

11261
8
205

DETECCION DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS-200)
ESPECIFICAS DEL GENERO Salmonella POR PCR EN MUESTRAS
DE ALIMENTOS Y MUESTRAS FECALES.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
BIOMICAS AREA BACTERIOLOGIA, PRESENTA:

Q.F.B. ALMA EDNA INZNUNZA MONTIEL.

ASESOR ACADEMICO: M. en C. RAFAEL GARCIA GONZALEZ
Dr. RAUL CANO.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

J U R A D O

PRESIDENTE: DRA. EMMA MELENDRO LOZANO

SECRETARIO: M. en C. CARLOS ESLAVA CAMPOS

PRIMER VOCAL: M. en C. RAFAEL GARCIA GONZALEZ

SUPLENTE: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

SUPLENTE: DRA. ROCIO REYES MONTES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología
Molecular-Biological Sciences Departament. California
Polytechnic State University, San Luis Obispo, CA 92407 USA

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas producidas por el género *Salmonella* causan daños severos y algunas veces hasta la muerte. Tanto en países desarrollados como en desarrollo, *Salmonella* es causa de brotes de gastroenteritis. Su transmisión está asociada con el nivel de saneamiento y el nivel socioeconómico. *Salmonella* se transmite de manera directa o indirecta: ya sea de un individuo a otro, por contaminación de agua y alimentos con materia fecal de personas infectadas con *Salmonella* o bien por portadores sanos manejadores de alimentos. De aquí, surge la necesidad de contar con pruebas eficientes de diagnóstico en el laboratorio que detecten *Salmonella* para una vigilancia epidemiológica, un monitoreo del medio ambiente, y un control de calidad en los alimentos.

Salmonella como un agente causante de enfermedades infecciosas representa un problema económico y de salud pública de gran trascendencia tanto a nivel médico como en la industria de alimentos.

Por lo anterior, la presentación de este trabajo tiene como finalidad aplicar técnicas de Biología Molecular en el diagnóstico microbiológico. En este estudio se describe una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específico para *Salmonella*, la cual fue desarrollada, estandarizada y aplicada para el diagnóstico de dicho microorganismo con DNA extraído por la técnica de Boom modificada, directamente de muestras de alimentos y muestras fecales. Nuevos iniciadores SF1/SR2 que amplifican fragmentos de DNA correspondientes a Secuencias de Inserción (IS-200) únicos para *Salmonella* fueron usados. En 24 cepas tipo de *Salmonella* el producto amplificado fue un fragmento de aproximadamente 206 pb correspondientes a IS-200, con un nivel de detección de 6-60 organismos, en tanto que para otras Enterobacterias la PCR fue negativa. Detección de *Salmonella* tanto en cultivo como por PCR fue realizado en 152 muestras de alimentos y 92 muestras fecales de pacientes con diarrea: en 24 y 46 muestras se encontró *Salmonella* tanto en cultivo como por PCR en alimentos y heces respectivamente; 123 muestras de alimentos fueron negativas para *Salmonella* en cultivo y PCR, y 42 de heces fueron también negativas por ambos métodos; 2 muestras de alimentos y 0 de heces fueron cultivo negativo y PCR positivo; mientras 3 muestras de alimentos y 4 de heces fueron cultivo positivo y PCR negativo. La sensibilidad de la PCR fue de 88% y la especificidad del 98% para muestras de alimentos mientras que para heces la sensibilidad de la PCR fue de 92% y la especificidad de el 100%. Por otro lado se hizo la amplificación de IS-200 por PCR en presencia de 0.5ug/ml de bromuro de etidio (tanto en controles positivos y negativos como en muestras de alimentos y heces) después

de realizada la PCR se midió el grado de fluorescencia como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF). Usando diluciones seriadas de controles positivos y negativos para la amplificación de IS-200 se determinó que mayor de 800 UAF la PCR fue positiva, siendo que para 26 muestras de alimentos las PCR positivas presentaron un valor promedio de 1003.33 UAF mientras que para 46 muestras fecales con PCR positivo el valor promedio fue de 1522 UAF. Con base a los resultados obtenidos, se sugiere que el diagnóstico por PCR para *Salmonella* con la amplificación de IS-200 en muestras de alimentos y heces representa una alternativa de gran utilidad, ya que además de ser altamente sensible y específica, se realiza en corto tiempo.

INTRODUCCION.

Las enfermedades infecciosas continúan siendo la mayor causa de muerte a nivel mundial, entre ellas se encuentran las causantes de daños en el tracto gastrointestinal, especialmente en la población infantil y preescolar de los países en desarrollo (1, 2).

Se estima que anualmente ocurren 1647 millones de casos de diarrea en niños menores de 5 años en países en desarrollo y a nivel mundial hay 5 millones de muertes por diarrea (1,2,3).

La OMS estimó que en 1992 los niños menores de 5 años que vivían en países en desarrollo, tuvieron un promedio de 3 episodios de diarrea por año, confirmando que en esos países se presentaron 1,521 millones de casos de diarrea con una población de 547 millones de infantes (1, 4, 5). Para 1990 se hizo una estimación aproximada de 50 millones de casos de muertes a nivel mundial causadas por enfermedades infecciosas y parasitarias, siendo que 3.2 millones de muertes en menores de 5 años estuvieron asociadas con diarrea, representando la tercera causa de mortalidad después de las infecciones respiratorias agudas y causas perinatales (4).

En México, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud realizada desde 1985, ocurren al año entre 30 a 42 millones de episodios diarreicos en menores de 5 años y de 60 a 70 millones en mayores de 5 años, con un promedio de 3 a 4 eventos diarreicos por año. A nivel Nacional se reportó que el 9.5% de los casos de diarrea estudiados, había evidencia de sangre en las heces, un 9.2% tenía diarrea persistente y el 81.3% correspondía a diarrea aguda líquida. La tasa de mortalidad por diarreas durante los últimos cincuenta años ha descendido. Para 1990, se registraron 22,196 muertes por esta causa. Un estudio financiado por la OMS y publicado en 1991, realizado con niños de consulta externa de 0-35 meses de edad, en el Hospital Infantil de México, Olarte et al. (6), encontraron que, en el 70% de los casos de diarrea había la presencia de algún microorganismo patógeno y de igual manera en el 31% de casos controles. Los más frecuentes fueron *E. coli* enterotoxigénica (17% casos/7% controles), *Rotavirus* (13% casos/2% controles), *Campylobacter* (15% casos/10% controles), *Shigella sp* (11% casos/1% control), *E. coli* enteropatógena (10% casos/9% controles), el virus de Norwalk en 5%, *Salmonella sp* 4%, *Giardia lamblia* 5%, *Adenovirus* 3% y *E. histolytica* en 0.7%.

Diarrea en el viajero: estudios realizados en norteamericanos y europeos que han viajado a países en desarrollo, describen que la diarrea es usualmente líquida no inflamatoria y sin sangre con una duración de 1 a 5 días. Se encontró que el agente etiológico de las diarreas en turistas que viajan a países Latinoamericanos incluyendo México, fue *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) como responsable

de más de la mitad de los casos, seguido por *Rotavirus*, *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio* (7,8).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC), estima que en los Estados Unidos ocurren alrededor de 9 millones de casos de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos, con un promedio de 300 a 600 brotes, afectando de 10,000 a 18,000 personas al año (9). En México se notifican al año 20 brotes y son unos 1000 los afectados (10).

