente en glúcidos, calcio y vitamina C (Sauveur, 1993). Un huevo fresco es aquel que no representa ningún riesgo de provocar una intoxicación, cualquiera que sea el tipo de preparación culinaria a que se le someta.

La calidad bacteriológica es también fundamental en el caso del huevo. La contaminación interna original del huevo es muy rara; cuando se presenta es debida a salmonelas y de forma accesoria a estafilococos. Por el contrario, la superficie de la cáscara del huevo lleva, de manera completamente normal, un número elevado de bacterias, que puede oscilar entre 10^3 - 10^4 , en cáscara muy limpia, más de 10^7 , paía cáscara muy contaminada. Pertenecen a una cuarentena de grupos diferentes que proceden, generalmente, de los excrementos y/o del entorno. En consecuencia, existe la problemática de las contaminaciones secundarias a través de los poros o de las micro-fisuras de la cáscara. Las más frecuentes son las producidas por *Salmonelas*, *Clostridios*, *Proteus* y *Pseudomonas*. Afortunadamente, estas contaminaciones son poco frecuentes gracias al efecto protector que ejercen las membranas coquiliarias y las propiedades antibióticas del albumen (lisozima). Dos tipos de factores condicionan la calidad bacteriológica del huevo: a) los que actúan sobre la limpieza del huevo en el momento de la puesta. b) los que controlan,

posteriormente, las multiplicaciones bacterianas y las contaminaciones internas (Sauveur, 1993).

El huevo constituye un envase natural muy notable. Su contenido se deteriora tan fácilmente como la leche, pero sí su frágil cáscara se encuentra seca y no está dañada, el huevo se conserva comestible durante muchos meses, incluso manteniéndolo a temperatura ambiente. Según un estudio de Haines en 1938 el 98% de las claras de huevo y el 93% de las yemas son estériles y según (Brooks y Taylor, 1955) son el 90%. Dos son los factores responsables:

1) La resistencia a la penetración ofrecida por la cáscara y sus membranas.- Las estructuras del huevo se pueden relacionar en orden decreciente con respecto a su resistencia a la penetración por los microorganismos de esta forma: cutícula, membrana interna, cáscara y membrana externa (Lifshitz y col., 1964). Obviamente, las grietas que alcanzan la membrana interna facilitan el paso de los microorganismos por las barreras y permiten la entrada inmediata de las bacterias patógenas y de las causantes de alteraciones. La cáscara calcárea posee múltiples poros a través de los que los microorganismos pueden pasar con facilidad. El número y tamaño de estos poros es más grande en el polo mayor del huevo, donde es también más grande por tanto su permeabilidad (Vadehra y col., 1970). Las cáscaras de mayor densidad ofrecen también mayor resistencia a la penetración de los microorganismos. La penetración de la *Salmonella* se produce también más rápidamente en las cáscaras menos densas (ICMSF, 1985).

(2) Los múltiples factores que hacen que la clara del huevo sea un medio pobre para el crecimiento de los microorganismos. La albúmina mata o evita el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, mientras que la yema, o la mezcla de clara y yema, no posee este efecto (Haines, 1939; Brooks, 1960). La lisozima, originalmente llamada así en 1909 porque lisaba (disolvía) las células bacterianas, se ha identificado como muramidasa, denominada así porque ataca la capa de mureína o el sáculo de mureína de las células bacterianas. La conalbúmina es importante porque secuestra (quela) los iones metálicos, en especial el hierro, cobre y zinc, por

lo que estos metales no se hallan así a disposición de las bacterias. Las bacterias gram-positivas resultan más fácilmente inhibidas por la conalbúmina que las gram-negativas (ICMSF, 1985).

Los huevos se almacenan con el polo mayor hacia arriba ya que de esta forma la yema, que tiene una densidad inferior que la clara, queda inmobilizada y no puede desplazarse hacia la membrana interna. Si este desplazamiento se produce y entra en contacto con la membrana, los microorganismos que hubieran podido penetrar la cáscara y hallarse en este punto, deteriorarán el huevo con mayor facilidad al no tener que atravesar la clara y sufrir la acción de los factores protectores existentes en la misma (Board, 1964; Brown y col., 1970).

II.4.- Métodos para la detección de microorganismos en alimentos.

La identificación de bacterias patógenas presentes en los alimentos se ha convertido en un reto para la industria alimenticia. Los avances científicos y tecnológicos han permitido desarrollar técnicas muy novedosas que reducen tiempos e incrementan la especificidad en el resultado, sin embargo, todas presentan desventajas lo que dificulta su aplicación.

Métodos convencionales

El número total de microorganismos viables de una muestra de alimento, suele determinarse para estimar su vida útil, su estado higiénico y la pérdida de calidad organoléptica. Los cuatro métodos básicos son el recuento estándar en placa (REP) (Frank y col., 1985.; Jay, 1994), el método del número más probable (NMP) (McCrary, 1915.; Jay, 1994), la técnica de reducción de colorante (Kroll, 1985), y el recuento microscópico directo (Jay, 1994).

Métodos físico-químicos

Generalmente se basan en la detección y amplificación de las modificaciones físico-químicas del medio, como consecuencia del crecimiento activo de los

microorganismos, entre ellos destacan la impedimetría (Kell y Davey, 1990), turbidimetría (García y col., 1991), radiometría (Fung, 1984; Martínez y Rodrigo, 1987), bioluminiscencia o medida del ATP (Quesneau, 1983; Wood y Gibbs, 1982), prueba de *Limulus* y el ensayo de la actividad inmunopeptidásica ligada a la pared celular.

Métodos inmunológicos

La aplicación de estas técnicas al análisis de alimentos ha tenido mucho auge debido a las ventajas que ofrece frente a los métodos convencionales. Las técnicas inmunológicas se diferencian de otras técnicas analíticas porque su tecnología reside en la utilización de moléculas (anticuerpos) y no en equipos instrumentales complejos. Entre los métodos inmunológicos con mayor éxito que se han aplicado al análisis rutinario de alimentos destacan, aglutinación (Rose y Stringer, 1989), inmunofluorescencia (Cox y col., 1987), radioinmunoensayo (Van Vunakis, 1980) y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) (Clark y Engval, 1980).

Métodos genéticos

Los métodos genéticos se basan en la identificación de fragmentos de ADN cromosómico y plasmídico que proporcionan datos específicos útiles para detectar en alimentos la presencia de microorganismos patógenos y alterantes (Eamshaw y Gidley, 1992). Los métodos genéticos más utilizados en el análisis de alimentos son el perfil plasmídico (Birnboim y Doly, 1979; Townsend y col., 1985), sondas de ADN (ICMSF, 1996) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (McPherson y Møller, 2000).

II.5.- Utilización de la PCR en el diagnóstico de patógenos en alimentos.

