

1997-A/2001-A

193209311

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 leche de vaca utilizando
la técnica de PCR”**

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

PRESENTA:

AIDA ALEJANDRA GUERRERO DE LEÓN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Noviembre 2001



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

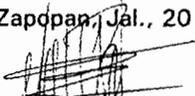
**C. AIDA ALEJANDRA GUERRERO DE LEON
PRESENTE.**

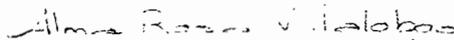
Manifiestamos a Usted que con esta fecha a sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "DESARROLLO DE UN METODO RAPIDO DE DETECCIÓN DE SALMONELLA EN LECHE DE VACA UTILIZANDO LA TÉCNICA PCR", para obtener la Licenciatura en Biología

Al mismo tiempo le informamos que a sido aceptado como Director de dicho trabajo el DRA. RC SALBA GUTIERREZ ROJO.

**ATENTAMENTE
" PIENSA Y TRABAJA "**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 20 de julio del 2000


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


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

c.c.p. ING. INDALECIO RIVERA PLASCENCIA.- Director del Trabajo.
c.c.p. ING. JUAN BOJORQUEZ MARTINEZ.- Asesor
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/ARVA:gaby*

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
 DE LA DIVISION 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: " Desarrollo de un método rápido para la detección de Salmonella en leche de vaca utilizando la técnica de PCR" con el título: Salmonella en leche de vaca 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 14 Noviembre del 2001

EL DIRECTOR DE TESIS



EL ASESOR

Rosalba Gtz R.
 NOMBRE Y FIRMA

 NOMBRE Y FIRMA

COORDINACIÓN DE CARRERAS
 LICENCIADO EN BIOLOGÍA

1.- Firma Rosa Villalobos Arámbula
 NOMBRE COMPLETO

Alma Rosa Villalobos
 FIRMA

2.- Anne Santerre Lucas
 NOMBRE COMPLETO

ASanterre
 FIRMA

3.- Josefina Casas Solis
 NOMBRE COMPLETO

Josefina Casas S.
 FIRMA



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

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

Laboratorio de Microbiología Molecular

Director: Dra. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO

Agradecimientos:

*A mis padres por haberme inculcado el deseo de superación en la vida.

*A mi tía Ofelia por su apoyo incondicional.

*A Carmen Alvarez y Yazmín Torres por su amistad y por su colaboración en el desarrollo de mi tesis.

*A la Dra. Rosalba 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.

*A todos mis amigos y compañeros mi más grato recuerdo

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	
II.1 INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS.....	2
II.1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	3
II.1.2 Calidad higiénica de la leche.....	4
II.2 SALMONELAS	
II.2.1 Características generales.....	7
II.2.2 Infecciones causadas por salmonelas.....	8
II.2.3 Epidemiología y distribución en la naturaleza.....	9
II.2.4 Detección y recuento.....	9
II.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	10
II.4 UTILIZACIÓN DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPOTESIS.....	15
V. OBJETIVOS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1. Cultivo 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.	21
VI.3. Aplicación de la técnica de PCR en la identificación de <i>Salmonella</i> en muestras de leche UHT inoculadas artificialmente.	
VI.3.1 Inoculación de microorganismos a la leche control UHT.....	22
VI.3.2 Ensayos para incrementar la sensibilidad de la técnica.....	23
VI.3.3 Evaluación de la técnica en la detección de <i>Salmonella</i> en muestras de leche pasteurizada.....	23
VII. RESULTADOS	
VII.1 Obtención de ADN genómico de bacterias.....	26
VII.2 Desarrollo de la PCR a partir cultivos puros de <i>S. typhimurium</i> para Probar los cebadores seleccionados	26
VII.3 Evaluación de la técnica de PCR en la detección de <i>S. typhimurium</i> en muestras de leche artificialmente contaminada.....	29
VII.4. Evaluación de la técnica en la detección de <i>Salmonella</i> en muestras de leche pasteurizada.....	30
VIII. DISCUSION	34
IX. CONCLUSIONES	36
X. BIBLIOGRAFÍA	37

I.- RESUMEN

En la industria de los alimentos la detección rápida de microorganismos patógenos es fundamental para garantizar la calidad higiénica de los productos. Así mismo, la rapidez y sensibilidad del método utilizado repercute en las ventas y en los ingresos económicos que de ellos se generen. En los últimos años los avances realizados en el área de la biología molecular e ingeniería genética, han permitido el desarrollo de la técnica "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR), que ha revolucionado diferentes áreas en la investigación científica, debido a su sensibilidad, especificidad y rapidez (Saiki y col., 1985). La utilización de la PCR podría suponer un salto importante en la industria de alimentos de nuestro país, innovando las formas de detección de microorganismos y minimizando los tiempos de obtención de resultados.

Las enfermedades ocasionadas por el consumo de alimentos se han incrementado en los últimos años en México y en el mundo (SSA, 2001). Actualmente *Salmonella* spp continúa siendo uno de los agentes causales más frecuentes de enfermedades originadas por el consumo de alimentos (Lacey, 1993). En particular la leche fresca de vaca se encuentra implicada en los brotes de salmonelosis debido a que por sus características químicas constituyen un excelente medio para el desarrollo de microorganismos (Marth, 1969).

Los resultados de este trabajo demuestran que la sensibilidad de la técnica desarrollada, permite determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en leche, con un límite de detección de 10^3 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 INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

En la actualidad la inocuidad alimentaria se ha convertido en una prioridad, tanto para la salud pública como para asegurar la competitividad y posicionamiento de productos en el mercado internacional, por esta razón, surge la necesidad de implementar buenas prácticas de manufactura (GMP's) en el proceso de elaboración de los alimentos. Un alimento inocuo es aquel que no representa ningún riesgo para la salud, brinda seguridad al consumidor y representa un apoyo fundamental en salud pública, porque se reducen los índices de intoxicaciones causadas por su consumo. El proceso de fabricación y manipulación de alimentos requiere un control de calidad higiénico muy estricto debido a que las materias primas son de origen animal o vegetal y por lo general siempre están contaminados. Por lo tanto entre las cualidades deseables para la calidad de los alimentos está la exención de microorganismos infecciosos. Si bien es imposible conseguir una tolerancia cero para todos los microorganismos con los procedimientos correctos de fabricación (GMPs), la producción de alimentos con un número más bajo de microorganismos infecciosos es el objetivo deseable.

Los procedimientos clásicos para controlar la calidad microbiológica se basan principalmente en las determinaciones microbiológicas tanto en las materias primas como en los productos acabados, aunque para algunos productos el tiempo necesario para obtener resultados es excesivamente largo. Así, el descubrimiento y el uso de métodos rápidos de diagnóstico han sido de gran utilidad.

El Sistema de Análisis de Riesgo Identificación y Control de Puntos Críticos (ARICPC) es el método que tiene como objetivo garantizar la inocuidad de los alimentos desde la granja hasta las casas particulares. Los criterios microbiológicos consisten en normas, especificaciones y recomendaciones que minimizan los riesgos microbianos, y han sido útiles para asegurar la salubridad y la calidad de los alimentos (James, 1992).

II.1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

Normalmente, el término "intoxicación alimentaria", se aplica a enfermedades producidas por microorganismos y se utiliza tanto para designar a las enfermedades producidas por la ingestión de toxinas elaboradas por los microorganismos, como para designar a aquellas otras debidas a la infección del hospedador a través del tracto intestinal. Sin embargo, el conjunto de enfermedades alimentarias se clasifica en intoxicaciones e infecciones.

Intoxicaciones: Las intoxicaciones se ocasionan por la presencia de una toxina bacteriana que se ha originado en el alimento. Las intoxicaciones más comunes son: el botulismo, originado por la presencia de la neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* y la intoxicación estafilocócica, originada por la toxina de *Staphylococcus aureus*.

