

1996 B/2001 B

093641302

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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



“Utilización de una técnica molecular PCR para la detección rápida de *Salmonella* en productos derivados de maíz empleados en la elaboración de alimentos”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

CARMEN HAYDEÉ ALVAREZ CHUCUÁN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. CARMEN HAYDEÉ ALVAREZ CHUCUÁN
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: **"UTILIZACIÓN DE UNA TÉCNICA MOLECULAR PCR PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE *Salmonella* EN PRODUCTOS DERIVADOS DE MAÍZ EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO** y como Asesor/a **DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., Octubre 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Leticia Hernández López

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO**.- Director del Trabajo

c.c.p. **DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**.- Asesor del Trabajo

c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ 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 Titulación Modalidad T E S I S, que realizó la pasante **Carmen Haydeé Alvarez Chucuan** código 093641302 con el título: "UTILIZACIÓN DE UNA TÉCNICA MOLECULAR PCR PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE *Salmonella* EN PRODUCTOS DERIVADOS DE MAÍZ EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS". 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 examen respectivo.

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

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., 03 de Diciembre de 2003

Rosalba Gtz. R.

DRA. ROSALBA GUTIÉRREZ ROJO

DIRECTOR



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

SINODALES

Carlos Alvarez Moya

DR. CARLOS ALVAREZ MOYA

ASESOR

FIRMA

1.- **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA**

Alma Rosa Villalobos

2.- **M.C. JOSEFINA CASAS SOLIS**

Josefina Casas Solis

3.- **DR. PEDRO MACEDONIO GARCÍA LÓPEZ**

Pedro Macdonio Garcia Lopez

*Srta
Presidente
Vocal*

4.- **DR. MARIO RUÍZ LÓPEZ**

Mario Ruiz Lopez



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

**Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos
(USAM)**

Laboratorio de Microbiología Molecular

Director: Rosalba Gutiérrez Rojo

Agradecimientos

- ❖ Doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta donde en estos momentos me encuentro y porque a él pertenezco.
- ❖ A mi Madre que con su amor y sacrificio se preocupó por mantener firme el deseo de superación y ser el pilar principal de mi formación profesional.
- ❖ A mis hermanos por su apoyo y estímulos brindados, en especial a Paty y Humberto.
- ❖ A todos mis amigos que forman una parte importante dentro de mi vida, por su apoyo, cariño y comprensión, en especial a Mago, Rosalba, Gaby, Mary, Fernando y Chuy.
- ❖ A la Dra. Rosalba Gutiérrez porque con sus valiosos conocimientos y consejos contribuyeron a la dirección y realización del presente trabajo de Tesis.
- ❖ Al Dr. Carlos Alvarez por su asesoría y a poyo brindado en el presente trabajo.
- ❖ Al Universidad de Guadalajara por se la institución de la que hoy egreso como profesionista.
- ❖ Al CIATEJ por todas las facilidades ofrecidas para la realización del presente trabajo.
- ❖ A Arancia Corn Products por su apoyo al proyecto.
- ❖ A ti que siempre estuviste conmigo. Gracias.



Índice

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES	
1- Inocuidad alimentaria.....	2
1.1. Microorganismos en los alimentos.....	2
1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).....	3
1.3. Aditivos alimentarios y su importancia en la elaboración de alimentos.....	5
1.3.1. Maltodextrina.....	6
1.3.2. Sorbitol.....	6
2- <i>Salmonella</i>	
2.1 Características generales.....	7
2.2. Infecciones causadas por <i>Salmonella</i>	8
2.3. Detección y recuento.....	9
2.4. Identificación.....	10
2.5. Métodos Alternativos.....	11
3- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	12
3.1. Aplicación de la PCR en el diagnóstico de patógenos en alimentos.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVOS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cultivo de microorganismos.....	17

2. Utilización de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella</i>	
2.1. Optimización de la extracción de ADN genómico de bacterias.....	18
2.2. Optimización de la PCR.....	19
2.3. Visualización del ADN y los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa.....	21
3. Utilización de la PCR en la identificación de <i>Salmonella</i> en productos derivados de maíz (maltodextrina y sorbitol) contaminados artificialmente.....	23
4. Ensayo para incrementar la sensibilidad de la técnica.....	23
5. Evaluación de la técnica en la detección de <i>Salmonella</i> en productos derivados de maíz.....	23

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención del ADN genómico de bacterias.....	26
2. Optimización de la PCR a partir de cultivos puros de las bacterias seleccionadas.....	26
3. Evaluación de la técnica de PCR en la detección de <i>Salmonella</i> en muestra esteriles de maltodextrina y sorbitol artificialmente contaminadas.....	28
4. Evaluación de la técnica desarrollada en la detección de <i>Salmonella</i> en muestras reales de maltodextrina y sorbitol.....	30

VIII. CONCLUSIONES 33

IX. BIBLIOGRAFÍA..... 34



I. Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) se han incrementado en los últimos años en México y en el mundo, siendo éste uno de los problemas más extendidos y una causa importante de la reducida productividad económica. La mayoría de las ETA's son de origen microbiano. La salmonelosis humana es una de las infecciones intestinales de mayor distribución en el mundo. Aún en países industrializados continúa siendo un problema de salud pública de primer orden. La incidencia actual del padecimiento se desconoce virtualmente en todos los países. Aunque se cuenta con registros de brotes y casos, se reconoce que las cifras disponibles representan sólo una pequeña porción de la realidad.

Es importante señalar que en la actualidad, la utilización cada vez más frecuente de sistemas de control de calidad basados en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) requieren el análisis de un gran número de muestras y la obtención rápida de un resultado confiable que permita realizar acciones correctivas rápidas en la cadena de fabricación. En nuestro país son pocas las industrias alimenticias que logran una calidad higiénica que permita la exportación de sus productos, ya que deben garantizar y comprobar la inocuidad de los mismos. Razón por la cual es necesario disponer de técnicas más rápidas, sensibles y específicas que permitan solventar dichas limitaciones.

El presente trabajo propone una alternativa ante tal situación aplicando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de *Salmonella* en productos derivados de maíz y que son exportados (maltodextrina y sorbitol), que son empleados como aditivos en la elaboración de alimentos, ya que al ser una técnica genética basada en la visualización del ADN, la especificidad aumenta al detectar secuencias características de *Salmonella* en los alimentos aún en presencia de otros microorganismos que puedan causar interferencia en el diagnóstico. Los resultados obtenidos, demuestran que la técnica aplicada permite determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en los productos utilizados en este trabajo de manera rápida, sensible y específica al detectar (10^0 ufc ml⁻¹) en 12 hrs. Asimismo, la especificidad queda demostrada al permitir únicamente la identificación de las especies de éste género en las muestras.



II. Antecedentes

II.1. INOCUIDAD ALIMENTARIA

La inocuidad de los alimentos surge del interés de prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) de etiología microbiana. El alimento de buena calidad sanitaria será aquel que no solo se encuentra libre de agentes patógenos, debe ser nutritivo, fresco, sensorialmente aceptable, inocuo, y con larga vida de anaquel. Esta serie de atributos deben procurarse desde su generación en donde quiera que esta ocurra, hasta su servicio y consumo. Debe ser norma y objetivo de quienes producen, preparan, procesan y/o sirven alimentos, como una responsabilidad social. Una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas. Los daños incluyen presentación de enfermedades, gastos de atención médica, menoscabo de la calidad de vida, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo y causa de muerte (Fernández, 2000).