Los nuevos métodos de detección e identificación de patógenos microbianos, basados en el ADN, ofrecen ventajas tanto para los productores como para los consumidores. La seguridad microbiológica de los alimentos continúa suscitando gran

preocupación entre todos los componentes de la cadena alimentaria, del campo a la mesa. En la última década, esos análisis tradicionales se han sustituido por métodos mucho más rápidos que se sirven del ADN. Un técnico puede realizar el diagnóstico en cuestión de horas, mientras que las técnicas clásicas podían llevarle varios días a un microbiólogo altamente preparado. Estos métodos, al utilizar información genética para detectar las bacterias, proporcionan además resultados más precisos que los tradicionales, (basados en las características bioquímicas e inmunológicas). La PCR ha revolucionado a todas las áreas de la investigación científica hasta el punto de convertir en rutina automática, los trabajos que antes exigían procedimientos artesanales e imprecisos. Para comprobar la existencia de un germen en particular, por ejemplo la bacteria *Salmonella*, se toma una muestra del alimento en cuestión y se favorece el desarrollo de cualquier bacteria en él. Se extrae luego el ADN de las bacterias y, mediante la técnica de PCR, se amplifican específicamente las pequeñas cantidades de ADN de interés hasta obtener cantidades fáciles de identificar. La PCR gracias al uso de cebadores específicos sólo amplificará el ADN del organismo elegido (en este caso, la *Salmonella*) y, de estar presente, resultará fácil su detección. Gracias a estos métodos basados en el ADN, se puede identificar rápidamente el origen de un patógeno y retirar de la venta los alimentos afectados. <<http://www.eufic.org/sp/food/pag/food14/food144.htm>> (2001).

Entre las principales aplicaciones de la técnica de PCR al análisis de patógenos en los alimentos se encuentran la detección de células de *Clostridium perfringens* (Fach y Guillou, 1993; Uzal y col., 1996), *Listeria monocytogenes* (Strachan y Gay, 1995; Bickley y col., 1996), cepas patógenas de *E.coli* (Olive, 1989; Hornes y col., 1991), *Yersinia enterocolitica* (Rasmussen y col., 1995; Dickinson y col., 1995), *Campylobacter sp.* (Wegmuller y col., 1993; Docherty y col., 1996) y *Vibrio cholerae* (Varela y col., 1993; Shangkuan y col., 1995), entre otros muchos microorganismos.

III. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial *Salmonella* ha sido implicada como agente causal en brotes de intoxicación alimentaria, hecho que ha sido reportado en numerosos trabajos de investigación (Rampling y col., 1990; St. Louis y col., 1988). La importancia de estas infecciones en la salud de la población, las pérdidas económicas que estas generan, su fuerte asociación con productos avícolas y alimenticios (Fica y col., 1997), hacen necesario desarrollar técnicas que sean cada vez más rápidas, sensibles y específicas para diagnosticar la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, los cuales permitan ofrecer productos inocuos, que garanticen la salud de los consumidores y aseguren su posicionamiento en los mercados internacionales.

Este trabajo propone una nueva técnica de detección de *Salmonella*, basada en el uso del ADN, dirigido a la industria alimenticia con el propósito de que en un futuro se pueda implantar como técnica rutinaria de diagnóstico, sustituyendo a los métodos convencionales los cuales presentan los inconvenientes de ser muy laboriosos y de requerir mucho tiempo para la obtención de resultados.

IV. HIPÓTESIS

La técnica de PCR permitirá diseñar un método de detección rápida, sensible y eficaz de *Salmonella* en huevo de gallina.

© 2000

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un nuevo método para la detección de *Salmonella* en huevo de gallina, mediante la utilización de la técnica genética de PCR

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Optimizar la extracción de ADN genómico de cultivos puros y de huevos contaminados artificialmente con *Salmonella enteritidis*.
- 2.- Estandarizar la técnica de PCR mediante la utilización de cebadores específicos para la amplificación de un fragmento de interés que identifique a *Salmonella spp.* en cultivos puros y en huevos contaminados artificialmente con *S. enteritidis*.
- 3.- Optimizar la técnica hasta alcanzar un límite de detección de 10^0 ufc ml⁻¹.
- 4.- Evaluar la técnica desarrollada en la detección de *Salmonella* en huevos frescos sin contaminar artificialmente.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Cultivo de microorganismos

Material biológico: Se emplearon 4 cepas de *Salmonella*:

Salmonella enteritidis

Salmonella typhimurium (ATCC) 14028,

Salmonella choleraesuis

Salmonella typhi

Para comprobar la eficiencia de los cebadores se utilizaron como referencia los siguientes microorganismos:

Staphylococcus aureus (ATCC) 16538

Listeria monocytogenes (ATCC) 19114

Escherichia coli (ATCC) 8739

Todas las cepas se adquirieron del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

El cultivo de microorganismos se realizó en agar nutritivo y la revitalización en caldo nutritivo (Nutrient broth, Difco). Para el aislamiento de *Salmonella* se empleó agar verde brillante.

Para estimar el número de microorganismos, tanto en cultivos puros como en las diluciones con las que se contaminaron artificialmente los huevos, se realizaron siembras en PCA (Plate Count Agar, Difco). La incubación se realizó en un agitador orbital a 37°C, durante 24 horas. Finalmente, el número de colonias crecidas en las placas se cuenta manualmente. Todo el material y los medios para el cultivo de microorganismos fueron esterilizados a 121 mm de Hg, durante 20 min.

VI.2 Diseño y desarrollo de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella*.

VI.2.1 Optimización de la extracción de ADN genómico de bacterias.

La obtención de ADN genómico se realizó por el método de Laird y col., 1995. Este método se aplicó tanto a los cultivos puros de bacterias, como en los ensayos con huevo contaminado artificialmente con las diluciones de *S. enteritidis*. La optimización de la extracción de ADN se realizó en las siguientes condiciones:

1ml de cultivo bacteriano, se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 rpm, eliminando el sobrenadante para obtener el precipitado con los microorganismos, al cual se le añade 0,5 ml de tampón de lisis y 5µl de proteinasa K. Se incuba a 55°C en baño maría durante 90 minutos y se enfria en hielo picado, mientras se le agregan 500 µl de isopropanol, se agita en vortex y se congela a -20°C, durante 30 minutos. A continuación, se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 rpm eliminado con cuidado el sobrenadante. El ADN se lava 3 veces con 500 µl de etanol al 70% y se resuspende en 100 µl de agua milli Q ó buffer TE.

Reactivos:

- 1.-Tampón de lisis: 100 mM tris HCl pH8.5, 5mM EDTA (Ethylenediaminetetracetic), 0,2% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 200mM NaCl
- 2.-Proteinasa K: Solución stock 20mg/ml: Disolver 10mg en 0,5ml de agua milli Q
- 3.-Isopropanol 100%
- 4.-Etanol 70%
- 5.- PBS:

NaCl	8g/l
KH ₂ PO ₄	0,2g/l
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2,9/l
KCl	0,2g/l
- 6.-EDTA 5mM pH 8 (18,6 g de EDTA en 100 ml de agua mQ)

VI.2.2 Optimización de la PCR.

La técnica de PCR permite duplicar un número ilimitado de veces un fragmento de ADN en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica pueden generarse millones de copias idénticas, a partir de una molécula de ADN en unas horas. La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas y sólo se precisa un tubo de ensayo, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadenas de nucleótidos que actúan como cebadores. La reacción es un proceso cíclico de entre 20 y 40 ciclos y cada ciclo comprende de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. El proceso se realiza mediante la presencia de una enzima polimerasa termoestable extraída de *Thermus aquaticus* que resiste ciclos de temperatura muy altos. Se deben emplear al menos dos cebadores que, tras unirse por complementariedad a cada una de las cadenas del ADN blanco, delimiten la secuencia diana que se pretende amplificar. La temperatura a la que se realiza la unión de los cebadores es crítica para controlar la especificidad de la reacción y depende exclusivamente de la composición de pares de bases.