Infecciones: Las infecciones se refieren a las enfermedades alimentarias originadas por la entrada de bacterias en el organismos debido a la ingestión de alimentos contaminados.

Las infecciones más comunes se dividen en dos tipos:

- 1) Aquéllas en las que los microorganismos patógenos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el alimento sólo actúa como vehículo de transmisión, por ejemplo enfermedades como la tuberculosis, la difteria, la disentería, la fiebre tifoidea, el cólera, la hepatitis infecciosa, la fiebre Q, etc.
- 2) Aquéllas en las que los alimentos pueden servir de medio de cultivo para que los microorganismos patógenos se multipliquen en él y alcancen cifras que aumentarán la posibilidad de que el consumidor se infecte. En este tipo de enfermedades se incluyen las producidas por: *Salmonella*, *Vibrio parahemolyticus* y *Escherichia coli* enteropatógeno (Frazier y Westhoff, 1993).

II.1.2 Calidad higiénica de la leche

La leche es el primer alimento de consumo para el hombre, especialmente en la alimentación infantil, es por ello que la industria láctea tiene la obligación de satisfacer las necesidades del hombre y ofrecer un alimento inocuo, asegurando así la salud de los consumidores, aunque para ello se requiera de métodos de control de calidad muy complejos. La leche se define como un producto íntegro del ordeño completo e interrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada. Ha de ser recogida higiénicamente y no debe tener calostro. Tal es la definición adoptada por el I Congreso Internacional para la Represión de los Fraudes en los Alimentos, que tuvo lugar en Ginebra en 1908. Por sus características físico-químicas la leche es un líquido blanco, opaco dos veces más viscoso que el agua, de sabor ligeramente azucarado y de olor acentuado, sus nutrientes varían dependiendo de la raza, pero la leche de vaca generalmente consumida contiene los siguientes nutrientes: agua (88,0%), proteínas (3,2%), grasa (3,4%), lactosa (4,7%), minerales (0,72%) (Veisseyre, 1988).

La leche de consumo común puede clasificarse en: leche cruda que no ha sido sometida a ningún tratamiento, leche comercial que es la leche fresca que se consume en forma líquida y ha sufrido algún tipo de tratamiento térmico (leche pasteurizada), la leche tratada a altas temperaturas ó UHT (Ultra High Temperature), la leche evaporada, concentrada y condensada (a la que se le ha extraído parcialmente el agua), la leche en polvo y la leche fermentada (sometida a una fermentación láctica antes de su consumo) (Brissenden, 1981).

Microbiología de la leche

Los componentes de la leche hacen que ésta sea un medio óptimo para el crecimiento de muchos microorganismos, incluidos mohos y levaduras. Sin embargo, sus características químicas, la convierten en un medio selectivo debido a la presencia de la lactosa. La leche contiene también sustancias que pueden inhibir el

desarrollo de bacterias como son la inmunoglobulinas, lisozimas y transferrina entre otros (Reiter, 1978).

Entre los microorganismos que se encuentran en la leche están los alterantes, los fermentadores y los patógenos. La presencia de estos microorganismos depende de varios factores como son la salud de la vaca, el medio (aire, estiércol, paja y ensilado), el ordeñador, el equipo lechero, entre otros (ICMSF, 1999).

Microorganismos alterantes:

Los microorganismos alterantes son aquellos que producen cambios físicos y organolépticos no deseables de la leche y los productos lácteos, la mayoría son microorganismos psicrotrofos, que pertenecen principalmente al género *Pseudomonas*, las proteasas y lipasas producidas por estos microorganismos son termoresistentes y son las responsables de la alteración de la leche. El sabor ácido de la leche es producido por *Streptococcus lactis*, mientras que otros intervienen en la apariencia física como *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Bacillus* y *Clostridium*; estos dos últimos son termoresistentes (Stadhouders, 1975; Hammer y Hix, 1916; Punch y col., 1965).

Microorganismos fermentadores:

Existen microorganismos que se encuentran dentro de la flora normal de la leche y que no representan problemas sino al contrario ayudan a la fermentación de varios productos lácteos siendo benéficos para el hombre; entre ellos se encuentran las levaduras y los mohos como *Candida* y *Kluyveromyces*. Algunas especies denotan la falta de higiene en los alimentos, pero otras son beneficiosas en la maduración de determinados tipos de quesos y en la transformación del lactosuero (Stadhouders, 1975).

Microorganismos patógenos:

La leche fresca está implicada corrientemente como vehículo de transmisión de enfermedades debido a la presencia de microorganismos patógenos. Entre los más comunes se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Serratia*, *Micoplasmas*, virus, levaduras, mohos e incluso algas, son causantes de varias enfermedades en el hombre y en las vacas. Otros patógenos se encuentran en menor cantidad pero que igualmente ocasionan enfermedades son: *Brucella abortus* (brucelosis), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Clostridium botulinum* (botulismo), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Streptococcus pyogenes* (escariatina, infecciones en la garganta) *Rickettsia Coxiella burnetti* (fiebre Q), *Bacillus anthracis* (antrax), *Vibrio cholerae* (cólera), *Campylobacter* (intoxicaciones), *Shigella* (gastroenteritis). algunos virus como el de la poliomelitis y de la influenza tipo A. *Streptococcus fecalis*, *Streptococcus caecium* y *Streptococcus durans*. pueden causar intoxicaciones alimentarias que todavía no han sido bien establecidas. La mayoría de estos patógenos se destruyen con la pasteurización a excepción de los virus causantes de la fiebre aftosa (Saharpe y Bramley, 1977).

Las salmonelas se encuentra involucrado en brotes de enfermedades infecciosas ocasionadas por el consumo de leche: estas llegan a la leche por medio de la contaminación de la ubre, los utensilios para el ordeño y por la manipulación de los operarios (ICMSF, 1980; Marth, 1969; Bryan, 1983). La importancia de esta bacteria se describirá a grandes rasgos en el siguiente apartado

II.2 SALMONELAS

II.2.1 Características generales

El género *Salmonella* incluye más de 2.100 serotipos. *Salmonella typhi* fue descubierta en 1880 por Eberth y aislada en 1884 por Gaffky. *S. cholerae-suis*, se aisló de cerdos a los que se les diagnosticó clínicamente que padecían peste porcina (Salmon y Smith, 1885). El nombre y género fue acuñado por Lignières en 1900 en honor de la investigación del Dr. Salmon. El primer brote de salmonelosis transmitida por alimentos confirmado en el laboratorio implicó a 57 personas que comieron carne de una vaca enferma y se aisló *S. enteritidis*, desde entonces las salmonelas han sido identificadas como la causa más importante de la fiebre entérica y la gastroenteritis.

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae, gram-negativa, anaerobia o aerobia facultativa, asporógena, de forma bacilar, forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas bien definidas. Habitualmente son móviles mediante flagelos peritricos, producen ácido y gas, son catalasa-positiva y oxidasa-negativa y reducen el nitrato en nitritos. La mayoría de las cepas, con la excepción de *S. typhi*, son aerógenas, utilizan el citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno, no fermentan la lactosa, la reacción del rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la prueba de indol es negativa. El contenido de G + C del DNA es de 50-53 moles % (Wilkins y Baltimore, 1994).

La clasificación del género *Salmonella* es muy compleja y varía según el autor. Sin embargo, su clasificación se basa en la especificidad del hospedero, la presencia de antígenos específicos y la sensibilidad de los fagos, con ello se han obtenido alrededor de 2.100 especies de *Salmonella*. Actualmente, se ha recurrido a la identificación genética de las especies y se ha determinado una sola especie

Salmonella enterica con numerosos serovares. Para nombrar *S. typhimurium* de acuerdo a esta clasificación decimos *S. enteritidis*, subespecie entérica, serovar *Typhimurium*, como este sistema es un poco complicado basta mencionar *S. typhimurium*. (Le Minor, 1984).