II.1.1. Microorganismos en los alimentos

Los microorganismos de interés sanitario en los alimentos incluyen, bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, virus, parásitos microscópicos o sus estados de huevecillo o larvario, y ciertas algas microscópicas que pueden causar el deterioro del alimento o ser agentes etiológicos de enfermedades asociadas a su consumo. Los microorganismos tienen acceso a los alimentos a través de una diversidad de fuentes y mecanismos como son: suelo y agua, plantas y productos vegetales, tracto gastrointestinal del hombre y de los animales, manipuladores de alimentos piensos y piel de los animales (Fernández, 2000; James, 1992).

En general, el número y tipo de microorganismos presentes en un producto alimenticio terminado están influenciados por:

1. El medio ambiente general del cual fue obtenido el alimento.
2. La calidad microbiológica del alimento en su estado fresco o antes de ser tratado.

3. Las condiciones higiénicas bajo las cuales el alimento es manipulado y tratado.
4. La adecuación de las posteriores condiciones de envasado, manipulación y almacenado para mantener la flora a un bajo nivel.

II.1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos

Si bien los alimentos son indispensables para mantener la vida, también pueden ser responsables de enfermedades. Los alimentos son mezclas complejas de sustancias químicas y con frecuencia contienen compuestos que son potencialmente perjudiciales, del mismo modo que también contienen compuestos benéficos. Además de los riesgos que existen por presencia de toxinas naturales que son una característica intrínseca de su composición, los alimentos también pueden actuar como el vehículo por medio del cual puede ser ingerido un agente exógeno perjudicial. Este puede ser un pesticida, algún otro contaminante químico que ha sido añadido a un alimento intencionada o accidentalmente, un microorganismo o su toxina (Adams y Moss, 1995).

La enfermedad transmitida por alimentos ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico causada por, o que se cree que es causada por el consumo de los alimentos o de agua". La mayoría de las ETA's son de origen microbiano, tal vez sean el problema más extendido en el mundo contemporáneo y una causa importante de la reducida productividad económica (Adams y Moss, 1995).

En las personas sanas y bien alimentadas del mundo desarrollado, la mayoría de las intoxicaciones alimentarias son un episodio desagradable cuya curación normalmente es total, transcurridos unos pocos días. No obstante, por lo que se refiere a la sociedad como conjunto, cada vez más se está considerando que es una carga económica en gran parte evitable. En los países menos desarrollados, las consecuencias de la enfermedad transmitida por alimentos son todavía más graves. Las enfermedades diarreicas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los países pobres, especialmente en los niños. Todos los años se

presentan un número estimado de mil millones (10^9) de episodios y como consecuencia de los mismos mueren cerca de cinco millones de niños de menos de 5 años. La diarrea puede aparecer repetidamente en el mismo individuo provocándole malnutrición la que, a su vez, le predispone a episodios diarreicos más graves y a otras infecciones graves (Adams y Moss, 1995).

Entre los factores coadyuvantes en los brotes de intoxicación alimentaria se encuentran la preparación excesivamente anticipada, conservación a temperatura ambiente, refrigeración insuficiente, alimento tratado contaminado, cocción insuficiente, alimento enlatado contaminado, descongelación inadecuada, contaminación cruzada, alimento consumido crudo, manipuladores de alimentos infectados, utilización de sobras y preparación de cantidades excesivas (Adams y Moss, 1995).

Los alimentos que con mayor frecuencia están incriminados en la enfermedad transmitidas por alimentos en Europa y en América del Norte son los de origen animal: la carne, las aves de corral, la leche, los huevos y los productos derivados de todos ellos (Ekperigin y Nagaraja, 1998). Algunas de las bacterias habitualmente transmitidas por alimentos son : *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Yersinia* (James, 1992).

Los cereales adecuadamente manipulados son tan secos que las bacterias no pueden crecer en ellos. Sin embargo, los granos pueden ser portadores mecánicos de células viables de muchos gérmenes patógenos si se exponen a la contaminación humana y animal. Los insectos, los roedores, los pájaros o las personas pueden contaminar los granos con *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* o *Klebsiella* (Brooks, 1969). De estos géneros, las *salmonellas* son las que plantean más problemas. Una vez que los microorganismos se desecan pueden

permanecer inactivos, pero viables, casi definitivamente, incluso aunque su número disminuya con el tiempo. Si los cereales se emplean en alimentos húmedos, las salmonellas pueden crecer. La cocción de los cereales destruye las *Salmonella* pero el polvo de los productos crudos a base de cereales desecados puede contaminar otros alimentos más sensibles durante los procesos de elaboración o preparación (ICMSF, 1980).

II.1.3. Aditivos alimentarios y su importancia en la elaboración de alimentos

Los aditivos alimentarios se definen como aquellas sustancias que se añaden intencionalmente a los alimentos y bebidas sin el propósito de cambiar su valor nutritivo, con la finalidad de modificar sus caracteres, sus técnicas de elaboración o conservación y para mejorar su adaptación al uso a que van destinados.

Los aditivos se han utilizado desde tiempos remotos. La sal (cloruro de sódico) es un buen ejemplo de ello, aunque por lo general ni siquiera se le considera como un aditivo propiamente dicho. Pero la preocupación por la composición de los alimentos, y el aumento del consumo de preparados alimentarios diversos, ha hecho que los aditivos sean sustancias cada vez más utilizadas, y también cada vez más conocidas y controladas. Para que un aditivo sea aprobado para su uso en alimentos destinados al consumo humano, debe ser sometido a diferentes pruebas que evalúen su inocuidad. (Fernández, 2000).

<http://brotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pakbbtecmuestradoc?pitem=9>

Los granos de cereales, los cereales molidos y las harinas obtenidas de los mismos, no deben estar expuestos a la alteración microbiana si se acondicionan y se almacenan convenientemente, ya que su contenido de humedad es demasiado escaso para que incluso los mohos sean capaces de crecer en estos alimentos. No obstante, si estos alimentos adquieren un grado de humedad superior al mínimo necesario para que tenga lugar el crecimiento de microorganismos, éstos crecerán a continuación. Un pequeño aumento de su humedad sólo permitirá el crecimiento de mohos, pero un aumento mayor de la misma permitirá que crezcan levaduras y bacterias (Frazier y Westhoff, 1993).

A pesar de que es posible que la carga microbiana de los granos de cereales, de los cereales molidos, y de las harinas no represente en sí un problema de alteración, tanto la cantidad como el tipo de microorganismos existentes en estos alimentos son importantes, ya que se emplean en las fórmulas de otros muchos. El aporte a los alimentos útiles de microorganismos existentes en los granos de cereales y en sus harinas es un tema importante tanto desde el punto de vista de la salud pública como por constituir un posible origen de agentes capaces de alterarlos (Frazier y Westhoff, 1993).