En cuanto a la etiología de brotes de enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos en Estados Unidos de 1972-1986, se encontró que las bacterias (66.6%) eran la causa más frecuente, siendo la *Salmonella* la causante mayor de los mismos (753) con una frecuencia del 27.4% (9). En México de igual modo, la etiología de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos durante 1986-1990 fue principalmente por bacterias en un 53.2% (10). En un estudio de vigilancia epidemiológica realizado por Gutiérrez et al., reportan que de 1982 a 1993 los Laboratorios de Salud Pública de los Estados y de la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología Entérica aislaron 3000 cepas de *Salmonella* en muestras de alimentos, principalmente en carne de cerdo (44%) y el serotipo más frecuente fue *S. derby* (14.3%) (11).

El género *Salmonella* está clasificado dentro de la familia Enterobacteriaceae e incluye a más de 2000 serotipos que infectan al hombre, *Salmonella* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, móvil mediante flagelos peritricos y con dimensiones de 2 a 3µm de largo y 0.6µm de diámetro (12).

Salmonella causa principalmente tres tipos de enfermedades en el hombre: a) fiebre enterica o fiebre tifoidea caracterizada por una fiebre continua, cefalea, dolor abdominal, bradicardia, esplenomegalia, leucopenia, ulceración y necrosis de la mucosa sobre las placas de Peyer llegando a producir hemorragia y perforación intestinal, la letalidad en forma natural es del 10% y puede disminuir al 1%, en algunos casos se presentan recaídas que como consecuencia afectan el estado nutricional del individuo. Algunas personas permanecen como portadores crónicos de la bacteria. La especie *Salmonella typhi* es la causante de este síndrome y es exclusiva del hombre (12); b) gastroenteritis que es la forma más común de la Salmonelosis y cuyo cuadro clínico varía, desde infecciones leves hasta cuadros severos que pueden ser mortales, generalmente se presenta con diarrea, es autolimitada y es causada por cualquier serotipo de *Salmonella*; c) septicemia, que es seguida por infecciones localizadas y que es producida por cualquier serotipo de *Salmonella* (13).

La fiebre tifoidea y la Salmonelosis se encuentra distribuida en todo el mundo, variando en frecuencia de un país a otro, presentándose mayormente en aquellas áreas cuyas condiciones de higiene y saneamiento no son adecuadas y que además no cuentan con medidas de salud pública

óptimas. Casos de fatalidad producidos por fiebre tifoidea en países en desarrollo se reportan con una frecuencia que va desde un 12% a un 32% comparativamente a un 2% en países desarrollados. En Estados Unidos se reportan menos de 500 casos anuales (14). En México se notifican anualmente 15,000 casos con una mayor tasa en el grupo de 15 a 64 años de edad (15).

Enfermedades diarreicas causadas por *Salmonella* no *typhi* prevalecen en países desarrollados con valores de fatalidad de <1% (16). Sólo en los Estados Unidos el número de casos se estima alrededor de 2 millones (17).

Las infecciones producidas por *Salmonella* presentan una incidencia estacional, con un pico máximo durante la temporada de calor (generalmente en el verano) y después se observa una declinación en el otoño. En México los serotipos que se encuentran con mayor frecuencia en casos y brotes son *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (11).

Transmisión. Las epidemias causadas por *Salmonella* en humanos, muchas veces se debe al consumo de carne contaminada y huevos de ave (18). Su presencia es ubicua ya que frecuentemente se aísla de agua, alimentos y muestras fecales de humanos y animales (19, 20). Por lo tanto la *Salmonella* se transmite a través de la materia fecal de enfermos o portadores sanos que contaminan el agua y los alimentos, que al ser éstos distribuidos pueden transmitir la infección a los consumidores. Se ha visto que logra sobrevivir en los alimentos, multiplicándose así en los mismos, por otro lado tiene la capacidad de resistir diferentes factores ambientales. Crece a temperaturas que van desde 8°C hasta 45°C, es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas por arriba de los 70°C, además puede resistir por años a la deshidratación en las heces, en el polvo y en algunos alimentos para el consumo humano y animal (21).

Patogenicidad. La dosis infectante de *Salmonella* es variable, en condiciones experimentales es de alrededor de 10^4 a 10^6 microorganismos por gramo de alimento (21, 22). Respecto al mecanismo de patogenicidad se sabe que causa alteraciones gastrointestinales que aumentan la secreción de líquidos y lesiones en el epitelio intestinal donde muchas veces la diarrea se acompaña de leucocitosis. El mecanismo por el cual hay secreciones de líquidos no está del todo claro, pero diferentes autores como Axon & Pool (23), presentaron evidencia clínicas de que el género *Salmonella* produce una enterotoxina similar a la que produce *V. cholerae*. Posteriormente Koupal & Deibel (24), describen una toxina de carácter proteico localizada en la pared celular o membrana externa con propiedades similares a la enterotoxina termolábil (LT) y termoestable (ST) de *E. coli*. Chopra et al. (25), obtuvieron de *S. typhimurium* la clonación molecular de el gene productor de la enterotoxina similar a la de cólera, que de igual manera induce AMPC,

prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios que alteran el transporte de fluidos y electrolitos a través de la mucosa, inhibiendo la absorción de Na⁺, K⁺ y aumentando la secreción de Cl⁻, bicarbonato y agua (13).

Por otro lado se sabe que en la fiebre tifoidea, causada por *Salmonella typhi*, los microorganismos atraviesan la pared del intestino delgado, son fagocitados por los macrófagos en los cuales sobreviven y se multiplican. Los macrófagos transportan las bacterias al Sistema Retículo Endotelial del hígado, bazo y médula ósea continuando su multiplicación intracelular. Cuando esta población alcanza una masa crítica, las bacterias invaden torrente sanguíneo y es en esta segunda bacteremia cuando se dan los signos y síntomas de tifoidea, dando término al período de incubación, posteriormente afecta la vesícula biliar y luego pasan a la luz intestinal para después ser eliminadas en la materia fecal (13).

De igual manera Fernández et al. aislaron de *S. typhi* un bacteriófago recombinante FDC-1 como el gene responsable de la codificación de una enterotoxina similar a la toxina termolábil de *V. cholerae* (CT) y *E. coli* (LT) y que su secuencia de DNA guarda cierta homología con el gene de la subunidad B de la toxina termolábil CT y LT, pero cuya funcionalidad es similar a la de la subunidad A de dicha toxina(26).

DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.

Para determinar si existe una contaminación de alimentos o agua por *Salmonella*, así como una infección causada por la misma en humanos, se basa en estudios de laboratorio, demostrando la presencia del microorganismo en la muestra a analizar, ya sea en alimentos, agua, heces, sangre, orina y exudados.