II.2.2 Infecciones causadas por salmonelas

El género *Salmonella* es causante de los brotes más comunes de intoxicaciones alimentarias, como la salmonelosis, fiebre tifoidea, gastroenteritis y algunas otras infecciones focales en todo el mundo según la OMS. En México, el número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) es muy alto. Por citar un ejemplo, hasta el mes de abril de este año se habían reportado 1'704,962 casos, donde *Salmonella* figura como el principal causante de este tipo de intoxicaciones, teniendo en cuenta que algunos casos no son reportados y especificados (SSA, 2001). Los principales alimentos involucrados en la producción de brotes son huevo, carnes, leche, productos lácteos, frutas y verduras.

Las salmonelas comprenden una gran variedad de especies patógenas para el hombre y los animales. Inicialmente invaden la luz del intestino donde se multiplican, a veces las salmonelas atraviesan las barreras mucosa y linfática, llegan al torrente sanguíneo y originan abscesos en varios tejidos. Las cepas invasoras por ejemplo *S. typhi* atraviesan la mucosa intestinal, pasan al sistema linfático donde son englobados por los fagocitos y en su interior se multiplican, después regresan al torrente sanguíneo y producen septicemias, las personas más susceptibles a enfermarse son los adultos.

El número de células infecciosas varía según el alimento y la especie puesto que interviene la supervivencia de la bacteria al medio, y existen evidencias que aseguran que de 1 a 10 células constituyen una dosis infecciosa en el humano (D'Aoust, y col., 1985). Sin embargo, para causar la enfermedad en personas adultas

sanas es necesario la ingestión de más de 125.000 salmonelas (McCullough y Eisele, 1951). Las salmonelas suelen estar en el tracto alimentario, pero se pueden encontrar en los ganglios linfáticos (especialmente en los mesentéricos), en el hígado, la vesícula biliar, los riñones, el bazo y los ovarios.

II.2.3 Epidemiología y distribución en la naturaleza

Las salmonelas se encuentran distribuida en todas partes y son conocidas universalmente como agentes zoonóticos ya que se encuentran en los animales, en algunos alimentos especialmente los de origen animal y los expuestos a contaminación por aguas residuales. Se alojan en el tracto intestinal de los animales infectados y se eliminan por las heces. se transmiten por el contacto con las manos al ser contaminadas por el pelo, piel, patas, heces etc. Los casos reportados de enfermedades provocados por *Salmonellas* en Estados Unidos y en otros país son muy alarmantes. se ha considerado que alrededor de 696.000 a 3,8 millones de personas se enferman en el año. En México es difícil determinar el número de casos anuales debido a que no son reportado, pero la Secretaria de Salud estima alrededor de 30.000 casos anuales provocados por intoxicaciones alimentarias (SSA, 2001).

Los reservorios más comunes de *Salmonella* son: el hombre, las aves de corral, cerdos, ganado vacuno, alimentos y piensos (ICMF, 1996).

II.2.4 Detección y recuento

La detección rutinaria de las salmonelas supone una secuencia de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en placas de medios selectivos, aislamiento e identificación (Silliker y Gabis, 1986; NOM-114-SSA1-1994). Los tiempos de incubación suelen ser de 16-24 horas, con temperaturas desde 35-43°C. Los caldos selectivos que se utilizan habitualmente son; caldo tetrionato con verde brillante, caldo selenito con la cistina, caldo para bacterias Gram-negativas y caldo con cloruro de magnesio-verde malaquita de Rappaport-Vassiliadis (Vassiliadis,

1983). El recuento de salmonelas se realiza mediante la técnica del número más probable (ICMSF, 1978; Speck, 1984).

Identificación:

La identificación definitiva se realiza mediante pruebas bioquímicas en cultivos puros. También se realiza mediante métodos de cultivos clásicos pero son laboriosos y requieren de 3-5 días para la identificación presuntiva de *Salmonella*. Por esta razón, se han diseñados numerosos métodos de detección más rápidos, que incluyen el anticuerpo fluorescente (Cherry y col., 1975; Thomason, 1981; Insalata y Chordash, 1984), las pruebas de hibridación DNA/DNA (Fitts y col., 1983), la serología de enriquecimiento (Sperber y Diebel, 1969), la prueba de la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Minnich y col., 1982; Mattingly y Gehle, 1984), y pruebas con fagos de *Salmonella* (Welkos y Bare, 1974). El método de ELISA (con anticuerpos policlonales o con anticuerpos monoclonales) y el de DNA, que han recibido la aprobación del primer escalón de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales (Flower y col., 1986 a,b). Se ha dedicado mucho empeño en evaluar la amplia gama de métodos alternativos ideados para salmonelas; por ejemplo la determinación automatizada de la modificación de la conductancia (Gibson y col., 1992), la hibridación colorimétrica del DNA (Foster y col., 1992) y el enriquecimiento de la movilidad, aplicada al coco, al chocolate y otros productos (de Smedt y col., 1994).

II.3 MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS 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. Siin embargo, todas presentan desventajas lo que dificulta su aplicación. Entre los métodos de diagnóstico podemos clasificar las siguientes:

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), el método del número más probable (NMP), la técnica de reducción de colorante y el recuento microscópico directos (Zwientering y col., 1990; McCrandy 1915; Garvie y Rowlands, 1952)

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, turbidimetría, radiometría, bioluminiscencia o medida del ATP, prueba de *Limulus* y el ensayo de la actividad inmunopeptidásica ligada a la pared celular (Kell y Darvey, 1990; Forrest, 1992; Sharpe y col., 1970; Stewart y col., 1980)

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). Entre los métodos inmunológicos aplicados con mayor éxito al análisis rutinario de alimentos destacan, la aglutinación, la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) (Robinson y col., 1983; Kerr y col., 1992).

Métodos genéticos

Los métodos genéticos se basan en la utilización de fragmentos de ADN cromosómicos y plasmídicos y proporcionan datos específicos útiles para detectar en alimentos la presencia de microorganismos patógenos y alterantes (Earnshaw y Gidley, 1992). Los métodos genéticos más utilizados en el análisis de alimentos son el perfil plasmídico, las sondas de ADN, el perfil de restricción de ADN cromosómico, (PCR) (Fitts, 1985; Townsen y col., 1985; Shah y Romick, 1997; Soument y col., 1997).

II.4 UTILIZACIÓN DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

En los últimos años, el extraordinario auge experimentado por la biología molecular ha conducido al desarrollo de técnicas genéticas que permiten la identificación rápida de microorganismos específicos sin necesidad de su aislamiento en cultivos puros, eliminando algunas de las limitaciones de los métodos convencionales. La PCR es actualmente una herramienta imprescindible en los laboratorios de investigación en todo el mundo y se emplea rutinariamente en los hospitales para la identificación de muchos microorganismos patógenos.

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 quién ideó un procedimiento para la amplificación de las secuencias de ADN específicas basada en el mecanismo de la replicación del ADN celular. Sin embargo, el primer trabajo experimental utilizando esta técnica fue realizado por Saiki y col., 1985; esta técnica conocida universalmente como PCR, ha revolucionado los campos más diversos de la ciencia (Mullis, 1990). Actualmente, además de la técnica de PCR clásica, existen otras modalidades de PCR como son: RT-PCR (Reverse Transcriptase), PCR múltiple, PCR anidado, Touch-down-PCR, PCR inverso, AP-PCR (arbitrary primers), RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), asociaciones de PCR con otras técnicas como: RFLP's (Restriction Fragments Length "Polimorphisms Analysis"), RADP's (Random

Amplified Polymorphic DNA) y técnicas de amplificación distintas de la PCR (PCR, 32 S). Todas ellas han sido objeto de múltiples libros y revisiones (Walker y Gingold, 1997; McPherson y Molar, 2000).