II.1.3.1. Maltodextrina

Las maltodextrinas son carbohidratos derivados del maíz, obtenidos mediante la conversión enzimática y/o ácida del almidón del mismo origen. Esta materia prima es utilizada tanto en la industria farmacéutica como en la alimenticia. Los principales usos alimenticios son: panificación (rellenos, productos glaseados, alimentos congelados), botanas, lácteos (imitación de quesos, sustitutos de grasas, inhibidor de la cristalización de la sacarosa), confitería, bebidas en polvo, sopas, salsas, cárnicos (retención de humedad, control del color), helados y otros.
<http://www.aracornproducts.com.mx/maltodextrina.html>.2003

II.1.3.2. Sorbitol

El Sorbitol es un alcohol hexahídrico soluble en agua y etanol, obtenido mediante la hidrogenación de la dextrosa de maíz. Se utiliza en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimenticia. Los principales usos alimenticios son: confitería (caramelos, coberturas, chiclosos, goma de mascar, comprimidos, etc.) alimentos (productos sin azúcar, panificación y galletería, jaleas, mermeladas y cajetas, toppings y rellenos, tortillas de paquete, etc).

<http://www.aracornproducts.com.mx/sorbitol.html>.2003

II.2. SALMONELLA

II.2.1. Características generales

El género *Salmonella* es uno de los más extensamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Ello se debe a la frecuencia con la cual el germen participa en brotes y casos individuales de gastroenteritis, a su singular ecología y factores que la determinan, a la diversidad de serovares y a la necesidad de disponer de técnicas más rápidas sensibles y específicas para su aislamiento e identificación. El nombre dado a este microorganismo fue introducido por Lignieres en 1900 en honor al doctor Salmon, codescubridor del germen. El primer brote de salmonelosis se describió en Alemania en 1888, entre 50 personas que habían consumido carne cruda molida proveniente de una vaca moribunda (Tauxe, 1991, ICMSF, 1996). El padecimiento se mantiene endémico en todos los países, incluidos los más industrializados, en donde de vez en cuando se presentan brotes masivos (Fernández, 2000).

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae (Brenner, 1984). Las 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; Varnam, 1991; Freeman, 1989), se reconocen dos líneas primarias en la evolución con las especies *S. enterica* y *S. bongori*. Los miembros de la primera se dividen en 7 subespecies (I, II, IIIa, IIIb, IV, IV Y VII). En el I se encuentran los serovares que causan enfermedad en humanos y animales de sangre caliente como *S. enterica* sv. *typha*, *parahyphi*, *sendai*, *thyphimurium*, *enteritidis*, *dublín*, *gallinarum/pollorum* y *abortusovis*. En los serovares aislados de vertebrados de sangre fría. *S. bongori* se sitúa en el grupo V (García del Portillo, 2000; Le Minor and Popoff, 1987).

II.2.2. Infecciones causadas por *Salmonella*

Salmonelosis (gastroenteritis salmonelósica): se define como una infección zoonótica puesto que la fuente principal de la enfermedad humana la constituyen los animales infectados. La transmisión tiene lugar por vía fecal-oral por medio de la cual el contenido intestinal de un animal infectado es ingerido con un alimento o con el agua. El período de incubación varía desde 5 horas a 5 días, los síntomas empiezan 12-36 horas después de la ingestión de un alimento contaminado. Los signos y síntomas incluyen diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos. El síndrome suele durar de 2-5 días (Adams y Moss, 1995).

Fiebre entérica: El período de incubación varía de 7-8 días, su duración media es de 14 días. Hay malestar, cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo y debilidad, generalmente acompañados de diarrea parecida al puré de chícharo. Se le puede presentar un ritmo cardiaco lento, abdomen sensible y dilatado, aumento en el tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. El estado portador se puede prolongar durante varios meses y durar años. Los portadores crónicos albergan el organismo en la vesícula biliar (Ferreraz, 1996).

Bacteremia, infecciones focales y secuelas: La bacteremia o septicemia es causada por la presencia de *Salmonellas* en la sangre, ésta puede aparecer por metástasis y el resultado es una fiebre alta y persistente, dolor en el dorso, en el

abdomen y en el tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia, y pérdida de peso. Las cepas *S. typhimurium*, de *S. choleraesuis* y de *S. dublin* son propensas a invadir la corriente sanguínea (Ferreraz, 1996).

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).

II.2.3. Detección y recuento

La detección rutinaria de las salmonellas supone una secuencia de pre enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en placas de medios selectivos, aislamiento e identificación (ICSMF, 1978; Silliker y Gabis, 1986; NOM-114, 1994).

El pre enriquecimiento, se utiliza cuando se analizan alimentos que han sido calentados, congelados, desecados y en aquellos alimentos en los que es de esperar que se encuentren células de salmonellas en escaso número. Los alimentos de pH bajo o alto pueden requerir la neutralización de caldo de pre enriquecimiento después de haber sido preparada la suspensión del alimento.

El enriquecimiento selectivo tiene por finalidad inhibir el crecimiento de otros microorganismos a la vez que permite que la salmonellas crezcan. Se consigue mediante el empleo de compuestos químicos inhibidores (por ej., colorantes, tetracionato, selenita), de una temperatura y una duración de la incubación determinadas. Los tiempos de incubación suelen ser de 16-24 horas, con temperaturas desde 35-43°C. Los caldos selectivos que utilizan habitualmente son; el caldo tetracionato con el verde brillante, el caldo selenita con cistina, el caldo para bacterias Gram-negativas, y el caldo Rappaport-Vassiliadis (Vassiliadis,

1983). El recuento de salmonellas se realiza mediante la técnica del número más probable (ICMSF, 1996; Speck, 1984).

II.2.4. Identificación

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 urea y el indol. Para asignar especies a las Enterobacterias son necesarias otras 14 pruebas. Las salmonellas suelen ser lactosa-negativas, sacarosa-negativas, ureasa-negativas, indol-negativas, H₂S-negativas y lisinodecarboxilasa-positivas, aunque existen cepas atípicas (D'Aoust, 1989; NOM-114, 1994). Las cepas lactosas positivas corrientes en los productos lácteos. Existen dispositivos comerciales (por ej., Micro ID, Minitek, API 20E, Enterotube II, Vitek) para identificar las característica bioquímicas.

Después se realiza la identificación serológica por medio de la aglutinación con antisuero polivalente somático (O). Cuando la prueba es positiva, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D, y E, suelen ser los más frecuentes). Si la aglutinación con antisuero O es negativa, se utiliza el antisuero Vi. Si se requiere, se puede practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (antisuero polivalente H). Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, se realizan las siguientes pruebas bioquímicas complementarias: rojo de metilo, para demostrar la producción de ácidos estables por la fermentación de la glucosa; Voges-Proskauer, empleada para detectar la producción de acetil metil carbinol (acetoina) por la fermentación de la glucosa; y malonato, donde se demuestra que la bacteria es capaz de utilizar éste carbohidrato como única fuente de carbono (NOM-114, 1994).

II.2.5. Métodos alternativos

Los métodos de cultivos son laboriosos y requieren 3-5 días para la identificación presuntiva de *Salmonella*. Por esta razón, han sido desarrollados numerosos métodos de detección más rápidos, que incluyen anticuerpos fluorescentes (Cherry y col., 1975; Insalata y Chordash, 1984. Cox y col., 1987), pruebas de hibridación ADN/ADN (ADNH) (Fitts y col., 1983), aglutinación (Rose y Stringer, 1989), radioinmunoensayo (Van Vunakis, 1980), serología de enriquecimiento (Speber y Diebel, 1969), prueba de la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Voller y col., 1986), perfil plásmidico (Birnboim y Doly., 1979; Towsen y col., 1985) pruebas con fagos de *Salmonella* (Welkos y Bare, 1974), sondas de ADN (ICMSF, 1996) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mc Pherson y Møller, 2000). Se ha dedicado mucho empeño en evaluar una amplia gama de métodos alternativos ideados para la detección de *salmonella*; por ejemplo la determinación automatizada de la modificación de la conductancia (Gibson y col., 1992), la hibridación colorimétrica del ADN (Foster y col., 1992) y el enriquecimiento de la movilidad, aplicada a coco, chocolate y otros productos (De Smedt y col., 1994). El método de ELISA (con anticuerpos policlonales o con anticuerpos monoclonales) y el de ADNH, han recibido la aprobación del primer escalón de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales (Flower y col., 1986^a, b).