Los procedimientos que se tienen estandarizados para el aislamiento e identificación de *Salmonella* es con el uso de los medios de cultivo y pruebas bioquímicas (27,28), los cuales representan hasta una semana de trabajo para dar el diagnóstico, siendo que muchas veces estas pruebas fallan para detectar la bacteria en cuestión. Estudios realizados para determinar la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo establecen que llegan a detectar hasta un 70-80% de las *Salmonellas* (29). Existen diversos factores que pueden determinar dicho porcentaje, tales como: la presencia de bacterias estresadas que dificulta su multiplicación en medios de cultivo selectivos; un mal manejo de la muestra previo al cultivo, causando la inactivación o muerte de la bacteria; o bien que exista una distribución desigual de la bacteria en la muestra.

Otras técnicas complementarias tales como: pruebas de aglutinación con una sensibilidad y especificidad de el 84% y 94% respectivamente (30); anticuerpos fluorescentes de un 93% de sensibilidad y un 95% de especificidad (31); ELISA que ha demostrado tener una sensibilidad de el 84% y una especificidad del 94% (32), han reducido el tiempo para el diagnóstico, por lo que muchos laboratorios cuentan ya con estas pruebas, sin embargo la sensibilidad o especificidad de las mismas es limitada, pues llegan a presentar reacción cruzada con otras especies bacterianas que tienen determinantes antigénicos similares y como consecuencia de esto, es muy común la presencia de reacciones falsas positivas, además de que se requiere tener un aislamiento en cultivo puro, previo al uso de dichas técnicas.

De ahí la necesidad de idear o buscar técnicas más sensibles y específicas, que puedan ser realizadas en un menor tiempo y costo para la detección de bacterias patógenas.

En los últimos años dentro del campo de la Biología Molecular se han desarrollado una serie de técnicas que han sido aplicadas en la Microbiología clínica, principalmente aquellas técnicas moleculares que ponen de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos para la detección de microorganismos patógenos. Se ha demostrado que es posible encontrar *Salmonella* en alimentos y muestras clínicas utilizando técnicas de hibridación con sondas de DNA específicas para dicha bacteria, pero se ha visto que para esta prueba se requiere de una muestra rica en DNA, ejemplo

de ello ha sido una sonda específica de DNA para el antígeno Vi de *S. typhi* utilizada para detectar esta última en sangre de pacientes con fiebre tifoidea, observándose que la sonda no detecta concentraciones menores de 500 bacterias, (33, 34, 35).

La amplificación de DNA por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) primeramente descrita por Mullis et al. 1986 y Saiki et al. 1988 (36, 37), es una técnica que poco a poco se está convirtiendo en el método de elección para la detección molecular de diferentes microorganismos patógenos (38). Es un proceso por el cual una secuencia específica de DNA se puede seleccionar y amplificar "in vitro", obteniéndose múltiples copias a partir de la original. Este principio está basado en la síntesis de DNA por medio de una polimerasa la cual requiere de un fragmento de DNA monocatenario que funciona como molde sobre el cual se colocan los nuevos desoxinucleótidos. Así mismo necesita de un DNA iniciador (cebador) en uno de los extremos del molde, sirviendo como punto de iniciación de la síntesis. Si se desea amplificar una secuencia concreta, es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de ambos extremos. Por lo tanto se puede sintetizar dos pequeñas piezas de DNA monocatenario (oligonucleótidos) que son complementarios a cada uno de los extremos del fragmento molde. Estos oligonucleótidos se preparan en parejas de tal forma que cada uno hibride con la cadena del molde opuesta a la que hibrida el otro y además en el extremo contrario (tomando en cuenta que el DNA molde es bicatenario al principio de la reacción) sirviendo como cebadores para la síntesis de una cadena complementaria a la correspondiente del molde. Dicha síntesis consiste en la extensión de los iniciadores (cebadores) dándose en ambas direcciones, desde un cebador a otro.

La técnica de PCR se ha aplicado para la identificación o confirmación de microorganismos aislados a partir de muestras clínicas, agua y alimentos, su sensibilidad, especificidad y rapidez resultan muy atractivas para el uso clínico (39, 40). Diversos experimentos han puesto de manifiesto la presencia de genes específicos en cepas puras de *Salmonella* y otras bacterias asociadas, tales como: múltiples PCR (41); detección de genes plasmídicos asociados a virulencia presentes en varios serotipos de *Salmonella* (42); cebadores seleccionados arbitrariamente de una secuencias de nucleótidos para determinar polimorfismo en *S. enteritidis* (43). Estos métodos han demostrado que es posible detectar desde 4-10 células, lo cual sería de gran utilidad para aplicarlo en la detección de *Salmonella* directamente en muestras de alimentos (carnes, leche, embutidos, huevos, etc.) y heces, ya que muchas veces éstos presentan bajos niveles de contaminación de la bacteria, que por métodos de cultivo no puede detectarse. El uso de PCR puede ser una herramienta valiosa para el monitoreo de alimentos contaminados así como de infecciones causadas por *Salmonella*, pudiendo llegar a sustituir a los

medios de cultivo convencionales, principalmente por ser una prueba rápida y segura permitiría un mayor control para reducir las probabilidades de contaminación de alimentos, ya que con base a lo establecido por la FDA, los productos alimenticios deben estar libres de microorganismos viables de *Salmonella* (44) y por otro lado aumentaría el control de infecciones en una población determinada, o bien detectar infecciones tempranas evitando su transmisión antes de que el potencial de infección para otros individuos sea mayor, impidiendo así la presencia de brotes.

Las Secuencias de Inserción (IS-200) primeramente descritas por Lam & Roth (45), se han encontrado en múltiples copias, al parecer no contienen palíndromos, no generan duplicación de secuencias de DNA hospedero, carecen de mutantes de inserción y con una alta estabilidad en el cromosoma de muchas especies de *Salmonella*, con excepción de ciertas especies de *S. agona* y en otros miembros de la familia de las Enterobacterias. Ensayos recientes de hibridización han confirmado la detección de IS-200 en cepas de *Salmonella* incluyendo *S. agona* que presentó por lo menos una copia de IS-200 (46, 47). Esta observación hace que IS-200 sea un blanco apropiado para la detección de *Salmonella* por medio de la PCR, aunque parece ser que algunas cepas de *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* y *Sh. dysenteriae* presentan una o más copias similares a IS-200 (48 y 49), lo cual puede dar lugar a una reacción cruzada entre los iniciadores (oligonucleótidos) y secuencias de DNA similares a IS-200 de dichas bacterias.