Una vez optimizado el método de extracción de ADN, se procede a verificar la eficacia de los cebadores utilizados en la amplificación de un fragmento específico del género *Salmonella* mediante la PCR. En este caso el fragmento de interés comprende una secuencia de 152 pb del gen "hns" (ver pagina 28).

Después de numerosos ensayos preliminares la reacción de amplificación se optimizó en 25µl, utilizando perlas para PCR Ready-To-Go (Amersham pharmacia biotech). A cada tubo eppendorf con la perla se le agrega consecutivamente:

Primer 1 20 pm/µl.....	3µl
Primer 2 20 pm/µl	3 µl
MgCl ₂ (50 mM).....	2 µl
ADN	14 µl
Agua mQ.....	3 µl
Volumen de reacción	25 µl

Los tubos de 0,2 ml con los componentes para la reacción se agitan en el vortex y se someten a los siguientes ciclos de amplificación en un termociclador (Techne Progenie):

Desnaturalización inicial..... 94°C, 5 min

35 ciclos que incluyen:

92°C, 45 sdesnaturalización

60°C, 45 s hibridación

72°C, 90 s..... extensión

Extensión final.....72°C , 10 min.

Reactivos:

1.-Perlas Ready-To-Go PCR para 25 μ l de reacción: 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerasa, 10mM tris-HCl, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de dNTP (dioxinucleosidetriphosphate) y estabilizantes incluidos BSA (Bovine Serum Albumin).

2.-Agua mQ esterilizada por filtración

3.-Primer Gibco BRL

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

Primer 1: TAC CAA AGC TAA ACG CGC AGC T

Primer 2: TGA TCA GGA AAT CTT CCA GTT GC (Jones y col., 1993)

Nota: Todos los reactivos utilizados son libres de DNAsas, RNAsas, DNA, etc.

VI.2.3 Visualización del ADN y los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y col., 1989).

La electroforesis es un método utilizado para separar moléculas presentes en una mezcla, en función de su tamaño. Se basa en el hecho de que las moléculas disueltas se mueven en un campo eléctrico a una velocidad determinada por la relación entre su carga y su masa, a través de un gel a una velocidad inversamente proporcional a la longitud de su cadena (Darnell y col., 1993).

El ADN con carga negativa y pH neutro, migra a través de una matriz (en este caso es la agarosa) en función del tamaño, hacia el polo opuesto.

Preparación del gel:

El gel se preparó al 1,5 % de agarosa en 40ml de amortiguador (TAE), se calienta la mezcla en un matraz, hasta disolver la agarosa y dejar enfriar a una temperatura aproximada de 20° C. Posteriormente, se agregan 0,5µg/ml de bromuro de etidio y se agita hasta distribuir uniformemente. Después, se vierte en la cámara de electroforesis hasta el límite marcado eliminando las burbujas, se coloca el peine. Se deja el gel solidificar a temperatura ambiente, se retiran los topes y se cubre con amortiguador TAE, posteriormente se retira el peine.

Preparación de las muestras para electroforesis

8µl de la muestra que contienen los productos de amplificación por PCR se mezclaron con 2µl de gel loading buffer [Azul de bromofenol 0,05% (w/V), sacarosa 40,0%, EDTA 0,1M, pH 8,0, SDS 0,5% (w/V)]. A continuación, la mezcla se deposita con una micropipeta en los pocillos del gel.

Para todos los ensayos de PCR se colocaba un control negativo que no contenía ADN y marcadores de peso molecular de 100 pares de bases (0,5µl de marcador, 3µl de gel loading buffer y 6,5 µl agua mQ. Una vez cargados los pocillos, se cierra la cámara de electroforesis y se aplica una corriente eléctrica constante de 90 voltios durante aproximadamente una hora. Finalizada la electroforesis, los geles se visualizan en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografían. La visualización de los fragmentos es posible, debido a la presencia del bromuro de etidio, que se intercala entre las moléculas de ADN y fluoresce a 302 nm con la luz UV.

Reactivos:

1.- Agarosa (Gibco)

2.-TAE 50x

242 g -----Tris base

57,1 g ----- Ac. acético Glacial

100 ml ----- EDTA 0,5mM pH 8,0

840 ml ----- Agua mQ

3.-Bromuro de Etidio (Sigma)

4.-Gel loading Solution (Sigma)

5.-Marcador de peso molecular Gibco BRL

VI.3. Utilización de la PCR en la identificación de *Salmonella* en huevo de gallina contaminado artificialmente con *S. enteritidis*.

Los huevos que se utilizaron en los ensayos se esterilizaron utilizando algodón y una solución de cloro al 1% en campana de flujo laminar y se dejan en luz UV durante 10 min. Posteriormente, se hizo una batería de diluciones de la bacteria *S. enteritidis* en el rango de 10^8 a 10^0 ufc/ml de las cuales se toma 1ml para contaminar artificialmente la superficie de cada uno de los huevos. Los microorganismos son recogidos en 250 ml de agua peptonada en vasos de precipitado, se agitan y se dejan reposar durante 10 min. Se toma 1 ml de cada uno de las diluciones y se deposita en un tubo eppendorf. A continuación, se procede a la extracción de ADN, PCR y electroforesis de los fragmentos, de acuerdo al procedimiento mencionado anteriormente.

VI.4 Ensayo para incrementar la sensibilidad de la técnica.

Debido a que la sensibilidad conseguida en el primer ensayo fue 10^4 ufc/ml. Las diluciones 10^3 a 10^0 se dejan en incubación a 37°C en un agitador orbital durante 12 horas para incrementar el número de bacterias y así la sensibilidad aun si se sacrifica el tiempo. Pasado el tiempo requerido se procede a la extracción de ADN, realización de PCR y electroforesis.

VI.5 Evaluación de la técnica en la detección de *Salmonella* en huevos de gallina frescos.

Con la finalidad de evaluar la técnica desarrollada, se realizaron ensayos con huevos frescos para intentar determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*. A 50 huevos frescos se les realizó el procedimiento antes descrito, en los apartados VI.3 y VI.4, solo que a estos no se les esterilizó previamente con la solución de cloro al 1% y luz UV, ni se les contaminó artificialmente con la bacteria.