En los últimos años el extraordinario auge experimentado por la biología molecular y en concreto el desarrollo y optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, han revolucionado los campos más diversos de la ciencia, hasta el punto de convertir en rutina multitud de procesos que antes exigían procedimientos artesanales e imprecisos, ya al ser una técnica genética basada en la detección de secuencias específicas de ADN la especificidad del resultado se incrementa así como los tiempos y sensibilidad de los mismos.

II.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR es el nombre que se ha dado a la amplificación in vitro de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante ciclos repetidos de síntesis dirigidos por oligonucleótidos específicos (cebadores) 5' y 3', que flanquean el segmento de interés para la amplificación. Además del ADN blanco y los cebadores se requiere una solución amortiguadora en la reacción, desoxinucleótidos (dNTP's) y ADN polimerasa. Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres pasos que son:

1. Desnaturalización : separación de las cadenas del ADN blanco.
2. Hibridación o alineamiento: unión específica entre los cebadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco.
3. Extensión: reacción enzimática en la que interviene una ADN polimerasa la cual permite, a partir de los cebadores, completar la secuencia del fragmento de interés utilizando desoxinucleótidos libres que se encuentran en la reacción.

Durante un segundo ciclo y siguientes el fragmento de ADN original y el resultante de la primera amplificación sirve de molde para amplificaciones posteriores, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de amplificación. El ADN amplificado es detectado después mediante el uso de geles de agarosa, o mediante hibridación con una sonda marcada con isótopos radioactivos (Walker y Gingold, 1997).

II.3.1. Aplicación de la PCR en el diagnóstico de patógenos en alimentos

La seguridad microbiológica de los alimentos continúa suscitando gran preocupación entre todos los componentes de la cadena alimentaria, del campo a la mesa. Los nuevos métodos de detección e identificación de patógenos microbianos, basados en el ADN, ofrecen ventajas tanto para los productores como para los consumidores. Estos métodos, al utilizar información genética para detectar a las bacterias, proporcionan resultados más rápidos y precisos que los tradicionales. La PCR es una técnica de biología molecular que ha tomado

importancia en el campo de los laboratorios de diagnóstico, es utilizada en la identificación de patógenos en alimentos y se ha convertido en una herramienta invaluable en la microbiología clínica (Lui y col. 2002). La PCR ha sido adaptada para la detección de microorganismos en alimentos (Abouzeed y col., 2000; Boyd y col; 1997), en el ambiente (Dupray y col. 1997); Feder y col., 2001; Soumet y col., 1999) y en muestras clínicas (Chen y col., 1997; Chiu y col., 1996).

Entre las principales aplicaciones de la técnica de la PCR al análisis de patógenos en los alimentos se encuentran la detección de *L. monocytogenes*, *Campylobacter sp.*, *Yersinia enterocoligica*, *Vibrio Cholerae*, *Shigela flexneri*, *E. coli* y *Salmonella* (dos Santos y col., 2001; Bhagwat, 2003; Trochimchuk y col., 2003)



III. Justificación

Las especies del género *Salmonella* se consideran patógenos de alto riesgo para la salud humana. La incidencia de los brotes varía según el país y la localización geográfica. En México los índices de intoxicaciones por el consumo de alimentos son muy altos, por citar un ejemplo en el año 2002 se reportaron 74.974 casos de tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis, donde Jalisco figura como el cuarto lugar con 4.876 casos (SSA:<http://www.salud.gob.mx/2003>).

Por otra parte en nuestro país son pocas las industrias alimenticias que logran una calidad higiénica que permita la exportaciones de sus productos, ya que deben garantizar y comprobar la inocuidad de los mismos. Las empresas que elabora productos derivados de maíz (almidones, sorbitol, maltodextrinas) y que exportan estos productos a Estados Unidos, requiere de metodologías más rápidas para la detección de *Salmonella* y otros patógenos, ya que la rapidez con que se obtenga un resultado repercute directamente en sus ventas y en los ingresos económicos que estos generen. Además de garantizar la calidad de sus productos y brindar seguridad al consumidor.

En este sentido la utilización de la PCR como técnica de diagnóstico supondría un avance importante en la detección de *Salmonella*, ya que al ser una técnica genética basada en la visualización del ADN, la especificidad aumenta al detectar secuencias características de *Salmonella* en los alimentos aun en presencia de otros microorganismo que pueda causar interferencia en el diagnóstico.



IV. Hipótesis

La técnica de PCR permitirá la detección rápida, sensible y específica de *Salmonella* en productos derivados de maíz empleados como aditivos en la elaboración de alimentos.



V. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica genética por PCR que represente una alternativa rápida, sensible y específica, para la detección de *Salmonella* en productos derivados del maíz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Optimizar la extracción de ADN genómico de cultivos puros y muestras de productos derivados del maíz contaminados artificialmente con *Salmonella* sp.
- 2.- Optimizar la técnica de PCR mediante la utilización de cebadores específicos para la amplificación de un fragmento de interés que sea capaz de identificar a *Salmonella* en muestras de productos derivados de maíz artificialmente contaminados.
- 3.- Optimizar la técnica de PCR en muestras de productos derivados de maíz artificialmente contaminados con *Salmonella* spp. hasta conseguir una sensibilidad de 1-10 célula por gramo o mililitro.
- 4.- Evaluar la técnica desarrollada en la detección de *Salmonella* spp. en muestras reales de maltodextrina y sorbitol.



VI. Materiales y Métodos

VI.1 Cultivo de microorganismos

Las cepas se adquirieron del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y del Centro Estatal de Laboratorios (CEESLAB) de la Secretaría de Salud.

Material biológico: Se emplearon 8 cepas de *Salmonella*:

Salmonella enteritidis

Salmonella typhimurium (ATCC) 14028,

Salmonella choleraesuis

Salmonella montevideo

Salmonella ponna

Salmonella michigan

Salmonella agona

Salmonella gaminalla

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

Enterobacter aerogenes

Citrobacter freundii

Proteus rettgeri

Proteus vulgaris

Shigella sonnei

Bacillus subtilis

Bacillus cereus

Pseudomona aeruginosa

El cultivo de microorganismos se realizó en agar nutritivo, se revitalizaron 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 la maltodextrina y el sorbitol, se realizó 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 Utilización 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 descrito por Laird y col., 1995. Este método se aplicó tanto a los cultivos puros de bacterias, como en los ensayos con maltodextrina y sorbitol contaminado artificialmente con las diluciones de *Salmonella sp.* La optimización de la extracción de ADN se realizó en las siguientes condiciones:

1ml de cultivo bacteriano, se centrifugó 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 solución de lisis y 5µl de proteinasa K. Se incuba a 55°C en baño maría durante 90 minutos y se enfría 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 μ l de agua ultrapura libre de RNAsa ó buffer TAE.