Aunque la metodología de la PCR está demostrando ser una herramienta de gran potencial para el diagnóstico clínico, aún no es ampliamente utilizado por razones tales como: alto costo de equipo y material, falta de capacitación de personal para el desarrollo de las técnicas, así como el carecer de la automatización de algunos procedimientos antes y después de la PCR, que muchas veces limita el análisis de un número grande de muestras. Por ejemplo, para saber si una secuencia de DNA blanco ha sido amplificada, se utilizan técnicas de hibridización con sondas (50), electroforesis por capilaridad (51) o electroforesis en geles (52), siendo esta última la más común por ser relativamente sencilla y útil pero que difícilmente puede ser automatizada. Es por ello que se buscan otras opciones que permitan que las técnicas de PCR sean más rápidas y eficientes. Higuchi et al. (53) han demostrado que adicionando bromuro de etidio en la mezcla reactiva de PCR, no interfiere en la amplificación del DNA blanco y que la fluorescencia de dicho cromógeno incrementa en proporción directa a la presencia de cadenas dobles de DNA, por lo tanto un incremento de la fluorescencia en la PCR es indicativo de una amplificación de DNA blanco, lo cual puede facilitar la automatización para la detección de productos amplificados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha reportado la identificación y/o confirmación de *Salmonella* por PCR a partir de cultivo puro de bacterias aisladas de diferentes tipos de muestras, pero poco se ha ensayado respecto a la detección de *Salmonella* directamente sobre muestras de alimentos y heces con alta sensibilidad y especificidad, para ello se requiere de: una técnica eficiente de extracción de DNA con alto rendimiento, pureza e integridad del mismo y de el uso de iniciadores (oligonucleótidos) altamente específicos del género *Salmonella* que no presenten reacción cruzada con otras Enterobacterias. Siendo que IS-200 son únicas y ubicuas para *Salmonella* pueden servir como blanco para la detección de ésta en muestras de alimentos y de heces. Se propone el uso de nuevos iniciadores que amplifiquen IS-200 específicos para *Salmonella* que no presenten reacción cruzada con otras Enterobacterias. Por otro lado, resulta ser tedioso y tardado la detección de productos amplificados por electroforesis, por lo tanto, se sugiere el mismo ensayo de PCR específico para *Salmonella* con la adición de bomuro de etidio, midiendo el grado de fluorescencia de los productos de amplificación, permitiendo así una posible automatización de la prueba.

El principal objetivo de este estudio, es el desarrollar la PCR como un ensayo sencillo y confiable para la detección de *Salmonella*, siendo una posible alternativa en el diagnóstico de laboratorio para un mejor control de alimentos contaminados y de enfermedades diarreicas causadas por dicha bacteria.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

I.-Comparar la validez, confiabilidad y reproducibilidad de la técnica de PCR con los métodos tradicionales de cultivo, para la identificación de *Salmonella sp.* en muestras de alimentos y muestras fecales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

II.-Evaluar diferentes métodos de extracción de DNA genómico de bacterias, directamente en muestras de alimentos y muestras fecales.

III.-Automatizar la detección de productos de PCR - Secuencias de Inserción (IS-200) únicas para *Salmonella* en muestras de alimentos y muestras fecales.

HIPOTESIS.

I.-La técnica de PCR tiene mayor validez, confiabilidad y reproducibilidad que los métodos de cultivo tradicionales para la detección de *Salmonella* en muestras de alimentos y muestras fecales.

II.-El uso de Tiocianato de Guanidinio y partículas de Silice es altamente eficiente para la extracción de DNA bacteriano en muestras de alimentos y muestras fecales.

III. La adición de bromuro de etidio a la mezcla de reacción de la PCR, permite la detección de productos amplificados en función de el grado de fluorescencia, facilitando así su automatización.

MATERIAL Y METODOS.

ORIGEN DE LAS MUESTRAS.

Con base al convenio establecido entre Biological Science Department (Microbiology Laboratory) California Polytechnic State University USA y el Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla/Instituto Mundi Test, Palma de Mallorca, España en 1989, para el desarrollo de proyectos de investigación en el área de Microbiología, se estudiaron 152 muestras de alimentos obtenidas de la cocina de restaurantes, empacadoras de carne y supermercados, recolectadas por el Instituto Mundi Test-Palma de Mallorca y 90 muestras fecales de pacientes con diarrea (tanto niños como adultos) que fueron admitidos en el Hospital de Sor Dureta Sevilla España durante 1993. Todas las muestras fueron amablemente donadas por el Dr. J. Gil., Mundi Test Inc., España.

Cultivos Bacterianos.

Un total de 26 cepas de *Salmonella* de 13 serotipos diferentes y 24 cepas de bacterias heterólogas, fueron obtenidas del cepario de el Departamento de Microbiología-Hospital Dureta y del Departamento de Microbiología-Ciencias Biológicas de California Polytechnic State University. Estos organismos se incubaron para su crecimiento en caldo de Soya Tripticaseína (BBL, Cockeysville, MD) 18-24h a 37°C con agitación. Los cultivos fueron ajustados nefelométricamente a una concentración de 1×10^8 UFC/ml para posteriormente extraer DNA genómico por los métodos descritos más adelante (Tabla 1).

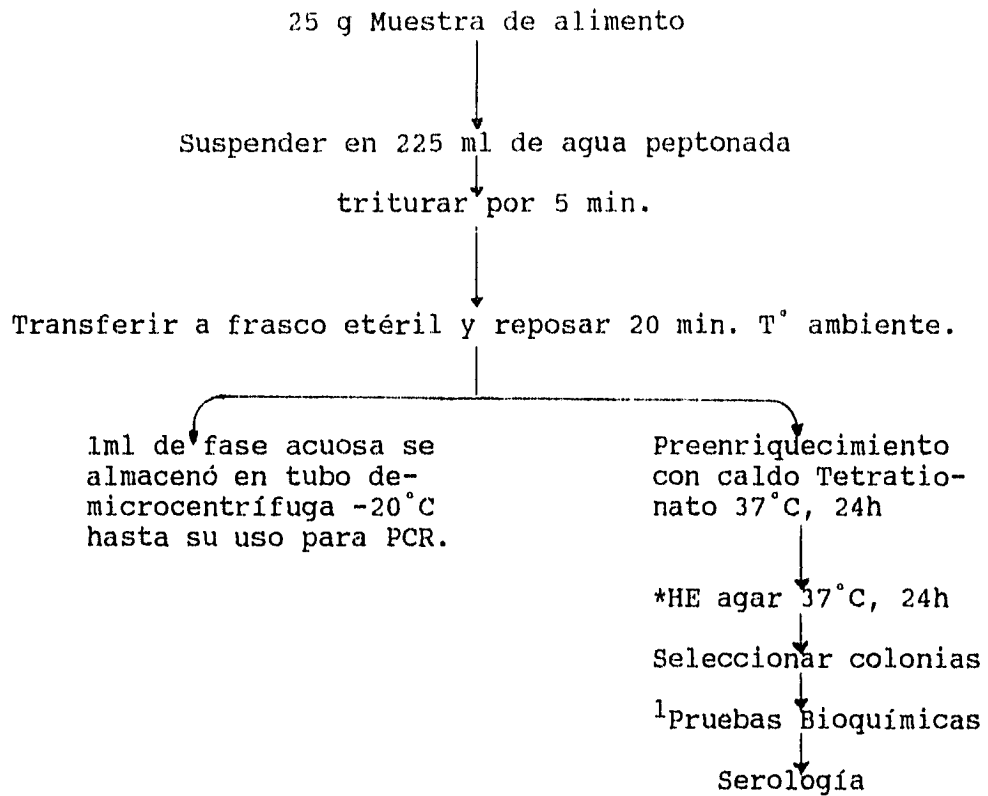
Aislamiento Bacteriano.