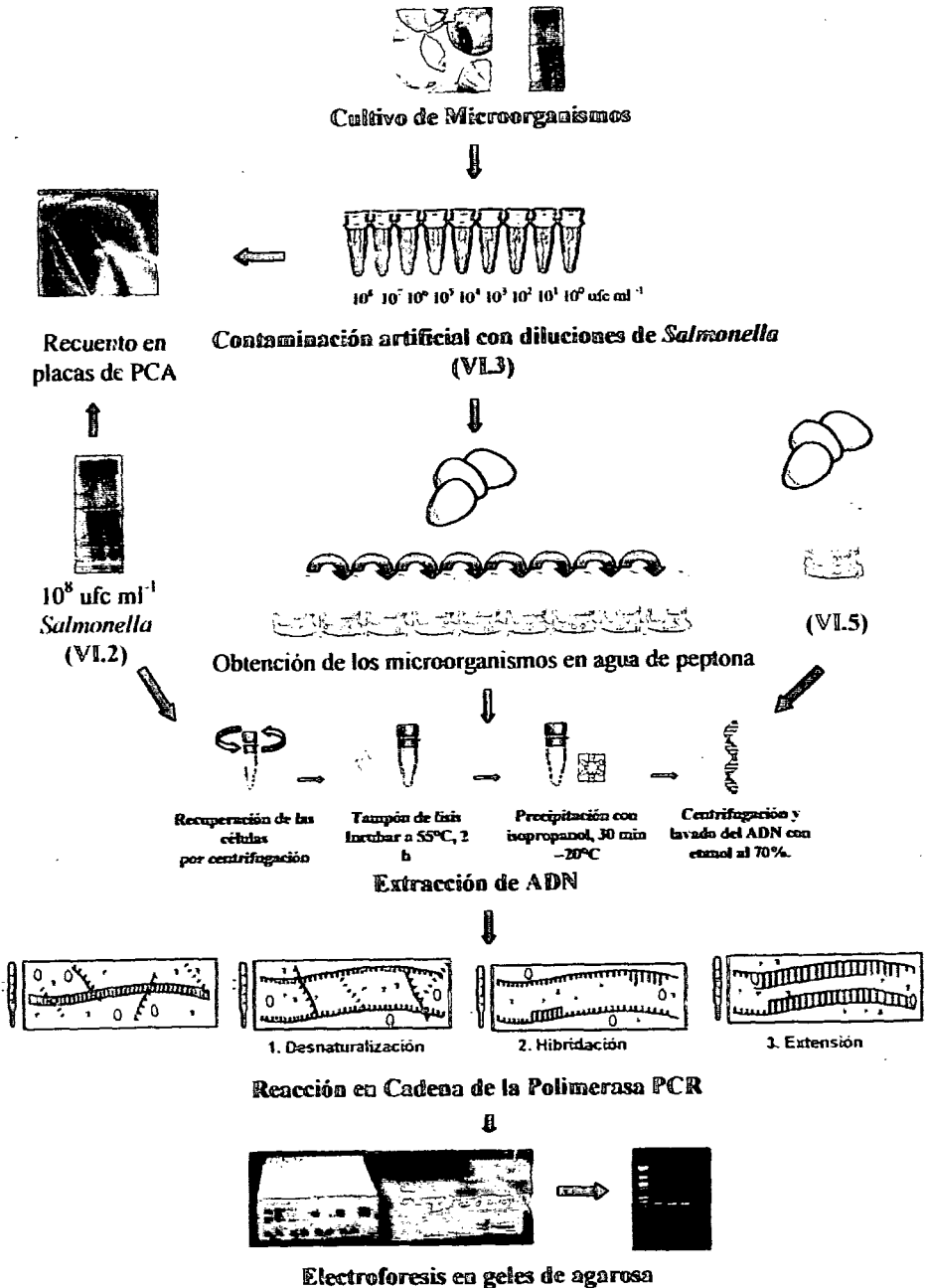


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología.

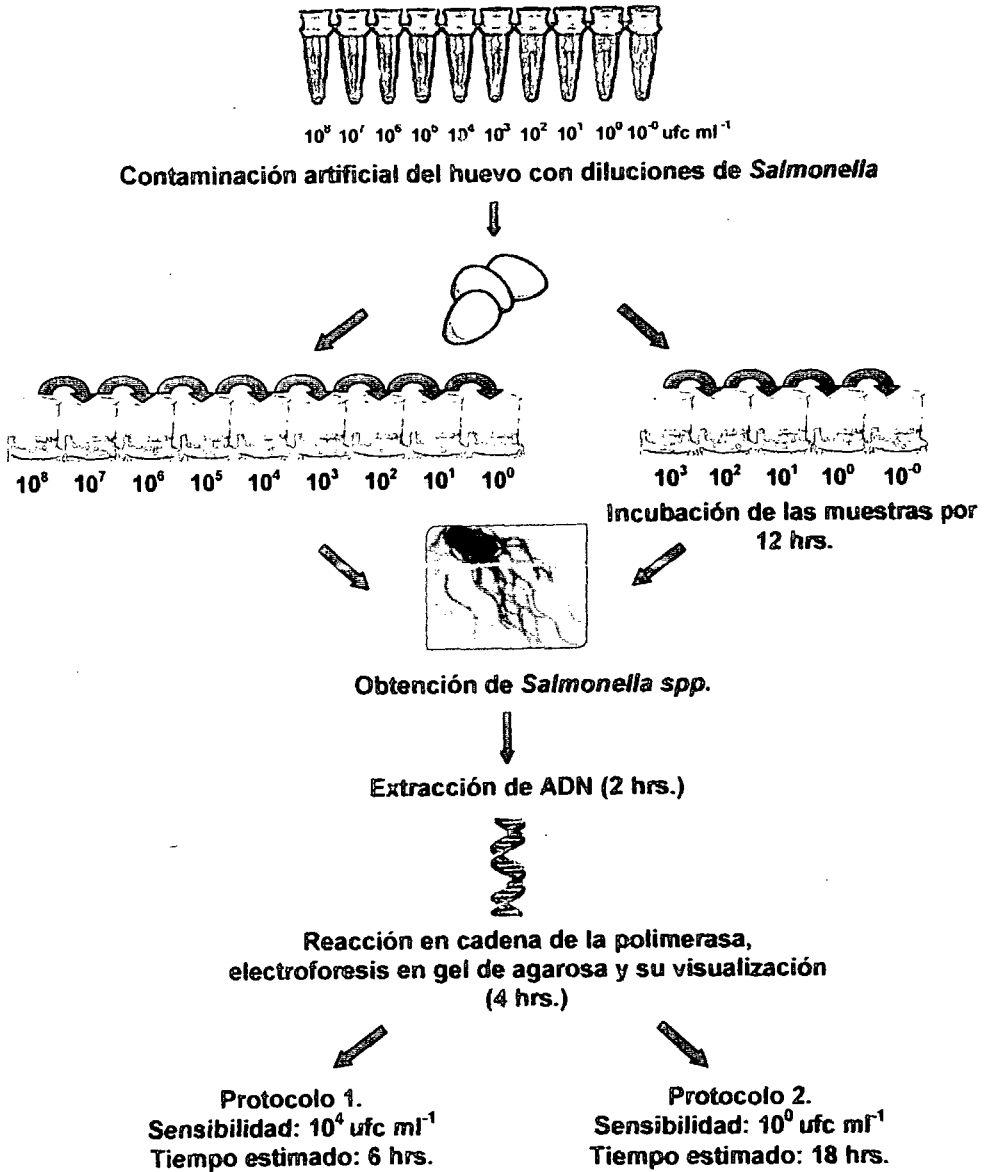


Figura 2. Diagrama de la identificación de *Salmonella* en huevos de gallina mediante 2 protocolos establecidos con la técnica de PCR en los cuales se especifica el tiempo y la sensibilidad estimada para cada uno.

VII. RESULTADOS

VII.1 Obtención de ADN genómico de bacterias.

El método de extracción de ADN seleccionado permitió la obtención de ADN suficiente para la realización de la PCR de las siguientes muestras:

- 1) ADN de cultivos puros de todas las bacterias: *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. typhi* y las de referencia *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- 2) ADN a partir de diluciones de cultivos de *S. enteritidis* comprendidos entre 10^8 a 10^0 ufc ml^{-1} contaminando artificialmente a huevos frescos de gallina.
- 3) ADN de bacterias encontradas en pruebas con huevos frescos de gallina.