Reactivos:

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

NaCl	8,0g/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 ultrapura)

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 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 (pb).

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 con las condiciones utilizadas por Gutiérrez y col., 2002. En este caso el fragmento de interés comprende una secuencia de 152 pb del gen "hns".

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:

Cebador 1: 20 pm/µl.....	1µl
Cebador 2: 20 pm/µl	1 µl
MgCl ₂ (50 mM).....	2 µl
ADN	10 µl
Agua ultrapura.....	<u>11 µl</u>
Volumen de reacción	25 µl

Los tubos con los componentes para la reacción se agitan en el vortex y se someten a 35 ciclos de amplificación en un termociclador (Techne Progenie) que incluyen: desnaturalización, hibridación, extensión.

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 ADN 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 ultrapura libre de RNAsas esterilizada por filtración
- 3.-Cebador Gibco BRL

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

Cebador 1: TAC CAA AGC TAA ACG CGC AGC T

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

Nota: Todos los reactivos utilizados son libres de ADNsas, RNAsas, ADN, 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 100ml 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 0,5 μ g/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 toques y se cubre con amortiguador TAE, posteriormente se retira el peine.

Preparación de las muestras para electroforesis

8 μ l de la muestra que contienen los productos de amplificación por PCR se mezclaron con 2 μ l de gel loading buffer [Azul de bromofenol 0,05% (p/V), sacarosa 40,0%, EDTA 0,1M, pH 8,0, SDS 0,5% (p/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 (1 μ l de marcador, 2 μ l de gel loading buffer y 5 μ l agua ultrapura libre de RNAsas). 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 productos derivados de maíz (maltodextrina y sorbitol) contaminados artificialmente.

Se prepararon 9 vasos de precipitado con 225 ml de agua peptonada a los cuales se les agregó 25g de muestra estéril de cada uno de los productos (maltodextrina y sorbitol) para la batería de diluciones del rango de 10^8 a 10^0 ufc/ml (inoculación artificial de las muestras). Para comprobar que las muestra estuvieran libre de presencia bacteriana se sometieron a pruebas de microbiológicas. Se toma 1 ml de cada uno de las diluciones y se deposita en un tubo eppendorf para realizar la extracción de ADN, PCR y electroforesis, de acuerdo al procedimiento mencionado anteriormente (Fig. 1).

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

Debido a que la sensibilidad conseguida en los primeros ensayos fue 10^4 ufc ml⁻¹. Las diluciones con las muestras comprendidas 10^3 a 10^0 se incubaron a 37°C en un agitador orbital durante 8, 10 y 12 horas con la finalidad de optimizar las condiciones a las cuales se alcanza la sensibilidad deseada. Pasado el tiempo requerido se procede a la extracción de ADN, realización de PCR y electroforesis (Fig. 2).

VI.5 Evaluación de la técnica en la detección de *Salmonella* en productos derivados de maíz.

Con la finalidad de evaluar la técnica desarrollada, se realizaron ensayos con muestras de 20 lotes de maltodextrina y 20 lotes sorbitol para intentar determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* con el procedimiento antes descrito, en los apartados VI.3 y VI.4 (Fig. 2).