De las muestras de alimentos (carnes crudas, embutidos, aderezos, huevos, verduras frescas), se tomó 25g de muestra suspendiéndose en 225ml de agua peptonada según Edel (54), homogeneizando a 21,500 rev./min por 60 segundos en una licuadora comercial (Waring, New. Hartford, CT) y transferida a una bolsa Stomacher 400 (Tecmar, Cincinnati, OH) por cinco minutos, el contenido de esta bolsa se puso en un frasco estéril y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de los sólidos. Un mililitro de la fase acuosa se depositó en tubo de microcentrifuga de 2ml y almacenado a -20°C hasta su uso para la PCR. El resto de la muestra fue preenriquecida para el cultivo de *Salmonella* en caldo Tetracionato, toda la noche a 37°C y posteriormente cultivadas en placas de Hecktoen Enteric (Difco) de 18-24h a 37°C. Se seleccionaron las colonias sospechosas azul verdosas con o sin centro negro y se caracterizaron mediante una serie estándar de pruebas bioquímicas: fermentación de lactosa y sacarosa (-); gas a partir de glucosa (+); H₂S (+); Indol (-); Motilidad

(+); Lisina (+); Ornitina (+), posteriormente fueron clasificadas por serotipos, dicha clasificación fue realizada por el equipo técnico de el Laboratorio de Micribiología Ciencias Biológicas California Polytechnic State University (Diagrama I) (27).

Para muestras fecales, se tomó aproximadamente 2g de la misma y fue homogeneizada en 10ml de medio de transporte Enterico-Fekal TM (Meridian Diagnostics, Inc. Cincinnati OH) una porción de 2ml de muestra se transfirió en tubos de microcentrifuga estériles y se guardaron a -20°C hasta su uso para PCR. Y otra porción de la muestra fue procesada para el aislamiento de *Salmonella* y otras enterobacterias, las muestras se sembraron en medio de MacConkey, Campy Bap y Caldo Tetracionato incubándose a 37°C, 18-24h de este último se sembró en agar Hecktoen Enteric. Las colonias sospechosas azul verdosas para *Salmonella* fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas y por serología (antes mencionadas) (27,28) (Diagrama II). Con base a los resultados, las muestras fueron positivas (+) cuando se aisló *Salmonella* y negativas (-) cuando no se aisló.

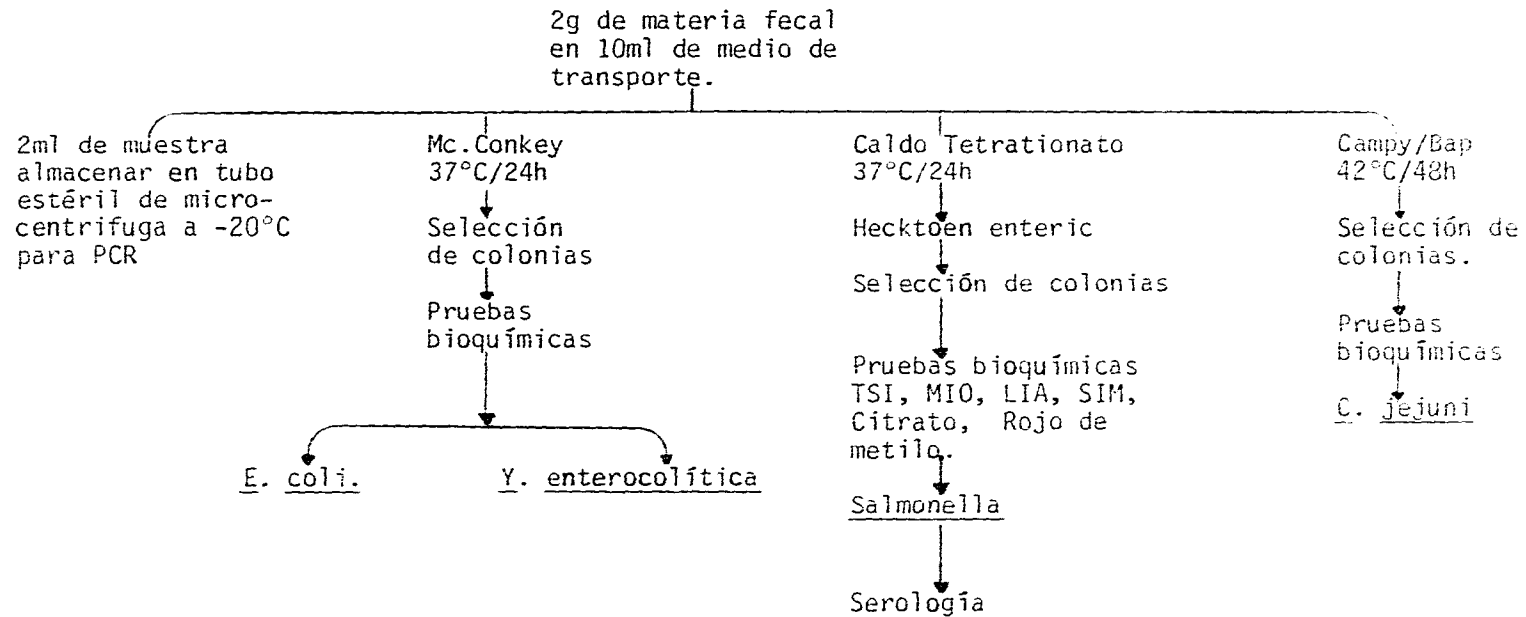
DIAGRAMA I



*Hecktoen Enteric.

¹ TSI, LIA, MIO, H2S.

DIAGRAMA II



Tomado de Edwards & Ewing (1986). (27)

Extracción de DNA genómico.

Extracción de DNA genómico de cultivos bacterianos. Cepas puras de *Salmonella* y otras Enterobacterias fueron cultivadas en caldo de Soya Trypticaseína (TSB) 18-24h a 37°C. El DNA genómico de dichas bacterias fue aislado como se describe (55) brevemente: el cultivo bacteriano se centrifugó (14,000 x g) por 3 minutos o hasta obtener un paquete compacto de la bacteria eliminándose el sobrenadante. El paquete fue resuspendido en 567 µl de regulador TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 8.0). El aislamiento y purificación de DNA fue por lisis celular con la adición de 30 µl de dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS) y 20mg/ml de proteinasa K, incubando una hora a 37°C. Después se adicionaron 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de hexadecyltrimethyl amonio/NaCl al 10% (CTAB) y incubando 10 minutos a 65°C. Se agregó un volumen igual (0.7 a 0.8 ml) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La muestra fue centrifugada 5 minutos y se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA a otro tubo de microcentrifuga estéril. Posteriormente se adicionó un volumen igual (0.7-0.8 ml) de fenol-cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 350 µl de isopropanol, para precipitar los ácidos nucleicos. El sobrenadante fue eliminado y al precipitado obtenido se le adicionó 300 µl de alcohol etílico al 70%, para lavar el DNA, se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue removido y el paquete fue secado en un leofilizador para posteriormente resuspenderlo en 100 µl de regulador TE. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260nm, ajustando a una concentración stock de 1 µg/ml y almacenadas a -20°C hasta su uso. Para estas mismas muestras también se obtuvo DNA genómico por la técnica de Boom (56) modificada descrita más adelante.