Las aplicaciones de la PCR son demasiado numerosas. Debido a su alta sensibilidad y especificidad, esta técnica se ha convertido en una de las más utilizadas para la confirmación del diagnóstico. La introducción de la PCR a la industria de los alimentos, ha permitido de forma espectacular incrementar la sensibilidad de los métodos de detección de microorganismos patógenos y alternantes. Sin embargo su aplicación al análisis de alimentos se encuentra todavía en sus fases iniciales. A pesar de los obstáculos que pueda encontrar su desarrollo en medios tan complejos como los alimentos, la técnica de PCR tiene un futuro prometedor como técnica rutinaria de identificación de microorganismos en muchos sustratos.

La PCR se ha aplicado en la identificación de bacterias patógenas principalmente: *Listeria monocytogenes* (Niederhauser y col., 1992), *Campylobacter jejuni* (Wegmuller y col., 1993), *Staphylococcus aureus* (Becker y col., 1998), *Escherichia coli* (Franch y col., 1998) *Salmonella spp.* (Aabo y col., 1995; Trkov y col., 1999; Soument y col., 1997), toxas enterotoxigénicas de *E. coli* (Bej y col., 1990), en algunos alimentos como leche, huevo, pollo, pescado, alimentos marinos entre otros.

III.- JUSTIFICACIÓN

En la industria de los alimentos el control de calidad es fundamental para garantizar la calidad higiénica de los productos porque de ello depende la seguridad del consumidor y la capacidad de las industrias para exportar. En nuestro país, son pocas las industrias alimenticias que cumplen con los estándares de calidad establecidos en los mercados internacionales, lo que hace necesario el desarrollo de métodos rápidos de diagnóstico de patógenos que permitan realizar acciones correctoras rápidas en la cadena de fabricación.

Considerando que *Salmonella* es el patógeno que mas enfermedades ocasiona, el presente trabajo pretende proponer a la industria alimenticia una técnica innovadora para la detección de *Salmonella* mediante la técnica genética de PCR, orientado a la solución de alguno de los problemas de nuestra región que son: la calidad higiénica de la leche y la salud pública; la cual podría sustituir a las técnicas convencionales de diagnóstico y extender su aplicación en nuestro país.

IV.- HIPÓTESIS

La técnica de PCR permitirá la detección rápida sensible y eficaz de *Salmonella* en leche de vaca.

V.- OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica genética por PCR, que represente una alternativa rápida, sensible y eficaz para la detección de *Salmonella* en leche de vaca.

B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar la extracción de ADN genómico de cultivos puros y muestras de leche inocuadas artificialmente con *Salmonella typhimurium*.
2. Optimizar la técnica de PCR mediante la utilización de cebadores específicos para la ampliación de un fragmento de interés que identifique a *Salmonella spp.* en muestras de leche inocuadas artificialmente con *S. typhimurium*.
3. Optimizar la técnica de PCR en muestras de leche inocuadas artificialmente con *S. typhimurium* hasta conseguir una sensibilidad de 10^0 ufc ml⁻¹.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Cultivo de bacterias.

Material biológico: Se emplearon 3 cepas de *Salmonella* para comprobar que los cebadores son específicos para distintas especies del género.

Salmonella choleraesuis (ATCC 10708)

Salmonella enteritidis (ATCC 14028)

Salmonella thyphimurium (ATCC 14028)

Se seleccionó *Salmonella thyphimurium* para realizar las diluciones e inocularla artificialmente a la leche, debido al riesgo que representa para la salud del consumidor.

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

Bacillus subtilis (ATCC 6633)

Staphylococcus aureus (ATCC 16538)

Listeria monocytogenes (ATCC 19114)

Escherichia coli (ATCC 8739)

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)

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

El cultivo de microorganismos se realizó en agar nutritivo, 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 inoculadas a las muestras de leche, se realizaron siembras en PCA (Plate Count Agar). 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., 1991. Este método se aplicó tanto a los cultivos puros de bacterias, como a las muestras de leche UHT inoculadas artificialmente con las diluciones realizadas con *S. typhimurium*. La optimización de la extracción de ADN se realizó en las siguientes condiciones:

Se tomó 1 ml de cultivo bacteriano y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm, eliminando el sobrenadante para obtener el precipitado con los microorganismos al cual se añadió 0,5 ml de tampón de lisis y 5 µl de proteinasa K. Se incubaron las muestras a 55°C en baño maría durante una hora treinta minutos, se enfrió en hielo picado y se le agregó 500 µl de isopropanol, se agitó en vortex y se congeló a -20°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm eliminando con cuidado el sobrenadante. El ADN se lavó 3 veces con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de agua mQ y se conserva a -80° C hasta su utilización.

Reactivos:

- 1.-Tampón de lisis: Tris HCL 100 mM pH 8.5, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 5mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0,2%, NaCl, 200mM
- 2.-Proteinasa K: Solución concentrada 20mg/ml. Disolver 10mg en 0,5ml de agua mQ
- 3.-Isopropanol 100%
- 4.-Etanol 70%

5.- PBS (Phosphate-Buffered Saline):

NaCl	8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2g/l
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	2,9g/l
KCl	0,2g/l

6.-EDTA 5mM pH 8 (18,6 g de EDTA en 100ml de agua mQ)

VI.2.2 Optimización de la PCR.

La reacción de la PCR se basa en la repetición cíclica de tres etapas en las que se produce la amplificación de un fragmento específico de ADN. Las etapas son la desnaturalización, hibridación y extensión. Este proceso se realiza en presencia de enzima ADN polimerasa termoestable (*Thermus aquaticus*). Un proceso de amplificación típico entre 20 y 40 ciclos, producirá un millón de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Se deben emplear al menos dos cebadores que, tras unirse por complementariedad a cada una de las cadenas del ADN duplex, delimiten la secuencia diana que se pretende amplificar. La temperatura a la que se realiza la unión de los cebadores (m) es crítica para controlar la especificidad de la reacción y depende exclusivamente de la composición de pares de bases. Aunque existen programas informáticos que calculan la temperatura de unión de los cebadores, la fórmula $T_m = \{2(A+T) + 4(G+C)\} - 5$ está muy difundida a nivel laboratorial. Cuando los cebadores empleados en una misma reacción poseen T_m diferentes, siempre se aplica temperatura inferior (McPherson y Moller, 2000; Mullis, 1990).

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 para el género *Salmonella spp.* que consta de 152 pb del gen "hns".

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

Primer 1: 20 pM/ μ l	3 μ l
Primer 2: 20 pM/ μ l	3 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	2 μ l
ADN	14 μ l
Agua mQ	3 μ l
Volumen de reacción	<u>25 μl</u>

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

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

35 ciclos que incluyen:

92°C, 45 s desnaturalización

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, Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP (deoxinucleotidos trifosfatos) 200 μ M y estabilizantes incluidos BSA (Bovine Serum Albumin).

2.-Agua mQ esterilizada por filtración

3.-Primer Gibco BRL

Las secuencias de los primers utilizados fueron:

Primer 1: TAC CAA AGC TAA ACG CGC AGC T

Primer 2: TGA TCA GGA AAT CTT CCA CTT GC

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 en el que a partir de una corriente eléctrica se separan moléculas de acuerdo a su peso molecular y su afinidad eléctrica en una matriz en este caso la agarosa. El ADN con carga negativa en un pH neutro, migra a una corriente opuesta. La difusión de esta molécula depende de la concentración del gel de agarosa, que permite que se separen de acuerdo al tamaño.

Preparación del gel:

El gel se preparó al 1.5 % de agarosa en 40ml en amortiguador tris acetato (TAE), se calienta en un matraz, se agitó hasta disolver la agarosa y se deja enfriar a una temperatura aproximada de 20° C. Posteriormente, se agrega 3 µl de bromuro de etidio y se agita. Después, se vierte en la cámara de electroforesis hasta el límite marcado sin hacer burbujas y se coloca el peine. Se deja solidificar el gel a temperatura ambiente y se cubre con amortiguador TAE y se retiran los peines.

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" ó buffer de carga. A continuación, la mezcla se deposita en con una micropipeta en los pocillos del gel.