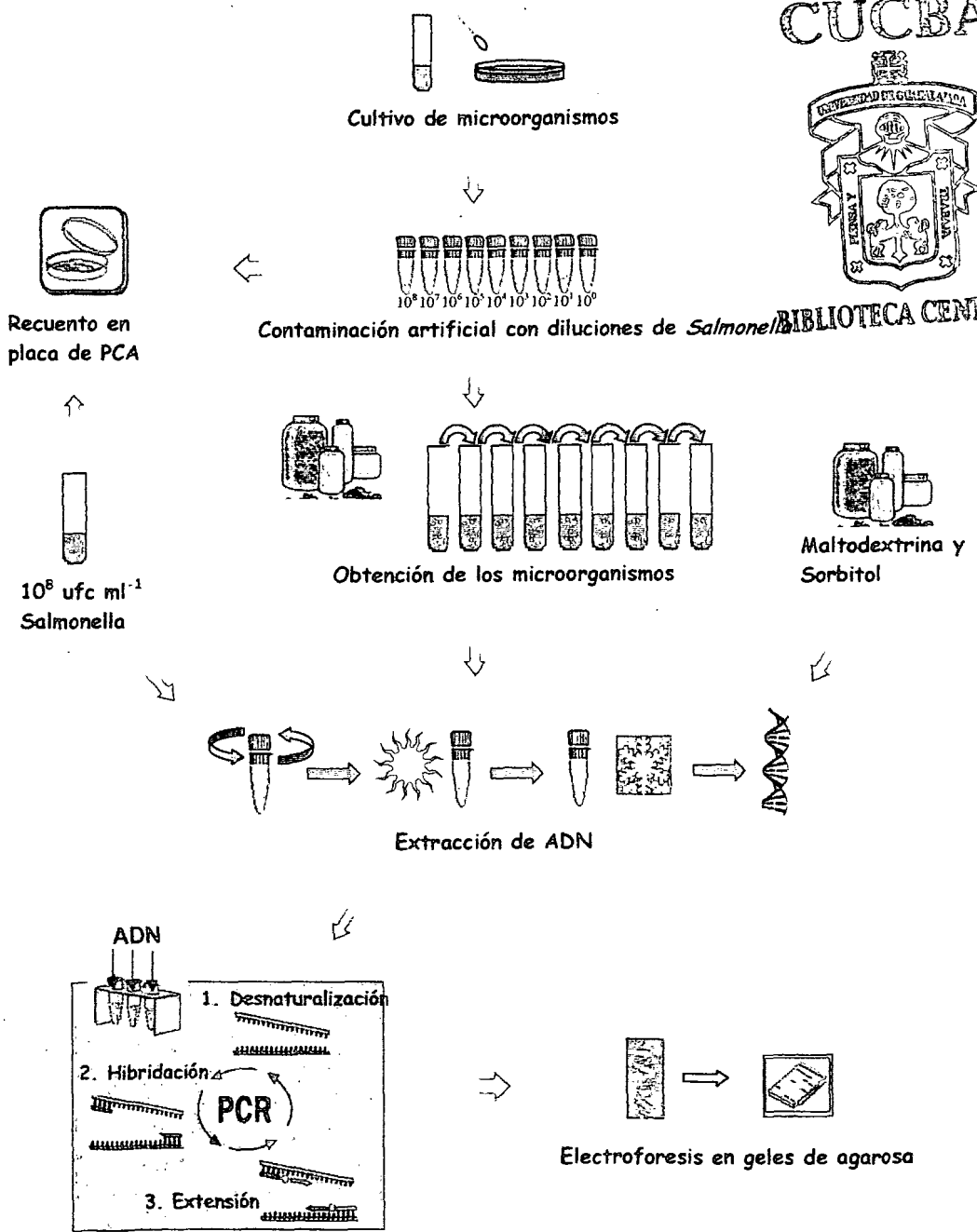


Fig. 1. Diagrama de flujo de la metodología

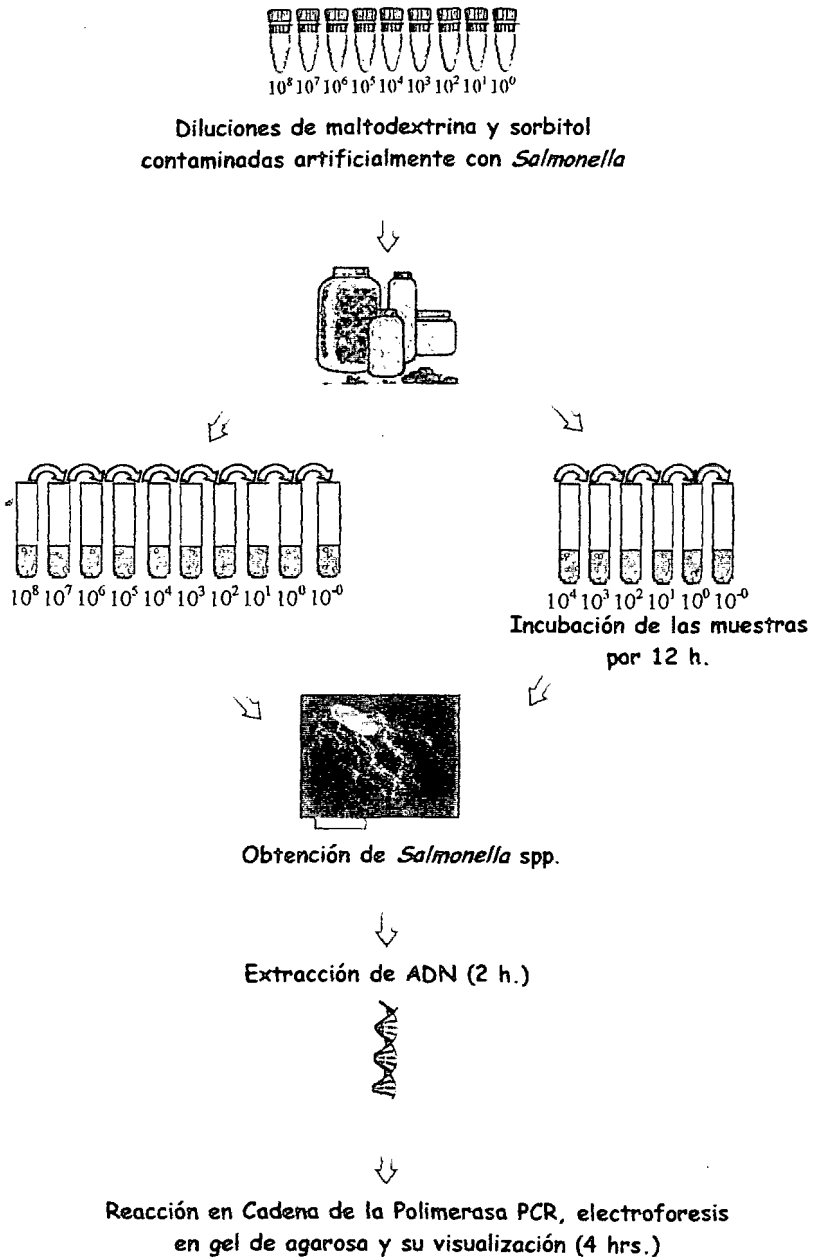


Fig. 2. Diagrama de la identificación de *Salmonella* en maltodextrina y sorbitol con la técnica de PCR en el cual se especifica el tiempo y la sensibilidad obtenida.



VII. Resultados y Discusión

VII.1 Obtención del ADN genómico de bacterias.

El método de extracción de ADN seleccionado (Laird y col.,1995), permitió la obtención de ADN suficiente para la PCR, a partir de:

1. ADN de cultivos puros de las bacterias seleccionadas *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. Montevideo*, *S. ponna*, *S. michigan*, *S. agona*, *S. gaminalla* y las de referencia *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *Sh. soneii*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Ps. aeruginosa*.
2. ADN de diluciones de cultivos de *S. enteritidis* comprendidos entre 10^8 y 10^0 ufc ml⁻¹ con las que se contaminaron artificialmente las muestras estériles de maltodextrina y sorbitol.
3. ADN extraído de las bacterias encontradas en las muestras reales de maltodextrina y sorbitol.

VII.2 Optimización de la PCR a partir de cultivos puros de las bacterias seleccionadas.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los procesos de búsqueda bibliográfica y la optimización de las condiciones experimentales para la amplificación del fragmento de interés fueron las correctas debido a que se consiguió la amplificación del fragmento de 152 pb únicamente en las especies del género *Salmonella*.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba de la especificidad de los cebadores para el género *Salmonella*, en donde se pueden apreciar las bandas de amplificación de 152 pb, obtenidas a partir de cultivos puros (10^8 ufc ml⁻¹) de las bacterias antes mencionadas. Como se observa, los carriles 2-9, corresponden a los fragmentos de amplificación de las 8 salmonellas probadas en este estudio y como se esperaba, con el resto de bacterias de referencia, no se presentó amplificación.

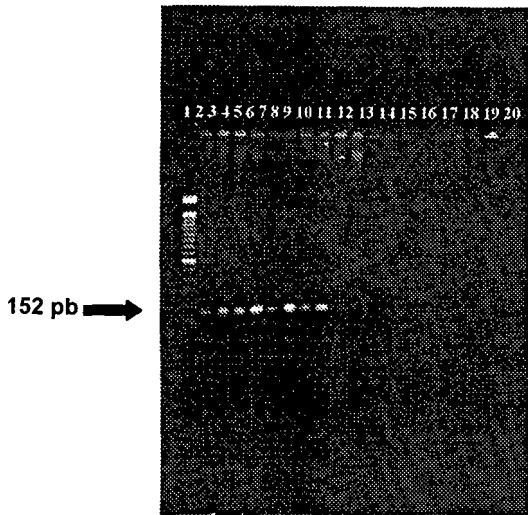


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de cultivos puros a una concentración de 10^8 ufc ml^{-1} . 1) Marcadores moleculares (100 pb), 2) *Salmonella ententidis*, 3) *S. typhimurium*, 4) *S. choleraesuis*, 5) *S. Montevideo*, 6) *S. ponna*, 7) *S. michigan*, 8) *S. agona*, 9) *S. gaminalla*, 10) *S. aureus*, 11) *L. monocytogenes*, 12) *E. coli*, 13) *E. aerogenes*, 14) *C. freundii*, 15) *P. rettgeri*, 16) *P. vulgaris*, 17) *Sh. soneii*, 18) *B. subtilis*, 19) *B. cereus*, 20) *Ps. aeruginosa*.

VII.3 Evaluación de la técnica de PCR en la detección *Salmonella* en muestras estériles de maltodextrina y sobitol artificialmente contaminadas.

Los ensayos en muestra estériles de maltodextrina y sorbitol artificialmente contaminadas con las concentraciones comprendidas entre 10^8 - 10^0 ufc ml^{-1} , demostraron que el límite de detección de la técnica aplicada de es 10^3 ufc ml^{-1} (figura 4) por lo que fue necesario realizar varios ensayos con las concentraciones comprendidas entre 10^4 - 10^0 ufc ml^{-1} con la finalidad de alcanzar una sensibilidad de 10^0 ufc ml^{-1} .