VII.2 Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de cultivos puros de *S. enteritidis* con lo cual se comprueba la eficacia de los cebadores seleccionados en la amplificación del fragmento de interés

Para la elección de los cebadores, se realizó una búsqueda bibliográfica, con el fin de decidir que genes podrían resultar interesantes para identificar el género *Salmonella*. De la información bibliográfica recogida, se eligió el gen "hns" que codifica para una proteína de las histonas denominada H1 (M37891) y que tiene una región poco conservada pero con secuencias específicas que reconocen únicamente los serotipos de *Salmonella*. Posteriormente, se realizó una búsqueda en las bases de datos (Gen Bank) con el fin de obtener secuencias del gen hns y comprobar la eficacia de los cebadores seleccionados en la amplificación del fragmento seleccionado, el cual solamente se amplificará en el caso de tener ADN de *Salmonella* en la muestra de estudio. De esta manera, aumenta la especificidad de la prueba al evitar el empleo de cebadores que compartan homologías con secuencias génicas conocidas de microorganismos distintos al que se pretende detectar.

Las secuencias de los cebadores seleccionados son las siguientes (Jones y col., 1993)

Cebador 1 5'-TAC CAA AGC TAA ACG CGC AGC T-3'
(531-552pb) gene "hns" *Salmonella*

Cebador 2 5'TGA TCA GGA AAT CTT CCA GTT GC-3'
(661-682pb)) gene "hns" *Salmonella*

A continuación se muestra la secuencia del gen "hns" y la localización de los cebadores seleccionados (sombreado) en la que se puede observar que el fragmento a amplificar utilizando los cebadores seleccionados es de 152 pb.:

Secuencia del Gen *hns* de *Salmonella enteritidis*.

ID STHNS standard; ADN; PRO; 827 BP.

AC X14375;

DE *Salmonella enteritidis* hns gene for histone-like protein

KW ADN-binding protein; histone homologue; hns gene.

OC Prokaryota; Bacteria; Gracilicutes; Scotobacteria;

OC RX MEDLINE; 90287721.

RA Marsh M., Hillyard D.R.;

RT "Nucleotide sequence of hns encoding the ADN-binding protein H-NS

RT of *Salmonella enteritidis*";

RL Nucleic Acids Res. 18:3397-3397(1990).

SQ Sequence 827 BP; 258 A; 178 C; 178 G; 213 T; 0 other;

X14375 Length: 827 November 16, 1995 11:38 Type: N Check: 5824

1 CGAGAACGTA TCAGAGATGA CGTGCGAGATA GTCGTATTCA TCCATGATAA
51 AATGTGACCT GACTCCTAAA TTTTATAGCGA CAGACGGTGA GTATCCCCC
101 CGCCAATAAG CTCTTTTTTG TGCGGTGCCT CAAGCAAAT TTAAGTTGAG
151 ATAATTA AAA CGTGTGCTTA ATAAAGCGTA ATTTGAATT CCTTACATTC
201 CTGGCTATTG CACAAC TGAA TTTATCGCTC TATTATTAGC TCAACAAACC
251 ACCCAATAT AAGTTTGAGA TTAATAACAAT GAGCGAAGCA CTAAAATTC
301 TGAACAACAT CCGTACTCTT CGTGCGCAGG CAAGAGAATG TACTCTGGAA
351 ACGCTTGAAG AAATGCTGGA AAAATTAGAA GTTGTCGTTA ATGAGCGTGC
401 TGAAGAAGAA AGCGCTGCTG CTGCTGAAGT GGAAGAACGC ACTCGTAAAC
451 TGCAACAGTA TCGTGAAATG TTAATTGCCG ACGGCATTGA CCCGAATGAA
501 CTGCTGAATA GCATGGCTGC CGCTAAATCC GG [REDACTED] [REDACTED]
551 [REDACTED] CGTCCG GCTAAATATA GCTATGTTGA CGAAAACGGT GAAACTAAAA
601 CCTGGACTGG CCAGGGTCGT ACACCGGCTG TAATCAAAA AGCAATGGAA
651 GAACAAGGTA A [REDACTED] AGGAAT AATTTACTTC
701 CTGGATGCTT AAAATCCCGC CGCTGGCGGA TTTTTTTTGC CTGAGTTCTC
751 CGCTGACGAC CCCAGGCATA AAAAAAGCGC CGGATTACC AGCGCTTCTG
801 TTAAAAATTT ATACGTCGTT ACTTCTT

Se lograron optimizar las condiciones para la reacción de PCR a partir del ADN extraído de las especies de las bacterias seleccionadas, esto demuestra que los procesos de búsqueda bibliográfica y el control de las condiciones experimentales fueron las correctas. En la fase preliminar se comprobó la eficiencia y especificidad de los cebadores al realizar PCR a cuatro géneros de *Salmonellas* (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* y *S. typhi*) y las bacterias de referencia: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La figura 3 muestra los resultados de la prueba de especificidad de los cebadores para el género *Salmonella* en donde se pueden apreciar las bandas de amplificación del fragmento de interés de 152 pb, obtenidas a partir de cultivos puros de 10^8 ufc ml^{-1} de las bacterias antes mencionadas. Como se observa, los carriles 2, 3, 4 y 5, corresponden a los fragmentos de amplificación de las 4 salmonellas probadas en este estudio y como se esperaba, con el resto de las bacterias de referencia, no se presentó amplificación, lo que confirma la especificidad de los cebadores para amplificar únicamente las especies del género *Salmonella*.

VII. 3 Evaluación de la técnica de PCR en la detección de *S. enteritidis* en huevos frescos de gallina contaminados artificialmente.

Los ensayos realizados en huevos frescos de gallina contaminados artificialmente con las concentraciones de 10^8 - 10^0 ufc ml^{-1} , demostraron que el límite de detección de la técnica aplicada a cultivos puros contaminando artificialmente a los huevos estériles, fue 10^4 ufc ml^{-1} (figura 4), por lo que se realizaron varias pruebas para que la técnica alcanzara una sensibilidad de 10^0 ufc. Finalmente, la sensibilidad deseada se obtuvo incubando las muestras de huevo estéril, contaminado artificialmente con las concentraciones comprendidas entre 10^3 - 10^0 , durante 12 h, antes de realizar los ensayos de PCR. La figura 5 muestra los resultados de un gel de agarosa al analizar *S. enteritidis* contamiando artificialmente a huevos frescos, en el cual se puede apreciar que la banda de amplificación de 152 pb es visible hasta la concentración de 10^0 ufc ml^{-1} . Con lo cual se puede confirmar que la técnica es tan sensible que al haber en la muestra una célula es capaz de

detectarla. Por el contrario en el carril 6 donde no existe células no se aprecia la banda de amplificación del fragmento de interés.

VII.4.- Evaluación de la técnica en la detección de *Salmonella* en huevos frescos de gallina.

Se realizaron 50 ensayos con huevos frescos de gallina para evaluar la aplicabilidad de la técnica en la detección de *Salmonella*, en los cuales se pudo comprobar la eficacia de la técnica, ya que los resultados obtenidos fueron 8 huevos contaminados con *Salmonella* de los 50 analizados. En la figura 6 se observan los resultados obtenidos al analizar los productos de PCR de las pruebas realizadas en huevos frescos, en la evaluación de la presencia o ausencia de *Salmonella*. En el carril 6 se puede observar el fragmento de 152 pb indicando el resultado positivo de una muestra contaminada con *Salmonella*.