Para todos los ensayos se realizó un control negativo que no contenía ADN y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (0,5µl patrón, 3µl de "gel loading buffer" y 6,5 µl de 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.

Reactivos:

1.- Agarosa

2.-TAE (Tris Acetate Buffer)

242g	Tris base
57,1ml	Ac. acético Glacial,
100ml	EDTA 0,5mM, pH 8,0
840ml	Agua mQ

3.-Bromuro de Etidio (Sigma)

4.-"Gel loading Solution" (Sigma)

5.-Marcador de peso molecular de 100 pares de bases Gibco BRL

VI.3 Aplicación de la PCR en la identificación de *Salmonella* en muestra de leche UHT inoculadas artificialmente.

VI.3.1 Inoculación de los microorganismos a la leche control UHT.

A partir de un cultivo puro de *S. typhimurium* que contenía 10^7 ufc ml^{-1} , se prepararon diluciones en leche UHT a las concentraciones comprendidas entre 10^7 y 10^0 ufc ml^{-1} . A continuación, se procede a extraer el ADN de los microorganismos inoculados en las muestras, para lo cual se empleó el reactivo A (Enliten reagent A, Promega), que previamente había demostrado su eficacia para recoger los microorganismos, eliminando los compuestos como la grasa y proteínas de la leche, que pudieran interferir en la reacción de amplificación. Ver figura 1 (Gutiérrez y col., 1997).

A 1 ml de muestra de leche inoculada con *S. typhimurium*, se le adicionan 500 μ l el reactivo A, se centrifuga durante 10 min a 13.000 rpm y se procede a la extracción del ADN. Una vez obtenido el ADN se realiza el PCR y la electroforesis de los fragmentos de acuerdo con los métodos antes descritos.

VI.3.2 Ensayo para incrementar la sensibilidad de la técnica.

Se realizó el mismo procedimiento que en el punto VI.3.1, sólo que en este caso se tomaron sólo las diluciones comprendidas ente 10^2 a 10^0 ufc ml^{-1} de las muestras de leche UHT artificialmente contaminadas y se incubaron durante 12 h en un agitador orbital a 37°C . Posteriormente, se realiza la extracción del ADN y PCR con el mismo proceso antes mencionado.

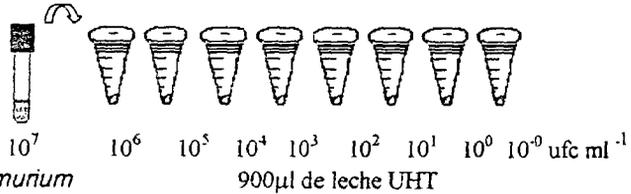
VI.3.3 Evaluación de la técnica en la detección de *Salmonella* en muestras de leche pasteurizada.

Con la finalidad de evaluar la técnica desarrollada, se realizaron ensayos con leche pasteurizada para intentar determinar la presencia o ausencia de *S. typhimurium*. Tres marcas comerciales de leche pasteurizada, se dejaron incubando durante 12 horas a 37°C , posteriormente, se realizó la extracción de ADN. PCR y electroforesis.

1.-Cultivo de bacterias



Cultivos puros de *S. typhimurium*



2.- Obtención de microorganismos

Recuento en placa de bacterias (PCA)

Agregar 500 µl de Reactivo A

3.- Extracción de ADN bacteriano



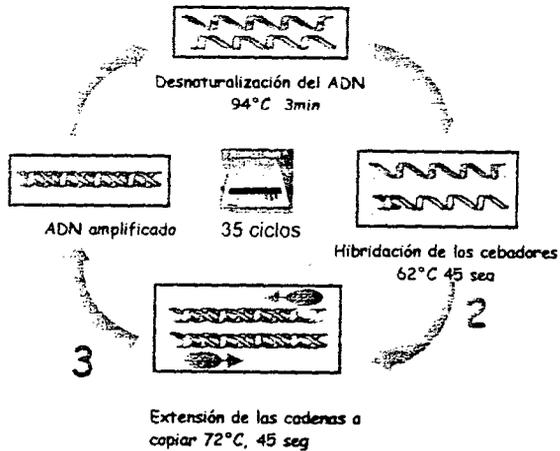
Centrifugar

Agregar tampón de lisis y proteinasa K
Incubar a 55°C baño maría



Lavar ADN con etanol.

4.- PCR del ADN extraído de las diluciones de 10⁷-10⁰ ufc ml⁻¹



5.- Visualización en geles de agarosa de los fragmentos amplificados



Figura 1. Diagrama de la metodología

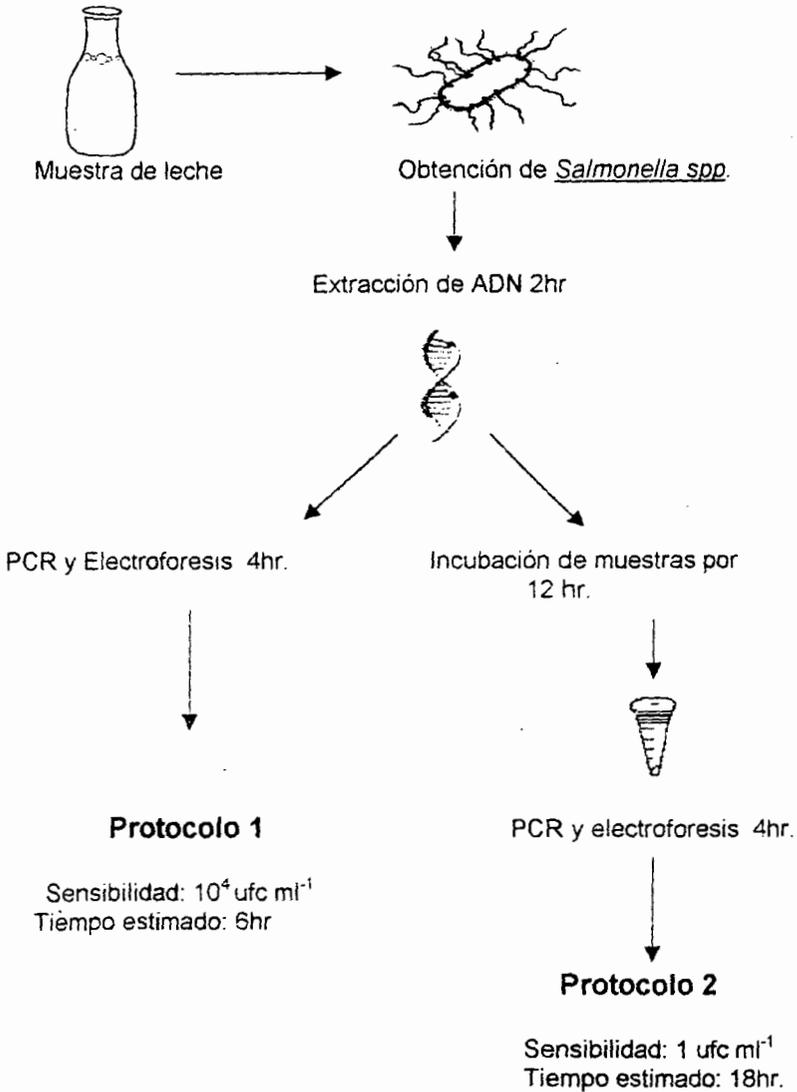


Figura 2. Diagrama de la identificación de *Salmonella* en leche mediante 2 protocolos establecidos con la técnica de PCR en los cuales se especifica el tiempo y la sensibilidad estimada para cada uno.

VII.- RESULTADOS

VII.1 Obtención de ADN genómico de bacterias.

Se obtuvo ADN suficiente para la realización de la PCR de las siguientes muestras:

- 1) ADN de cultivos puros de todas las bacterias: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis* y de las bacterias de referencia: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) ADN a partir de diluciones de 10^7 - 10^0 ufc ml⁻¹ de *S. typhimurium* de cultivos de inoculadas artificialmente a la leche UHT.
- 3) ADN de bacterias encontradas en pruebas con leche pasteurizada.