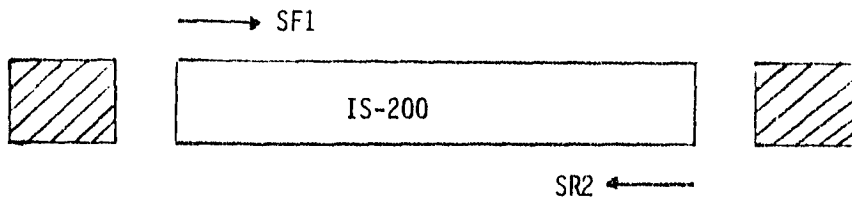
Extracción de DNA genómico en muestras de alimentos y heces. Diferentes técnicas fueron utilizadas para optimizar la extracción de DNA directamente de muestras de alimentos y heces. Veinte muestras cuyo cultivo fue negativo tanto de alimentos como de heces fueron utilizadas en un estudio piloto para evaluar los diferentes procedimientos de extracción de DNA. Diez muestras de alimentos (carnes, embutidos, ensaladas) y 10 muestras de heces se usaron como controles negativos y las otras diez de cada tipo fueron inoculadas experimentalmente con una cepa control de *Salmonella* a una concentración de 1×10^8 UFC. a) En el primer método aproximadamente 250-300 µl de muestra fue hervida en baño de agua de 10 a 15 minutos con el objeto de lisar las bacterias e inactivar otros microorganismos patógenos, posteriormente fue filtrada con una malla de papel filtro, recuperando el filtrado y guardándolo a -20°C

hasta su uso (57). b) En el segundo método se empleó proteinasa K y fenol/cloroformo de acuerdo al procedimiento previamente descrito. c) Un tercer método fue agregando 25 μ l de Triton 10% (Octyl Phenoxy Polyethoxyethanol) a 250 μ l de muestra homogeneizada, se hirvió en baño de agua durante 10 minutos, posteriormente se adicionaron 200 μ l de sílice SiO_2 (glass milk) al 5% en regulador TE incubándose en agitación por 30 minutos a 55°C, la mezcla se transfirió a microtubos de 2ml con filtro y se centrifugó por 1 minuto, la fase líquida fue eliminada y la matriz de sílice que contiene el DNA fue lavada dos veces con 350 μ l de solución de lavado (alcohol etílico al 70% a 4°C), centrifugando por un minuto. Finalmente la sílice fue resuspendida en 50 μ l de regulador estéril TE y se centrifugó 40 segundos a máxima velocidad, guardándose la fase líquida a -20°C. d) El cuarto método que se utilizó fue "Geneclean II" (BIO 101 Inc.): 0.8 ml de yoduro de sodio y 5 μ l de matriz de sílice, adicionados directamente a 250-300 μ l de muestra, la mezcla se incubó a 4°C por 10 minutos agitando periódicamente, después se hicieron lavados y eluciones de DNA según la técnica de manufactura (BIO 101 Inc. P.O. Box 2284, La Jolla, CA 92038 U.S.A.). e) El quinto método fue el descrito por Boom (56) aplicándolo por primera vez directamente sobre muestras de alimentos y heces con las siguientes modificaciones: 300 μ l ó 100 mg de muestra fueron resuspendidos en 600 μ l de PBS (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 0.24g KH_2PO_4 , para un litro, pH final 7.4) y se centrifugó a baja velocidad (2000 x g) por dos minutos. Se recuperó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a máxima velocidad (14,000 x g) por cinco minutos, al sedimento formado se le adicionaron de 600 a 800 μ l de buffer de extracción GuSCN (Tiocianato de guanidinio 4.5 M; Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; EDTA 0.02 M; Triton X-100 5%) más 100 μ l de NaCl 5 M y 80 μ l de CTAB incubando con agitación a 65°C por 10 minutos. Se agregó 30 μ l de partículas de sílice (SiO_2 , Sigma Chemical #5563) agitando de 10-15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de sílice fue centrifugada a 14,000 x g, descargando el sobrenadante. Las partículas de sílice fueron lavadas dos veces con buffer de lavado GuSCN (Tiocianato de Guanidinio 4.5M; Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), dos veces con etanol al 70% y una vez con acetona, posteriormente se secaron a 56°C por cinco minutos para después ser eluidas en 50 μ l de regulador TE e incubando a 56°C por 10 minutos y centrifugando de 30-50 segundos. Finalmente se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA (evitando resuspender las partículas de sílice) a un microtubo estéril de 0.5 ml y se conservó a menos 20°C hasta su uso. Después de realizadas cada una de las diferentes técnicas de extracción, se tomaron 5 μ l de cada una de las muestras para observar la presencia de DNA por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, mismas que fueron usadas para PCR.

Oligonucleótidos y Blanco Genómico

El blanco genómico que se detectó y amplificó fueron Secuencias de Inserción 200 (IS-200), que están presentes en múltiples copias en el DNA de muchas *Salmonellas* y ausentes en otras Enterobacterias.

Se usaron nuevos iniciadores SF1 de 26 nucleótidos que corresponden a la región 5' terminal de IS-200 y SR2 de 23 nucleótidos, amplificando una secuencia de aproximadamente 206 pares de bases. La secuencia de los oligonucleótidos de 5' a 3' fue la siguiente: SF1 5' GCT CAC CCA TTT TAT CCT CTT CAA GC y SR2 5' GCC GAA GAT GAG TGT GTC GAG TT. Secuencias de DNA de diferentes especies de *Salmonella* fueron alineadas para determinar la región apropiada a través de un Banco de Datos (Gene-Bank. EMBL) Mac. Vector 3.5 disponible en el laboratorio y posteriormente construidos en un sintetizador de DNA por DNA International Inc., purificados en columna de Sephadex G-50 y cuantificados por espectrofotometría.



Mapa de los cebadores usados en la PCR.
Las secuencias blanco corresponden a
Secuencias de Inserción (IS-200)
específicas para *Salmonella*.

Optimización del PCR específico para *Salmonella*.