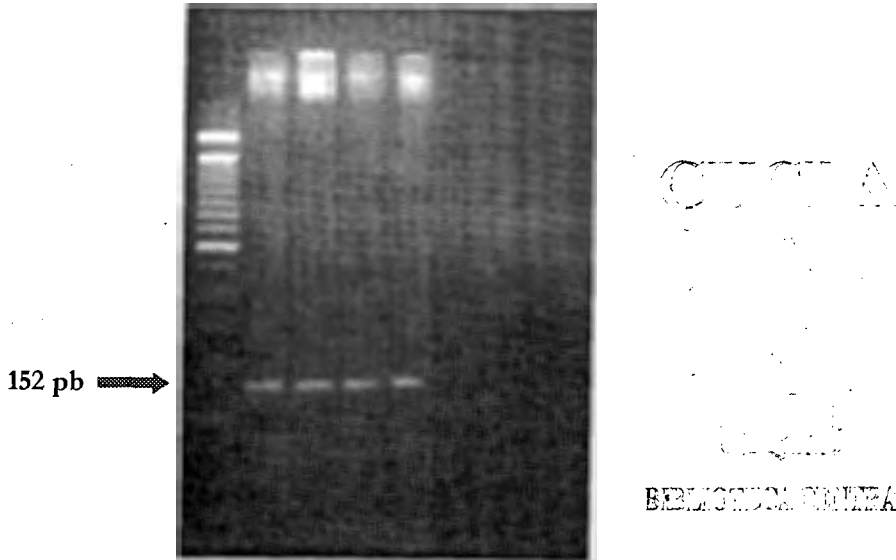


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de cultivos puros a una concentración de 10^8 ufc ml^{-1} . 1) marcadores moleculares (100 pb), 2) *Salmonella enteritidis*, 3) *Salmonella typhimurum*, 4) *Salmonella choleraesuis*, 5) *Salmonella typhi*, 6) *Listeria monocytogenes*, 7) *Staphylococcus aureus*, 8) *Escherichia coli*.

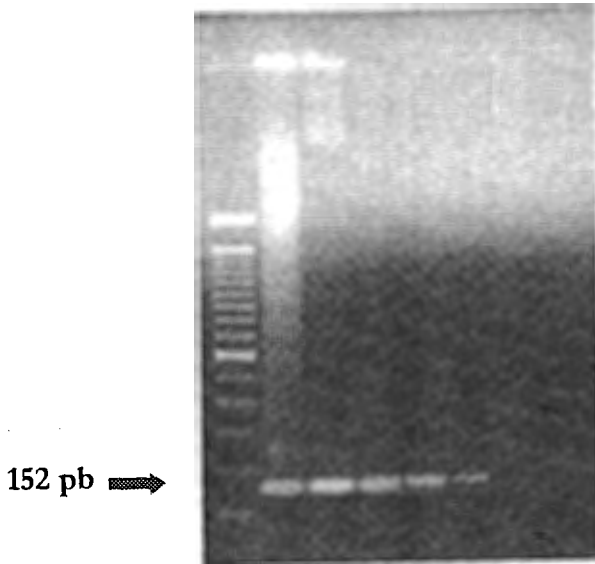


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de un cultivo de *S. enteritidis* contaminando artificialmente a huevos estériles con las siguientes concentraciones. 1) marcadores moleculares (100 pb), 2) 10^8 , 3) 10^7 , 4) 10^6 , 5) 10^5 , 6) 10^4 , 7) 10^3 , 8) 10^2 ufc ml⁻¹.

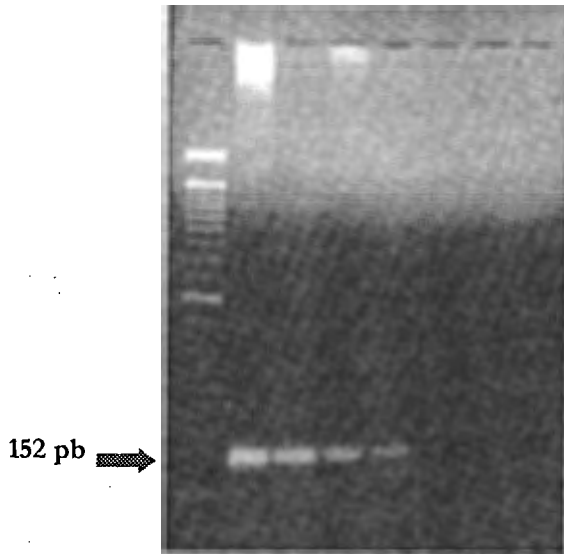


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de un cultivo de *S. enteritidis* contaminando artificialmente a huevos estériles, incubados durante 12 hrs., con las siguientes concentraciones. 1) marcadores moleculares (100 pb), 2) 10^3 , 3) 10^2 , 4) 10^1 , 5) 10^0 , 6) 10^0 ufc ml^{-1} , 7) control negativo.

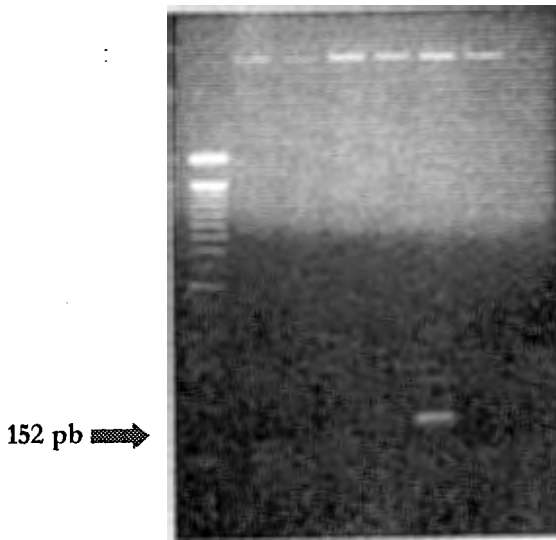


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de los microorganismos presentes en huevos frescos de gallina.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten la detección de *Salmonella* en huevos frescos de gallina de manera rápida, sensible y específica. La utilización de la PCR en el diagnóstico de este patógeno en alimentos contaminados permite alcanzar la máxima capacidad de detección de hasta una célula (10^0 ufc ml^{-1}), después de una incubación previa de 12 h..

La sensibilidad alcanzada en el presente trabajo, es mayor que la descrita empleando otras técnicas de diagnóstico como los métodos inmunoenzimáticos ELISA (Robinson y col., 1983; Candlish, 1991), el perfil plasmidico (Scheinbach y Hong, 1988), la citometría de flujo (McClelland y Pinder, 1994), la impedancia (Firstenberg-Eden, 1983), entre otros.