Se logró estandarizar la técnica de extracción de ADN en un tiempo más corto y se obtuvieron fácilmente los microorganismos de la leche gracias a la utilización del reactivo A descrito en la metodología, de esta manera se reducen los factores que inhiben la PCR.

VII.2 Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de cultivos puros de *S. typhimurium* para probar la eficiencia de los cebadores.

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 tienen 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 elaborar los cebadores específicos para el ADN de *Salmonella*. 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 CCT 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 es de 152 pb.

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

ID STHNS standard; ADN; PRO: 827 BP.

AC X14375;

DE *Salmonella typhimurium*, 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 typhimurium*";

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 TTTTGTAGCGA CAGACGGTGA GTATCCCCC
101 CGCCAATAAG CTCTTTTTTG TGCGGTGCCT CAAGCAAAAT TTAAGTTGAG
151 ATAATTA AAA CGTGTGCTTA ATAAAGCGTA ATTTTGAATT CCTTACATTC
201 CTGGCTATTG CACAACGTAA TTTATCGCTC TATTATTAGC TCAACAAACC
251 ACCCCAATAT AAGTTTGAGA TTAATAACAAT GAGCGAAGCA CTTAAATTC
301 TGAACAACAT CCGTACTCTT CGTGCGCAGG CAAGAGAATG TACTCTGGAA
351 ACGCTTGAAG AAATGCTGGA AAAATTAGAA GTTGTCGTTA ATGAGCGTCG
401 TGAAGAAGAA AGCGCTGCTG CTGCTGAAGT GGAAGAACGC ACTCGTAAAC
451 TGCAACAGTA TCGTGAAATG TTAATTGCCG ACGGCATTGA CCCGAATGAA
501 CTGCTGAATA GCATGGCTGC CGCTAAATCC GGTACCAAAG CTAAACGCGC
551 AGCTCGTCCG GCTAAATATA GCTATGTTGA CGAAAACGGT GAAACTAAAA
601 CCTGGACTGG CCAGGGTCGT ACACCGGCTG TAATCAAAAA AGCAATGGAA
651 GAACAAGGTA ACGCTGACCTTCTAAAGCACTACTAGGAAT AATTTACTTC
701 CTGGATGCTT AAAATCCCGC CGCTGGCGGA TTTTTTTTGC CTGAGTTCTC
751 CGCTGACGAC CCCAGGCATA AAAAAAGCGC CGGATTTACC AGCGCTTCTG
801 TTAAAAATTT ATACGTCGTT ACTTCTT

Se lograron optimizar las condiciones para la reacción 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 tres géneros de *Salmonellas* (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*) y las cuatro bacterias de referencia: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La figura 3 muestra los resultados de la prueba de la especificidad de los cebadores para el género *Salmonella* en una concentración de 10^8 ufc ml^{-1} ya que muestra amplificación de un fragmento de 152 pb del ADN extraído (carriles 2-4), mientras que como se esperaba el resto de las bacterias no amplificaron (carriles 5-8), lo que confirma la especificidad de los cebadores únicamente las especies del género *Salmonella*.

VII. 3 Evaluación de la técnica de PCR en la detección de *S. typhimurium* en muestras de leche artificialmente contaminada.

Al evaluar la técnica de PCR en ADN extraído de bacterias inocuadas en la leche UHT, no se observó ningún fragmento de amplificación debido a la presencia de compuestos en la leche que inhibían la reacción de PCR. Para resolver este problema recurrimos a la utilización de un reactivo que facilita la captura de microorganismos (Gutiérrez y col., 1997). Este reactivo forma parte de un kit de bioluminiscencia y se denomina reactivo A (milk clearing solution). Una vez utilizado este reactivo en la extracción del ADN de bacterias inocuadas a la leche, se consiguió amplificar el fragmento de 152 pb.

Los ensayos realizados en leche artificialmente contaminada en concentraciones de 10^7 - 10^0 ufc ml^{-1} demostraron que el límite de detección de la técnica aplicada a cultivos puros fue de 10^4 ufc ml^{-1} (figura 4), por lo que fue necesario realizar varios ensayos para lograr una sensibilidad de 10^0 ufc. Finalmente,

la sensibilidad deseada se alcanzó incubando las muestras de leche UHT inoculadas (10^7 - 10^0) durante 12 h antes de realizar los ensayos de PCR. La figura 5 que la banda de interés de 152 pb es visible hasta una concentración de 10^0 ufc ml^{-1} . Con lo cual se puede confirmar que la técnica es tan sensible que es capaz de detectar una bacteria en la muestra de leche. Por el contrario en el carril 5 donde no existen células no se aprecia la banda de amplificación del fragmento de interés.

VII.4. Evaluación de la técnica en la detección de *Salmonella* en muestras de leche pasteurizada.

Se realizaron 3 ensayos en leche pasteurizada para evaluar la técnica en la detección de *Salmonella*, pero no se encontró la presencia de *Salmonella* en ninguno de los 3 ensayos para las 3 marcas diferentes de leche pasteurizada.

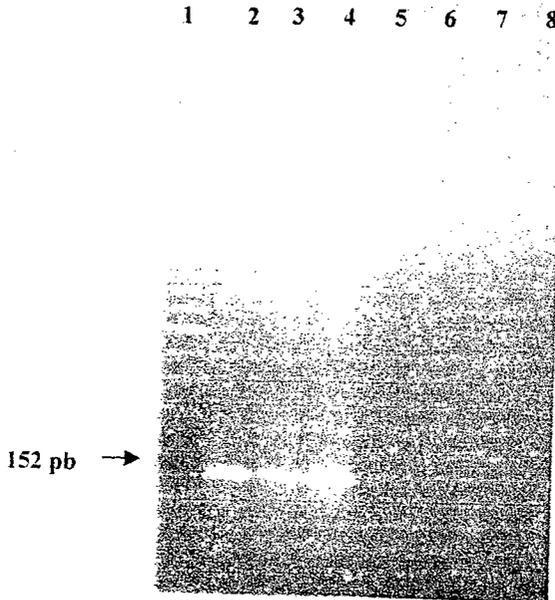


Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de cultivos puros a una concentración de 10^8 ufc ml⁻¹ de 1) Marcador molecular 100 pb, 2) *Salmonella typhimurium*. 3) *Salmonella enteritidis*, 4) *Salmonella cholerasuis*, 5) *Listeria monocytogenes*. 6) *Staphylococcus aureus*, 7) *Escherichia coli* y 8) *Pseudomonas aeruginosa*.

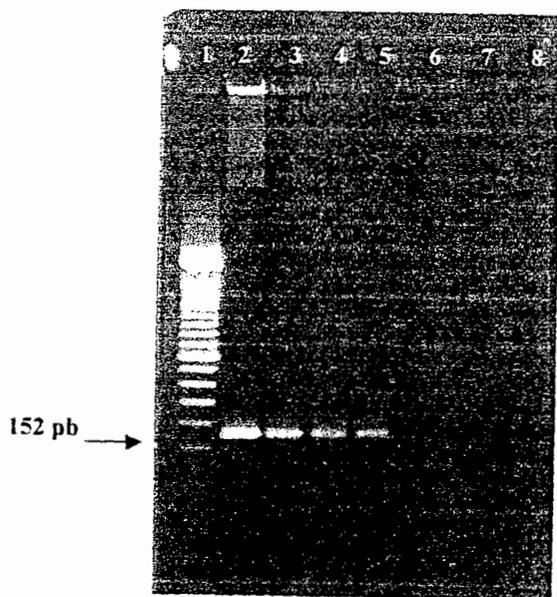


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de un cultivo puro de *S. typhimurium* a las siguientes concentraciones 1) Marcador de peso molecular 100 pb, 2) 10^7 , 3) 10^6 , 4) 10^5 , 5) 10^4 , 6) 10^3 , 7) 10^2 ufc ml^{-1} y el 8) Control negativo.