Para la amplificación enzimática de DNA se utilizaron los reactivos del Kit PCR Gene Amp. (Perkin Elmer Cetus, Norwalk Conn) en microtubos de 0.25 ml. Se hicieron ensayos preliminares probando diferentes temperaturas de unión y extensión, tiempos, concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla reactiva y diferentes concentraciones de DNA homólogo y heterólogo. Se observó que

para un volumen de 50µl de reacción, a una concentración final, menor de: 2mM de MgCl₂; 0.3µM de iniciadores SF1/SR2 o 0.02U de polimerasa Taq la PCR se inhibía, al igual que usando concentraciones mayores de 50ng/µl de DNA blanco. Mientras que a una concentración de 2 mM de MgCl₂ la PCR fue positiva pero con un número bajo de copias amplificadas, después de varios ensayos, se optimizó la reacción y las concentraciones finales de cada uno de los componentes de la reacción fueron: 5 µl de regulador Tris HCl 1X; 4 µl de desoxinucleótidos cada uno a 200 µM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 5µl de suero de albúmina bovina (BSA) 2 µg; 6µl de MgCl₂ 3 mM; iniciadores 2µl SF1 0.4µM y 2µl SR2 0.4µM; 0.2µl de Taq DNA polimerasa 1U (Perkin Elmer Cetus Norwalk Conn); diferentes concentraciones de DNA fueron adicionadas a la mezcla reactiva; agua desionizada y esterilizada cuanto baste para 50 µl. El PCR fue realizado en un termociclador automático Modelo 9600 Gene Amp. PCR System (Perkin Elmer Cetus Norwalk). Optimizando así la PCR específica para *Salmonella* con el siguiente programa: 1 ciclo por cinco minutos a 80°C y dos minutos a 95°C; 30 ciclos cada uno de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Al final de la reacción se incubó a 72°C por 5 minutos para una completa extensión del producto de PCR, (Diagrama III).

Un ng/µl de DNA cromosomal de cada una de las 26 cepas de *Salmonella* y las 24 cepas heterólogas fueron ensayadas para PCR específico de *Salmonella*. Por otro lado diluciones seriadas de diez, desde 3.4x10⁴ pg/µl hasta 3.4x10⁻⁷ pg/µl de DNA genómico derivado de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum* y *S. panama* fueron usados en la PCR específica de *Salmonella* para determinar la mínima cantidad de DNA que puede ser amplificada por la misma. Posteriormente se practicó la PCR por duplicado con DNA extraído directamente en muestras de alimentos y heces, usando 10 µl de DNA problema y en cada ensayo se utilizó como referencia un control positivo y uno negativo. De igual manera se realizó por duplicado PCR en diluciones seriadas de DNA genómico de *Salmonella* con la adición de bromuro de etidio a la mezcla de reacción a diferentes concentraciones finales (0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0µg/ml) al igual que en cepas control positiva y control negativas, para determinar la concentración a la cual no se ve inhibida la amplificación de IS-200 en presencia de bromuro de etidio y posteriormente ser aplicado en muestras de alimentos y heces.

Detección de la amplificación de IS-200 por PCR.

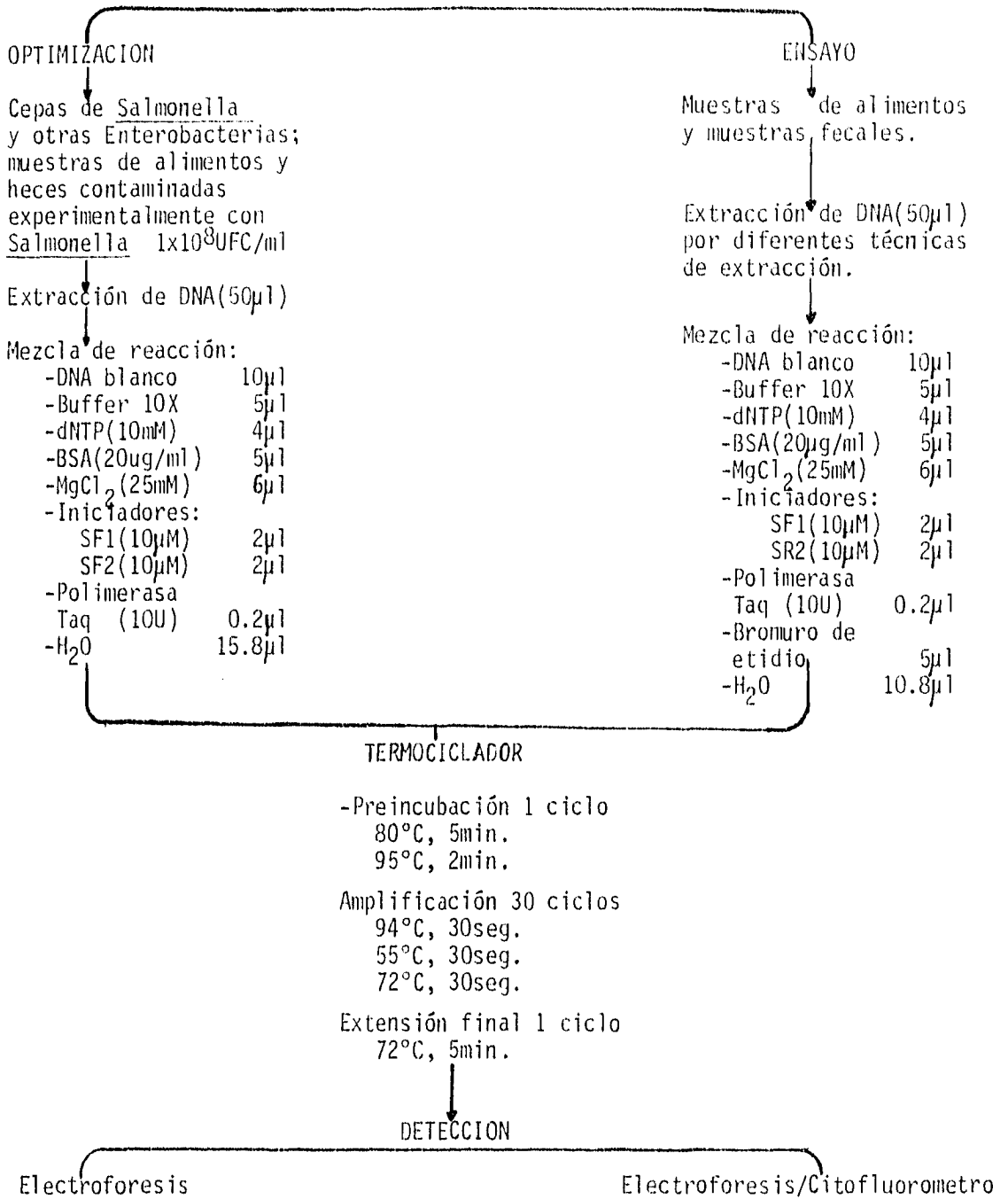
Electroforesis en geles de agarosa fue utilizada para detectar los productos de PCR. Un volumen de 5 μ l de producto de PCR y 1 μ l de regulador de corrimiento (azul de bromofenol, glicerol al 50% y 0.2M EDTA pH 8.0) se uso para electroforesis en gel de agarosa al 2% (Agarose 162-0125 BIO-RAD Richmond) y usando como solución regulador TBE (0.045 M Tris Borato, 0.001 M EDTA pH 8.0) a 80 V durante 30 minutos, después se hizo la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml y se expuso a la luz ultravioleta para determinar la presencia y el tamaño del producto de DNA amplificado. Y para confirmar, se seleccionaron al azar algunos productos de IS-200 amplificados, para ser secuenciados según técnica de AmpliCycle (Sequencing Kit-N808-00175. PERKIN ELMER) y comparar con la literatura (45).