Es importante mencionar que se consiguió el desarrollo de dos protocolos para la detección de este patógeno (Figura 2) en los que se muestran procedimientos similares pero con sensibilidad distinta. En el primer protocolo se obtuvo una sensibilidad de 10^4 ufc ml^{-1} en un tiempo de 6 hrs. Tomando en cuenta que la norma oficial mexicana para *Salmonella* en alimentos (NOM-114-SSA1-1994) exige la ausencia de *Salmonella* en los mismos, fue necesario el desarrollo de un segundo protocolo que permitiera detectar la presencia y ausencia de este patógeno en el huevo, para lo cual fue necesario sacrificar la rapidez del primer protocolo para incrementar la sensibilidad ya que se incluyó un periodo de incubación de 12 horas de las muestras con las diluciones comprendidas entre 10^3 a 10^0 . Con este segundo protocolo, obtuvimos la sensibilidad deseada aunque el tiempo de realización fue de 18 horas, que sigue siendo mas corto que los métodos convencionales..

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, podemos aplicar estos dos protocolos a muestras de alimento dependiendo de las circunstancias, por ejemplo: el protocolo 1 se puede aplicar a muestras de alimento en las cuales se sospeche la presencia de *Salmonella* en concentraciones muy elevadas, es decir por arriba de 10^4 ufc ml y el protocolo 2 a muestras en las que sea indispensable demostrar la presencia o ausencia de este patógeno.

Finalmente, la técnica desarrollada, reúne una serie de características, como son la especificidad, rapidez y bajo costo, que hacen de ella una firme candidata para sustituir a las técnicas actuales de diagnóstico de *Salmonella* en alimentos e implantarse como técnica rutinaria de diagnóstico en los laboratorios de nuestro país.

IX. CONCLUSIONES

1. El método de extracción de ADN empleado resultó ser eficaz tanto para cultivos puros, como para el huevo contaminado artificialmente con *S. enteritidis*.
2. Los cebadores seleccionados, fueron específicos para amplificar por PCR el fragmento de 152 pb en las 4 especies del género *Salmonella* probadas.
3. El método de detección desarrollado en este trabajo, permitió la amplificación de un fragmento específico de 152 pb, a partir del ADN extraído de *S. enteritidis* contaminando artificialmente a huevos frescos de gallina en el intervalo comprendido entre 10^8 y 10^0 ufc ml^{-1} .
4. La sensibilidad de la técnica se incrementa notablemente al agregar un período de incubación de 12 horas. El límite de detección conseguido fue 10^0 ufc ml^{-1} tanto en huevos contaminados artificialmente como en huevos frescos sin contaminar.
5. La evaluación de la técnica en huevos frescos, permitió la detección de 8 huevos contaminados con *Salmonella* de 5Q analizados.



X. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, E.S. (1964) The phage typing of *Salmonella* other than *S. typhi*, in van Oye, E. (ed.). *The World Problem of Salmonellosis*. The Hague: Dr. W. Junk: 89-110.

Anderson, E.S., Ward, L.R., de Saxe, M.J. y de Sa, J.D.H. (1977) Bacteriophagetyping designations of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Hygiene*. 78: 297-300.

Archer, D.L. (1985) Enteric microorganisms in rheumatoid diseases: Causative agents and possible mechanisms. *J. Food Protection*. 48: 538-545.

Archer, D.L. y Young, F.E. (1988) Contemporary issues. Diseases with a food vector. *Clin Microbiol Rev*. 1: 377-398.

Barker, R.M. y Old, D.C. (1989) The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of *Salmonella*. *Journal of Medical Microbiology*. 29: 81-88.

Bickley, J., Short, J.K., McDowell, D.G. y Parkes, H.C. (1996) Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*. 22, 153-158.

Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7, 1513-1523.

Board, R.G. (1964) The growth of gram-negative bacteria in the hen's egg. *J. Appl. Bacteriol*. 27: 350-364.

Brenner, D.J. (1984) Facultatively anaerobic gram-negative rods', in Krieg, N.R. and Holt, J.C. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (vol. 1), Baltimore: Williams and Wilkins. 408-516.

- Brooks, J. (1960) Mechanism of the multiplication of *Pseudomonas* in the hen's egg. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 350-509.
- Brooks, J. y Taylor, D.J. (1955) Eggs and egg products. *Food investigation, Special report n° 60*. H. M. Stationery Office, London.
- Brown, W.E., Baker, R.C. y Naylor, H.B. (1970) The effect of egg position in storage on susceptibility to bacterial spoilage. *Can. Inst. Food Technol. J.* 3: 29-32.
- Candlish, A.A.G. (1991) Immunological methods in food microbiology. *Food Microbiology.* 8:1-14.
- Clark, R.B. y Engvall, E. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. *Enzyme Immunoassays*. E.T. Maggio (ed.), Claveland, CRC Press. 167-179.
- Cox, W.A., Fung, D.Y.C., Bailey, J.S., Hartman, P.A. y Vasavada, P.C. (1987) Miniaturized kits, immunoassays and DNA hybridation assay for recognition and identification of foodborne bacteria. *Dairy Food Sanitary.* 7, 628-631.
- D'Aoust, J. -Y. (1989) *Salmonella* in Doyle, M.P. (ed.). *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker: 327-445.
- Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. (1993) *Biología Celular y Molecular*. 2ª edición. Omega, S.A. Barcelona. 211.
- Dickinson, J.H., Kroll, R.G. y Grant, K.A. (1995) The direct application of the polimerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology.* 20, 212-216.

Docherty, L., Adams, M.R., Patel, P. y McFadden, J. (1996) The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. *Letters in Applied Microbiology*. 22, 288-292.

Earnshaw, R. Y Gidley, J. (1992) Molecular methods for typing bacterial food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*. 2, 39-43.

Fach, P. Y Guillou, J.P. (1993) Detection by in vitro amplification in the alphatoxin (phospholipase C) gene from *Clostridium perfringens*. *Journal of Applied Bacteriology*. 74, 61-66.

Ferreraz, R. (1996) Medicina Interna. Mosby/Doyma libros. 13° edición, CD-ROM. México. 2289-2295.

Fica, A., Fernández, A., Prat, S., Figueroa, O., Gamboa, R., Tsunekawa, I., Heitmann, I. (1997) *Salmonella enteritidis*; un patógeno emergente en Chile. *Revista Médica Chilena*. 125: 544-51.

Firstenberg-Eden, R. (1983) Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technology*. 37: 64-70.

Frank, J.F., Hanken, L., Kobruger, J.A. y Marth, E.H. (1985) Tests for groups of microorganisms. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 15 th ed. G.H. Richardson (ed.), American Public Health Association, Washington. D.C. 194-197.

Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993) Microbiología de los alimentos. 4° edición. ACRIBIA. Zaragoza, España. 556-564.

Freeman, B. (1989) Microbiología de Burrows. Interamericana/McGraw-Hill. 22° edición. México. 526-532.

Fung, D.Y.C. (1984) Rapid and automatic methods of microbiological analysis. *Proceeding of Industry of Meat Research Conference*. 1-5.

García, M.J., Zuñiga, M. y Urruburu, F. (1991) Métodos directos de medida de crecimiento bacteriano. *Alimentaria* 9, 31-34.

Haines, R.B. (1939) Microbiology in the preservation of the hen's egg. G.B. *Dep. Sci. Ind. Res. Food Invest. Board. Spec. Rep.* 47.

Hornes, E., Wasteson, Y. y Olsvik, O. (1991) Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 29, 2375-2379.

<<http://www.eufic.org/sp/food/pag/food14/food144.htm>> (2001)

International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) (1978) *Microorganisms in Foods. I. Their Significance and Methods of Enumeration* (2nd ed). Toronto: University of Toronto Press: 160-172.