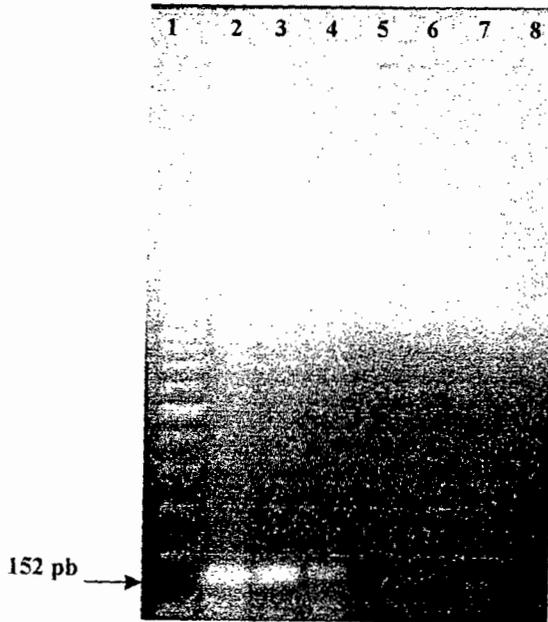


Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de un cultivo puro de *S. typhimurium* a las siguientes concentraciones 1) Marcador de peso molecular 100pb, 2) 10^2 , 3) 10^1 , 4) 10^0 , 5) 10^{-0} y el 6) Control negativo.

VIII.- DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo permiten la detección rápida de *Salmonella* en muestras de leche de forma sensible y específica. Como resultado de los experimentos, se ha conseguido desarrollar 2 protocolos para la detección de éste patógeno (Figura 2). Los procedimientos son similares pero la sensibilidad es distinta. Para los dos protocolos se seleccionaron los mismos cebadores, método de extracción de ADN y las condiciones óptimas de amplificación para la PCR.

El protocolo 1 se obtiene en un tiempo máximo de realización de la prueba de 6 horas y un límite de detección de 10^4 ufc ml⁻¹. Mientras que para el protocolo 2 los resultados se obtienen en 18 horas, y con un límite de detección de 10^9 ufc ml⁻¹.

Así, los resultados de este trabajo demuestran que la PCR puede competir y asegurar su eficiencia frente a las técnicas convencionales de diagnóstico y al mismo tiempo con las otras técnicas más novedosas como son los métodos inmunoenzimáticos ELISA (Robinson y col., 1983; Canlish, 1991; Kerr, y col., 1992), perfil plasmídico (Scheinbach, y Hong, 1988), citometría de flujo (McIleland y Pinder, 1994), impedancia (Firstenberg-Eden, 1983) entre otros.

En investigaciones anteriores se ha demostrado la eficiencia de la PCR para determinar la presencia de microorganismos en alimentos, aplicando distintas modificaciones a la técnica como son la temperatura, el número de ciclos para la amplificación, número y secuencia de cebadores y el pretratamiento de las muestras (Lantz y col., 1994; Joanne y col., 1996; Lin y Tsen, 1996; McPerson y Moller, 2000).

Es importante señalar que durante el desarrollo de esta técnica de diagnóstico observamos que al incrementar el tiempo de detección por incubación previa (protocolo 2), la sensibilidad se incrementa notablemente hasta conseguir el límite de detección deseado, lo cual coincide con otros trabajos (Bennet y col., 1998; Trkov y col., 1999). Además, los procesos de elaboración de la PCR son sencillos y los costos de inversión no superan las ganancias que se pueden obtener de ella,

además esta técnica puede ampliar sus aplicaciones a otros patógenos y a otras matrices biológicas.

Conviene señalar que existen muchos factores que intervienen en la inhibición de la PCR entre ellos son la desnaturalización de ADN polimerasa, la precipitación del ADN y la quelación de iones de magnesio, la precisión en el aislamiento del genoma bacteriano de los alimentos, etc. Una vez que se controlan las condiciones necesaria para la implementación de esta técnica, resulta relativamente fácil utilizarla como técnica de rutina de diagnóstico tanto en laboratorio como en campo.

Es necesario seguir perfeccionando la técnica con el fin de aplicarla en otros microorganismos y alimentos puesto que cada alimento requiere condiciones específicas de obtención de microorganismos.

IX.- CONCLUSIONES

1. Los cebadores seleccionados, permitieron desarrollar una técnica sensible y específica para la detección de las especies del género *Salmonella*.
2. 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. typhimurium* inoculada en leche UHT en el intervalo comprendido entre 10^7 y 10^0 ufc ml⁻¹.
3. La sensibilidad de la técnica se incrementa notablemente cuando se agrega un periodo de incubación de 12 horas. El límite de detección conseguido fue 10^0 ufc ml⁻¹.

X.- BIBLIOGRAFÍA

AABO, S., ANDERSEN, J. K., y OLSEN, J.E. (1995). Research note: detection of *Salmonella* in minced meat by polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology*. 21:180-182.

BECKER, K., ROTH, R., y PETERS, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:2548-2553.

BENNET, A. R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., y BETTS, R. P. (1998). Rapid and definitive detection of *Salmonella* in food by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 26:437-444.

BEJ, A. K., R. J. STEFFAN. J. DICESARE, I., HATT y R. M. ATLAS. (1990). Detection of coliform bacterial in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:307-314.

BRISSENDEN. C. H. (1981). U.H.T. processing and packaging plant: basic requirements, services and maintenance. *New Monograph on UHT milk. Fil., Doc.133,105.*

BRYAN, F. L. (1983). Epydemiology of milk-borne diseases. *Journal of Food Protection*. 46:637-49.

CANDLISH, A. A. G. (1991). Immunological methods in food microbiology. *Food Microbiology*. 8:1-14.

CHERR, Y. W. B., THOMASON. B. M., GLADDEN, J. B. HOLSING, N. y MURLIN, A. M. (1975). Detection of salmonellae in foodstuffs, feces and water by immunofluorescence. *Annals New York Academy of Science*. 254:350-68.

D'AOUST, WARBURTON, D. W. y SWELL, A. M. (1985). *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from cheddar chese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. *J. Food Prot.* 48:1062-1066.

De SMEDT, J., BOLDERDIJK, R. y MILAS, J. (1994). *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by mobility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. *Journal of the AOAC International.* 77:365-73.

EARNSHAW, R. y GIDLEY, J. (1992). Molecular methods for typing bacterial food pathogens. *Trens in Food Science and Technology.* 2:9-43

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

FITTS. R. (1985). Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* 39 (3):95-102.

FITTS, R. S., DIAMOND, M., HAMILTON, C. y NERI, M. (1983). DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella spp.* in food. *Applied and Environmental Microbiology.* 46:1146-5.

FLOWER, R. S., ECKNER, K., GABIS, D. A., ROBINSON, B. J., MATTINGLY, J. A. y SILLIKER, J. H. (1986 a). Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* 69:786-98.

FLOWER, R. S., KLATT, M. J., MOZOLA, M. A., CURIALE, M. S., GABIS, D.A. y SILLIKER, J. H. (1986 b). A DNA hybridization assay for the detection of *Salmonella* in foods: Collaborative study, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists,* 70:521-9.

FORREST, W. W. (1992). Microcalorimetry. *Meth. In Microbiol.* 68:285-318.

FOSTER, K., GARRAMONE, S., FERRARO, K. y GROODY, E. P. (1992). A DNA hybridization method and conventional culture method for the detection of *Salmonella* in foods: comparison of methods. *Journal of the AOAC International.* 75:685-92.

FRANCH, S. M., BOSWORTH, B. T., y MOON H. W., (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains from claves. *Journal of Clinical Microbiology.* 36:1795-1797.

FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D. C. (1993) Microbiología de los alimentos 4ª edición. Ed. Acribia, España, pp. 533-534.