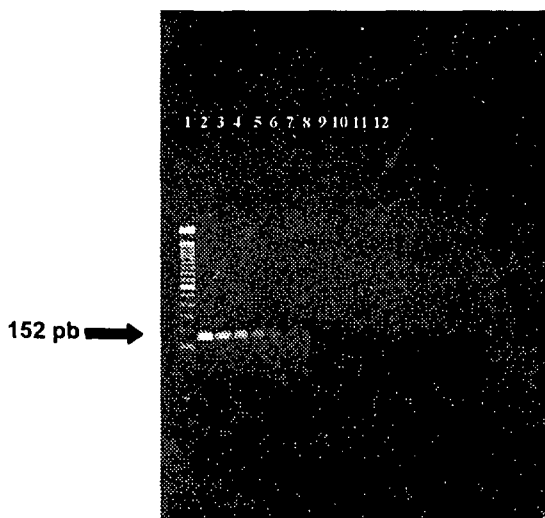


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de muestras estériles contaminadas artificialmente con diluciones de *S. enteritidis* 1) Marcadores moleculares (100 pb), 2) 10^8 , 3) 10^7 , 4) 10^6 , 5) 10^5 , 6) 10^4 , 7) 10^3 , 8) 10^2 , 9) 10^1 , 10) 10^0 11) 10^0 , 12) Control negativo.

La sensibilidad deseada se obtuvo incubando las muestra artificialmente contaminadas con las concentraciones comprendidas entre 10^4 - 10^0 ufc ml^{-1} durante 12h antes de realizar los ensayos de PCR. La figura 5 muestra los resultados de un gel de agarosa al analizar las diluciones de *S. enteritidis* contaminando artificialmente muestras estériles de maltodextrina y sorbitol, 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 evaluada es tan sensible que al haber en las muestras una célula de *Salmonella* es capaz de detectarla (carril 6). Por el contrario, en el carril 7 en donde no existen células de *Salmonella* no se aprecia la banda de amplificación del fragmento de interés.

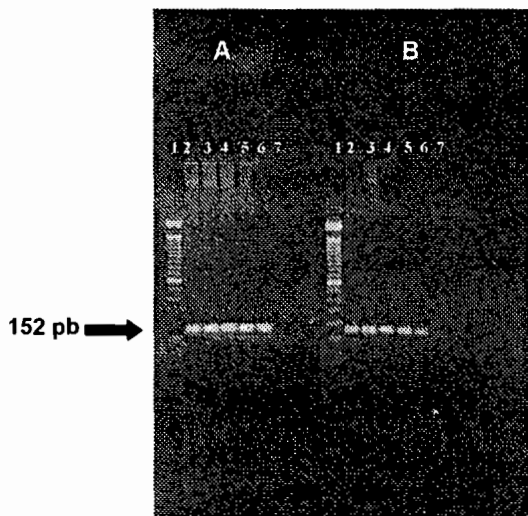


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de muestras estériles de A) maltodextrina y B) sorbitol contaminadas artificialmente *S. enteritidis*, incubadas durante 12 hrs., con las siguientes concentraciones 1) Marcadores moleculares (100 pb), 2) A 10^4 , 3) A 10^3 , 4) A 10^2 , 5) A 10^1 , 6) A 10^0 , 7) A 10^0 y 2) B 10^4 , 3) B 10^3 , 4) B 10^2 , 5) B 10^1 , 6) B 10^0 , 7) B 10^0 .

VII.4. Evaluación de la técnica desarrollada en la detección de *Salmonella* en muestras reales de maltodextrina y sorbitol.

Se analizaron muestras de 20 lotes de maltodextrina y 20 lotes de sorbitol para evaluar la aplicabilidad de la técnica en la detección de *Salmonella*. Los resultados obtenidos demostraron que tanto las muestras de maltodextrina y sobitol analizadas no presentaron contaminación con *Salmonella*, ya que en ninguno de los carriles apareció el fragmento de amplificación de 152 pb indicativo de la presencia de *Salmonella* (Figuras 6 y 7).

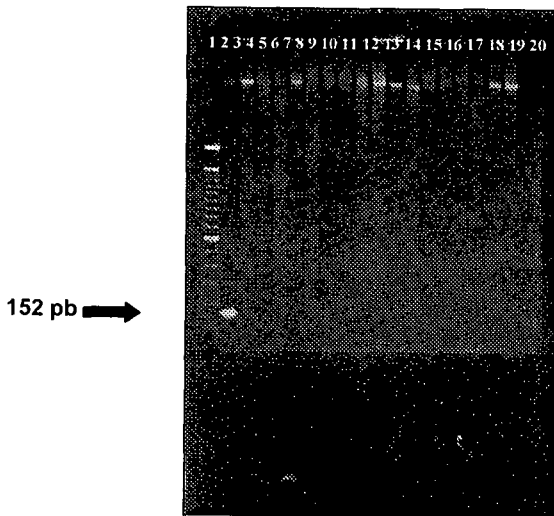


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de los microorganismos presentes en muestras de maltodextrina (sin contaminar artificialmente) 1) Marcadores moleculares (100 pb), 2) control positivo, 3 -20) muestras de lotes de maltodextrina.

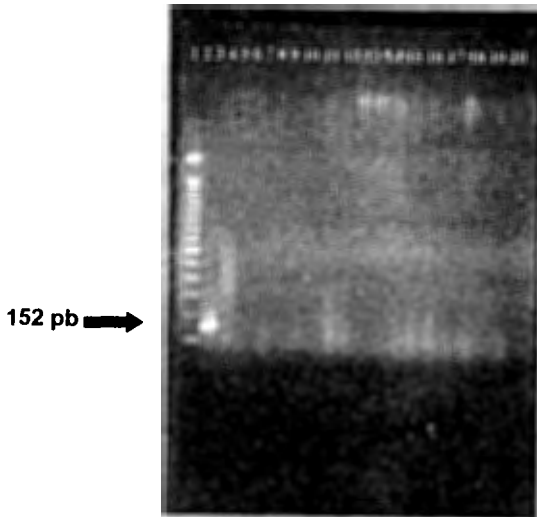


Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del ADN extraído de los microorganismos presentes en muestras de sorbitol (sin contaminar artificialmente) 1) Marcadores moleculares (100 pb), 2 -20) muestras de lotes de maltodextrina.

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 la técnicas actuales de diagnóstico de *Salmonella* en alimentos e implantarse como técnica rutinaria de diagnóstico en los laboratorios de nuestro país.



VIII. Conclusiones

1. El método de extracción de ADN empleado resultó ser eficaz tanto para cultivos puros, como para las muestras de maltodextrina y sorbitol contaminadas artificialmente con *Salmonella*.
2. Los cebadores seleccionados, fueron específicos para amplificar por PCR el fragmento de 152 pb en las 8 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 las diluciones de *Salmonella* comprendidas entre 10^8 - 10^0 ufc ml^{-1} inoculadas artificialmente a muestras estériles de maltodextrina y sorbitol.
4. La sensibilidad de la técnica se incrementa notablemente al agregar un período de incubación de 12 horas. El límite de detección conseguido fue de 10^0 ufc ml^{-1} en muestras de maltodextrina y sorbitol contaminadas artificialmente.
5. Los 20 lotes de maltodextrina y 20 lotes de sorbitol analizados, no presentaron contaminación con *Salmonella* al no amplificar el fragmento característico de 152 pb..