International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) (1980) *Microorganismos en los Alimentos*. ACRIBIA. Zaragoza, España.

International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) (1985) *Ecología Microbiana de los Alimentos 2. Productos alimenticios*. ACRIBIA, Zaragoza, España. 526-572.

International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) (1996) *Microorganismos de los Alimentos. Características de los patógenos microbianos*. ACRIBIA. Zaragoza, España. 263.

Jay, J.M. (1994) *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 3^{ra} edición. ACRIBIA. Zaragoza, España. 116, 124-127.

Jones, D.D., Law, R. y Bej, A.K. (1993) Detection of *Salmonella spp* in oysters using polymerase chain reaction (PCR) and gene probes. *Journal of Food Science*. 58:6, 1191-1197.

Kell, D.B. y Davey, C.L. (1990) Conductimetric and impedimetric devices. *Biosensor, A practical Approach*. Cass, A. E.G. (ed) Oxford: Oxford University Press. 125-154.

Kelley, M.T., Brenner, D.J. y Farmer, J.J. III. (1985) Enterobacteriaceae, in E.R. Lennette, Balows, A., Hausler, W.J. y Shadomy, H.J. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology* (4th ed.), Washington DC: American Society of Microbiology: 263-277.

Kroll, R.G. (1985) A cytochrome oxidase test for the rapid detection of psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Applied Bacteriology*. 59, 484-489.

Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. y Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*. 19, 4293.

Le Minor, L. y Popoff, M. (1987) Designation of *Salmonella enterica sp. nov., nom. Rev.*, as the type and species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37: 465-468.

Lifshitz, A., Baker, R.C., Naylor, H.B. (1964) The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. *J. Food Sci.* 29, 94-99.

Martínez, A. y Rodrigo, M. (1987) Métodos rápidos en el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 27, 15-23.

McClelland, R.G. y Pinder, A.C.P. (1994) Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *An applied and environmental Microbiology*. 60: 4255-4266.

McCrary, M.H. (1915) The numerical interpretation of fermentation tube result. *Journal of Infectious Diseases*. 17, 183-212.

McPherson, M.J. y Møller, S.G. (2000) PCR. Bros, Springer. New York Inc. 1-3

Montarjemi, Y. (1999) Vigilancia de las ETA: una herramienta esencial para el desarrollo de las políticas de protección alimentaria. *INPPAZ en las Américas*. N°7. Noviembre. 8-9.

NOM-114-SSA1-1994: Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Método para la detección de *Salmonella* en alimentos. Secretaría de Salud publicado en el Diario Oficial de la Federación (09-22-95).

Olive, D.M. (1989) detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 261-265.

Parker, M.T. (1984) *Salmonella*, in G.R. Smith (ed.) *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Baltimore: Williams and Wilkins: 332-355.

Parrilla, M., Vázquez, J., Saldade, E., Nava, L. (1993) Brotes de toxicoinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Publica de México*. Septiembre-Octubre. Vol. 35. N°5.

Quesneau, R. (1983) La luminiscence. *Technologie du Lait*. 974, 49-59.

Ramplng, A., Upson, R., Brown, D.F. (1990) Nitrofurantoin resistance in isolates of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from poultry and humans. *Journal Antimicrobial Chemother.* 25: 285-90.

Rasmussen, H.N., Rasmussen, O.F., Christensen, H y Olsen, J.E. (1995) Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 563-568.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wills, J.G., Davis, B.R. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J.* 308: 681-685.

Robinson, B.J., Pretzman, C.I. y Mattingly, J.A. (1983) Enzyme immunoassay in which a myeloma protein is used for detection of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1816-1821.

Rose, F.B., Camp, C.J., Estes, E.J. (1987) Family outbreak of fatal *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. *Am. J. Med.* 82: 636-637.

Rose, S.A. y Stringer, M.F. (1989) Immunological methods. *Rapid Methods in Food Microbiology*. Vol. 26.M.R: Adams y C.F.A. Hope (eds.), Surrey, Reino Unido. 121-167.

Sauveur, B. (1990) El huevo para consumo: bases productivas. Traductor (Buxadé, C.) 1993. Mundi-Prensa. AEDOS. INRA, España. 281-285, 384-387.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 6-6.23.

Scheinbach, S. y Hong, S.I. (1988) Detection of resident population of *Salmonella* and *Escherichia coli* in food ingredients by plasmid analysis. *Food microbiology*. 5: 235-241.

Shangkuan, Y.H., Show, Y.S. y Wang, T.M. (1995) Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio Cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Applied Bacteriology*. 33, 758-767.

Smith, J.L., Palumbo, S.A. y Walls, I. (1993) Relationships between foodborne bacterial pathogens and reactive arthritides. *Journal of Food Safety*. 13: 209-236.

Speck, M.L. (ed) (1984) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (2nd ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

St. Louis, M.E., Morse, D.L., Potter, M.E., DeMelfi, T.M., Guzewich, J.J., Tauxe, R.V., Blake, P.A. (1988) The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of Salmonellosis. *Journal of Applied Microbiology Abstract*. 259: 2103-7.

Strachan, N.J.C. y Gray, D.J. (1995) A rapid general method for the identification of PCR products using a fiber-optic biosensor and its application to the detection of *Listeria*. *Letters in Applied Microbiology*. 21, 5-9.

Towsend, D.E., Ashdown, N., Bolton, S. y Grubb, W.B. (1985) The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid isolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable and plasmid DNA suitable for in vitro manipulation. *Letters in Applied Microbiology*. 77, 137-143.

Uzal, F.A., Plumb, J.J., Blackall, L.L., O'boyle, D. y Kelly, W.R. (1996) Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Letters in Applied Microbiology*. 23, 13-17.

Vadehra, D.V., Baker, R.C., y Naylor, H.B. (1970) Infection routes of bacteria into chicken eggs. *J. Food Sci.* 35, 61-62.

Van Schothorst, M., Van Leusden, F.M., De Gier, E., Runierse, V.F.M. y Veen, A.J.D. (1979) Influence of reconstitution on isolation of *Salmonella* from dried milk. *Journal of Food Protection*. 42: 936-937.

Van Vunakis, H. (1980) Radioimmunoassays: an overview. *Methods in Enzymology*. 70, 201-210.

Varela, P., Rivas, M., Binsztejn, N., Cremona, M.L., Hermann, P., Burrone, O., Ugalde, R.A. y Frasc, A.C.C. (1993) Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from the Argentine outbreak by PCR for ctxA1 and ctxA2-B. *FEBS Letters*. 315, 74-76.

Vassiliadis, P. (1983) The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: an overview. *Journal of Applied Bacteriology*. 54: 69-76.

Warburton, D.W., Arling, V., Worobec, S., Mackenzie, J. (1994) A comparison study of the EF-18 agar/Hydrophobic Grid Membrane Filter (HGFM) method and the enzyme linked antibody (ELA)/HGFM method to the HPB standard method in the isolation of *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 277-289.

Wegmuller, B., Luthy, J. y Candrian, U. (1993) Direct PCR detection of *C. Jejuni* and *C. coli* in raw milk and Dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (7), 2161-2165.

Wood, JM. y Gibbs, P.A. (1982) New developments in the rapid estimation of microbial populations in foods. En *Developments in Food Microbiology*. R. Davis (ed.), Applied Science Publisher, London. 183-214.