GARVIE, E. I. y ROWLANDS, A. (1952). The role of microorganisms in dye-reduction and keeping quality tests II. The effect of microorganism when added to milk in pure and mixed culture. *Journal of Dairy Reseach.* 19:263-264.

GIBSON, D. M., COOBS, P. y PIMBLEY, D. W. (1992). Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods; collaborative study. *Journal of the AOAC International.* 75:293-302.

GUTIÉRREZ, R., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P. E. y MARTÍN R (1997) A quantitative PCR-ELISA for the rapid enumeration of bacteria in refrigerated milk. *Journal of Applied microbiology.* 83: 518-523.

HAMMER, B. W., y HIX, R. H. (1916). Studies on the numbers of bacteria present in milk which has undergone various changes. *Iowa Agric. Exp. Str., Res. Bull. No. 29.*

ICMSF (International Commission of Microbiological for Foods) (1999) Microorganismos de los alimentos 2, métodos de muestreo para análisis

microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. Vol. 2 Ed. Acribia. España. pp. 6-7.

ICMSF (International Commission of Microbiological for Foods) (1980). Ecología microbiana de los alimentos Vol. 2 productos alimenticios. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 300-332.

ICMSF (International Commission of Microbiological for Foods) (1996). Microorganismos de los alimentos, características de los patógenos microbianos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 255-266.

ICMSF (International Commission of Microbiological for Foods)(1978) Microorganisms in foods I. Their Significance and Methods of Enumeration. (2da. ed). Toronto: University of Toronto Press. pp.160-72.

INSALATA, N. E. y CHORDASH, R. A. (1984). Fluorescent antibody detection of salmonellae, in Speck, M.L. (ed.) *Compendium of Methods for the Microbiological of Food* (2da. ed.). Washington. D.C.American Public Health Association. pp.327-42

JAMES M. J. (1992). Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp.513.

JONES, D. D., LAW, R. y 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). Conductrimetric and impedimetric devices. En Biosensor, A practical approach. Cass, A. E. G. (ed) Oxford: Oxford University Press. pp: 125-154.

KERR, S., BALL, H. J., D. P. MACKIE, D. A. POLLOCK y D. A. FINLAY. (1992). Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72:302-308.

LACEY, R. W. (1993). Food-borne bacterial infection. *Parasitology*. 107: 575-593.

LANZT, P., HAHN-HÄGERDAL, B. y RADSTRÖM, P. (1994). Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*. 51:384-389.

LAIRD, P. W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RIDNICKI, M. A. JAENISCH, R. y BERNIS, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acid* 72:220-226.

Le MINOR, L. (1984). Genus III *Salmonella* *linieris* 1900. 389' in Krieg, N.R. and Holt. J.G. ed Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I. Baltimore Williams and Wilkins. 427-458.

LIN, C. K., y TSEN, H. Y. (1996). Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primer for the specific detection of *Salmonella* in food. *Journal of Applied Bacteriology*. 80:659-666.

MARTH, E. H. (1969). Salmonellae and salmonellosis associated with milk and milk products. A review *Journal of Dairy Science*. 52:283-315.

MATTINGLY, J. A. y GEHLE, W. D. (1982). An improved enzyme immunossay for the detection of *Salmonella*. *Journal of Food Science*. 49:807-9.

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.

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

McCULLOUGH, N. B., y EISELE, C. W. (1951). Experimental human salmonellosis; pathogenicity of strain of *Salmonella newport*, *Salmonella derby* and *Salmonella bareilly* obtained from spray-dried whole egg. *Journal of Infectious Diseases*. 89:209-13.

McPHERSON, M. J., y MOLLER, S. G. (2000). PCR Ed. BIOS y Springer New York. pp.23-52.

MINNICH, S. A., HARTMAN, P. A. y HEIMSCH. R. C. (1982). Enzyme immunoassay for detection of salmonellae in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 43:877-83.

MULLIS, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* (April). 262:56-65.

NIERDERHAUSER, C., CANDRIAN, U., HOFELIN, C., JERMINI, M., BUHLER H.-P. y LUTHY, J. (1992). Use for polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1564-1568.

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

PUNCH, J. D., OLSON, J. M., y THOMAS, E. L. (1965). Psychotropic bacteria. III. Population levels associated with flavor or physical change in milk. *J. Dairy Sci*, 8: 1179-1183.

REITER, B. (1978). Review on the progress of dairy science: anti-microbial system in milk. *J. Dairy Research*. 45 (1): 132-147.

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

SAHARPE, M. E. y A. J. BRAMLEY. (1977). Incidence of human pathogenic bacteria and virus in raw milk. *Dairy Industries International*. 42 (9): 24-26.

SAIKI, R. K., SCARF, S. y FALOONE, F. (1985). Enzymatic amplification of β -globing genomic sequence and restriction site for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 230:1350-1353.

SALMON, D. E., y SMITH, T. (1885). Report in swine plague, "Annual Report: Washinton D. C. US Departament of Agriculture. Bureau of Animal Industries. 184-246.

SAMBROOK J., FRITSCH E., MANIATIS, T., (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York 2da.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

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.

SHAH. S. A. y ROMICK, T. L. (1997). Subspecies differentiation of *Salmonella* by PCR-RFLP of ribosomal operon using universal primers. *Letters Applied Microbiology*. 25:54-57.

SHARPE, A. N., M. N. WOODROW, Y A. K. JACKSON. (1970). Adenosine triphosphate (ATP) levels in foods contaminated by bacterial. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 758-767.

SILLIKER, J. H. y GABIS, D.A. (1986). *Salmonella* in Person, A. M. And Dutson, T. R.(eds.) *Advances in Meat Research* Vol. 2 Meat and Poultry Microbiology, Westport, Connecticut: AVI Publishing Co. 209-29.

SOUMENT, C., GWENNOLA, E., FACH, P. Y COLIN, P. (1997). Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology.* 18:294-298.

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

SPERBER, W.H. y DEIBEL. R.H. (1969). Acelerated procedures for *Salmonella* in dried foods and feeds involving only broth cultures and serological reactions. *Applied Microbiology.* 17:533-9.

SSA: <http://www.ssa.gob.mx/epide/2001/sem17/cua8.html>.

STADHOUDERS. J. (1975). Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy J.* 29:104-126.

STEWART, B. J., M. J. EYLES, y W. G. MURRED (1980). Rapid radiometric method for detection of *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:223-230.

THOMASON, B.M. (1981). Current status of immunofluorescent methodology for salmonella. *Journal of Food Protection.* 44:381-4.

TOWSEN, D. E., ASHDOWN, N., BOLTON, S. y GRUBB, W. B. (1985). The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid insolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable and non relaxable plasmid DNA suitable for in vitro manipulation. Letter in *Applied Microbiology*. 1:87-94.

TRKOV, M., MAJERIKOVA, I., JERASEK, B., STEFANOVICOVA, A., RIJPENS, N., y KUCHTA, T. (1999). Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 16:393-399.

VASSILIADIS, P. (1983). The Rappaport Vassiliadis (RV) Enrichment medium for the insolation of salmonellas: an overview. *Journal of applied Bacteriology*. 54:69-76.

VEISSEYRE R., (1988). Lactología técnica: composición, recogida y transformación de la leche. Ed. Acribia, España. pp.1-46.

WALKER, J. M., y GINGOLD, E. B., (1997). Biología molecular y biotecnología. Segunda edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España, pp. 53-65.

WEGMULLER, B., LUTY, J., y CANDRIAN, U., (1993). Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Applied and enviromental Microbiology*. 59:2161-2165.

WELKOS, S., y BARE, H. (1974). Identification of *Salmonella* with the 0-1 bacteriophage. *Applied Microbiology*. 28:618-22.

WILKINS, E., y BALTIMORE M., (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Ed. Lippincott Williams. Pp.186-187.

ZWIENTERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUST, F.M. y VANTRINET, K. (1990). Modeling of the bacterial growt curve. *Applied and Enviromental Microbiology*. 56:1875-1882.