IX. Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Abouzed, Y. M., Hariharan, H., Poppe, C. and Kibenge, F. S. (2000)** Characterization of *Salmonella* isolates from beef clattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23:253-266.
- Adams, M. R. and Moss, M.O. (1995)** Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia. 175-181, 241-251.
- Bhagwat, A. A. (2003)** Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by rea-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 217-224
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid. Research.* 7:1513-1523.
- Boyd, E. F., Li, J., Ochman, H. and Selander, R. K. (1997)** Comparative genetics of de *Inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 179:1985-1991.
- 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, M. A. (1969).** General relationships between microorganims and insects. *Proc. Symp. Bio. Contam. Grain Anim. Byprod.* Pp. 17-20. Agric. Ext. Serv., Dep. Entomolo. Fish., Wildl., Univ. Minnesota, Minneapolis.
- Chen, S., Yee, A., Griffiths, M., Larkin, C., Yamashiro, C. T., Behari, R., Paszko-Kolva, C., Rahn, K. and De Grandis, S. A. (1997)** The evaluation of a fluorogenic

polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int. J. Food Microbiol.* 35:239-250.

Cherry, W. B., Thomason, B. M., Gladden, J. B., Holsing, N. and Murlin, A. M. (1975). Detection of *Salmonella* in foodstuffs, feces and water by immunofluorescence. *Annl. N.Y. Acad. of Science.* 254:350-68.

Chiu, C., and Ou, J.T. (1996) Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* 34:2619-2622.

Cox, W. A., Funa, D. Y. C., Bailey, J. S. Hartman, P. A. and Vasavada, P. C. (1987) Minaturized 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 Dekke: 327-445.

Darnell, J., Losidhs, H. y Baltimore, D. (1993) *Biología Celular y Molecular* 2^{da} edición. Omega, S. A. Barcelona. 211.

De Smedt, J., Bolderdijk, R. and Milas, J. (1994). *Salmonella* detection in cocoa and chocolate by mobility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. *J. of the AOAC Inter.* 77:365-73.

Dos Santos, L. R., do nascimento, V.P., Oliveira, S. D., Flores, M. L., Pontes, A. P., Ribeiro, R. A., Salle, T. P. C. and Lopes, R. F. .F. (2001) Polymerase Chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculed chicken meta. *Rev. inst. Med. Tro. S. Paulo.* 43:247-250.

Dupray, E., Caprais, M. P., Derrien, A., and Fach, P. (1997) *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.* 82:507-510.

Ekperingin, H. E. And Nagaraja, K. V. (1998) Microbial food borne pathogens. *Salmonella K. Vet. Clin. N. Am. Food Anm. Pract.* 14: 17-29.

Feder, I., Nietfeld, J. C., Galland, J., Tyearly, T., Sargeant, J. M. Oberst, R., Tamplin, M. L. and Luchansky, J. B. (2001) Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water sample. *J. Clin. Microbiol.* 39:2477-2484.

Fernández, E. E. (2000) Microbiología e inocuidad de los alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Queretaro. 7, 10, 746, 789.

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

Fitts, R. S., Diamond, M., Hamilton, C. and Neri, M. (1983). DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. In food. *Appli. and Environ. Microbiol.* 46:1146-5.

Flower, R. S., Eckner, K., Gabis, D. A., Robinson, B. J. Mattingly, J. A. and Silliker, J. H. (1986a) Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods; Collaborative study. *J. of the Assoc. of Offic. Anal. Chemists.* 69:786-98.

Flower, R. S., Klatt, M. J., Mozola, M. A., Curiale, M. S., Gabis, D. A. and Silliker, J. H. (1986b) A DNA hybridization assay for the detection of *Salmonella* in foods; Collaborative study. *J. of the Assoc. of Offic. Anal. Chemists.* 70:521-9.

Frazier, W. C. y D. C. Westhoff. (1993) *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 236.

Foster, K., Garramone, S., Ferraro, K. and Groody, E. P. (1992) A ADN hybridization method and conventional culture method for the detection of *Salmonella* in foods: comparison of methods. *J. of the AOAC Intern.* 75:685-92.

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

García del Portillo, F. (2000). Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis: 3-49. In: *Microbial Foodborne Diseases*. Cary, J.W., Linz, J.E. and Bhatnagar, D. (Eds.) Technomic Pub. Co. Pensylvania, USA.

Gibson, D. M., Coobs, P. and Pimbley, D. W. (1992) Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods; collaborative study. *J. of the AOAC Intern.* 75:293-302.

Gutiérrez, R., Guerrero, A. and Torres, Y. J. (2002) Development of a fast method for *Salmonella* detection in food. *Tecnología de Alimentos ATAM*. Institute of Food Technologists. 30. 03 mayo- junio.

<http://www.aracornproducts.com.mx/maltodextrina.html>

<http://www.aracornproducts.com.mx/sorbitol.html>

<http://brotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pakbbtecmuestradoc?pitem=9>

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

ICMSF (International Commission of Microbiological for Foods) (1980) Ecología microbiana de los alimentos. Vol. 2 productos alimenticios. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp.696-697.

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. and Chordash, R. A. (1984) Fluorescent antibody detection of *salmonellae*, in Speack, 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. Jay. (1992) Microbiología moderna de los alimentos. Tercera edición. Ed. Acribia. 20-23, 28, 115-127, 145-176.

Jones, D. D., Law, R. and Bej, A. K. (1993) Detection of *Salmonella* spp. In oysters using polymerase chain reaction (PCR) and gene probes. J. Food Scien. 6, 1191-1197.

Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A. Jaenisch, R. and Berns, A. (1995) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*. 19: 4293.

Le Minor, L. and 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.

Liu, T., Liljebjelke, K., Barlett, E., Hofacre, C., Sanchez, S., and Murer, J. J. (2002) Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food. Prot.* 65:1227-1232.

Mc Pherson, M.J. and Møller, S. G. (2000) PCR. Bros, Springer. New York Inc. 1-3.

NOM-114-SSAI-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

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

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

Silliker, J. H. and 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. 209-219.

Soument, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., and Colin, P. (1999) Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:1-6.

Speber, W. H. and Deibel, R. H. (1969) Accelerated procedures for *Salmonella* in dried foods and feeds involving only broth cultures and serological reactions. *Appl. Microbiol.* 17:53-9.

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

SSA: <http://www.salud.gob.mx/2003>

Tauxe, R.T. (1991) Salmonella: a postmodern pathogen. *J. Food Prot.* 54:663-568.

Thomason, B. M. (1981) Current status of immunofluorescent methodology for salmonella. *J. of Food Prot.* 44:381-4.

Towsen, D. C., Ashdown, N., Bolton, S. and 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 77, 137-143.

Trochimchuk, T., Fotheringham, J., Topp, E., Schraft, H. and Leung K. T. (2003) A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure. *J. Microbiol. Meth.* 54, 165-175.

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

Varnam, A.H. (1991). *Foodborne Pathogens. An Illustrated Text.* Volfe Publ. Ltd.

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

Voller, A., Bidwel, D. and Bartlett, A. (1986) Enzyme linked immunosorbent assay. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* Rose, N. R., Friedman, H. and Faney, J.L. (eds), American Society for Microbiology, Washington D. C. 99-109.

Walker, J. M. y Gingold, E. B. (1997) *Biología molecular y biotecnología*. 2da Ed. Acribia. 53-55.

Welkos, S., and Bare, H. (1974) Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. *Appli. Microbiol.* 28:618-22.