Para los ensayos de PCR con bromuro de etidio en la mezcla reactiva; los productos fueron detectados por electroforesis y por fluorescencia, para esta última, se transfirieron los productos de la PCR a microplacas de 96 pozos (CovaLink NH plates) y colocándose en el CitofluorometroTM (2300 Fluorescence Measurement System-Millipore, Bedford, MA) este aparato utiliza una fibra óptica, altamente sensible, cuyo sistema mide de manera individual y en corto tiempo la fluorescencia a través del fondo de cada pozo con un filtro de excitación y emisión de 485/645nm óptimo para DNA con bromuro de etidio en solución. Dichas mediciones de fluorescencia se denominaron como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF), y se determinó experimentalmente con diluciones seriadas de un control positivo de *Salmonella* y uno negativo de *E. coli* el valor mínimo de fluorescencia cuyo producto amplificado por PCR fuera visible por electroforesis. Posteriormente fueron igualmente valoradas por duplicado las muestras de alimentos y heces.

DIAGRAMA

III

PCR



Análisis de Resultados:

Con base a los resultados obtenidos se determinó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la PCR específico para *Salmonella*, se uso como estándar de oro el cultivo.

Mediante un análisis de χ^2 con corrección de Yates se determinó la asociación entre los métodos de detección por cultivo y por PCR para *Salmonella* en muestras de alimentos y heces (58, 59).

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar cual de las técnicas utilizadas en la extracción de DNA es más eficiente (58).

Para evaluar diferencias en el grado de fluorescencia entre una reacción positiva de PCR específico para *Salmonella* y una reacción negativa de PCR se aplicó la prueba de T de Student (58).

RESULTADOS.

Aislamiento, identificación y serología.

De las 152 muestras de alimentos, en 27 de ellas se aisló e identificó *Salmonella* predominando los serotipos *S. dublin* 85%, *S. enteritidis* 11% y *S. heidelberg* 4% y 125 muestras fueron negativas en cultivo para dicho género. De 92 muestras fecales 50 fueron cultivo positivo para *Salmonella* serotipo *S. enteritidis* y en 2 de estas también se aisló *C. jejuni* y en 1 *Y. enterocolitica*, mientras que 20 muestras fueron cultivo negativo para *Salmonella* pero positivo para *C. jejuni* y 22 más fueron flora normal.

Iniciadores SF1/SR2 específicos para IS-200.

Se determinó si los iniciadores eran específicos para la detección de *Salmonella* por PCR, se encontró que para cada una de las diferentes especies de *Salmonella* ensayadas, se amplificó IS-200, secuencias de aproximadamente 206 pb, mientras que para los otros géneros de Enterobacterias la PCR resultó ser negativa (tabla 1, figura 1), determinando para este ensayo un 100% de confiabilidad y confirmado por secuenciación de nucleótidos.

Se cuantificó la mínima cantidad de producto (IS-200) amplificado por PCR específico para *Salmonella* con DNA de 4 cepas tipo: *S. typhimurium*, *S. anatum*, *S. panama* y *S. enteritidis* utilizando diluciones seriadas de diez (3.4×10^4 pg/ μ l a 3.4×10^{-7} pg/ μ l) igual para *E. coli*. Se observó que para *S. typhimurium* y *S. anatum* la mínima cantidad de DNA amplificado para IS-200 fue de 3.4×10^{-1} pg/ μ l y para *S. panama* y *S. enteritidis* fue de 3.4×10^{-2} pg/ μ l equivalente a 60 y 6 moléculas de DNA respectivamente, considerando que 3.3×10^9 g de DNA es igual a 6.1×10^{23} moléculas (figura 2).

Eficiencia de las diferentes técnicas de extracción de DNA.

Para la extracción de DNA genómico en cepas puras de *Salmonella* y cepas heterólogas se utilizaron 2 técnicas: Proteinasa K/fenol-cloroformo, con un rendimiento promedio de 6.0×10^{-4} g/ml de DNA y con GuSCN/SiO₂ se obtuvo un rendimiento promedio de 1×10^{-3} g/ml de DNA (tabla 1, figura 1). Ambos métodos resultan ser eficientes para la obtención de material genético a partir de cepas puras, pero con un rendimiento mayor (casi del doble) cuando se utilizó GuSCN/SiO₂.

En las cinco técnicas probadas para la extracción de DNA genómico directamente en muestras de alimentos y heces contaminadas y no contaminadas experimentalmente con *Salmonella*, se observó cualitativamente en geles de agarosa los siguientes resultados: 1) por ebullición/filtración la presencia de DNA fue en 1 (5%) de 20 muestras de alimentos y 4 (20%) de 20 muestras fecales; 2) usando Proteinasa K/fenol-cloroformo 5 (25%) de 20 para alimentos y 8 (40%) de 20 para heces; 3) con Triton 10%-Silice 3 (15%) de 20 muestras de alimentos y 5 (25%) de 20 en heces; 4) con NaI-Silice 5 (25%) de 20 en alimentos y 6 (30%) de 20 en heces; 5) por último con GuSCN-SiO₂ 20 (100%) de 20 tanto de alimentos como de heces. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$ entre la técnica de Boom modificada y las anteriores (figura 3A, 3B, 3C). Una vez ensayadas cada una de las diferentes técnicas de extracción, se realizó PCR específico para *Salmonella* con los iniciadores SF1/SR2, en las muestras piloto inoculadas experimentalmente con *Salmonella* dando los siguientes resultados: extracción por ebullición/filtración, la PCR fue positivo para 1 (10%) de 10 en alimentos y 2 (20%) de 10 en heces; extracción con Proteinasa K/fenol-cloroformo PCR positivo en 3 (30%) de 10 en alimentos y 1 (10%) de 10 en heces; con Triton 10%-Silice PCR positivo en 3 (30%) de 10 en alimentos y 1 (10%) de 10 en heces; con NaI-Silice PCR positivo en 4 (40%) de 10 en alimentos y 3 (30%) de 10 en heces y con GuSCN-SiO₂ la PCR fue positiva para 8 (80%) de 10 y 9 (90%) de 10 en heces siendo esta última la técnica elegida para la extracción de DNA en las muestras a estudiar. Mientras que las muestras de alimentos y heces negativas en cultivo para *Salmonella*, fueron también negativas por PCR (figura 3D), lo cual confirma que la PCR es específica para detectar *Salmonella*.

Detección de *Salmonella* por cultivo y PCR en muestras de alimentos y muestras fecales.

De las 152 muestras de alimentos 24 fueron positivas para *Salmonella* tanto en cultivo como en PCR (15.78%); 123 fueron negativas por los dos métodos de diagnóstico (80.92%); 2 fueron cultivo negativo y PCR positivo (1.31%); 3 cultivo positivo y PCR negativo (1.97%), presentándose de manera indistinta estos resultados para cualquier serotipo. Por otro lado 92 muestras fecales de pacientes con diarrea, 46 (51%) fueron *Salmonella* positivos por cultivo y PCR, siendo que dos de ellas fueron también cultivo positivo para *C. jejuni* y 1 para *Y. enterocolitica*; 42 (42.66%) cultivo negativo y PCR negativo para *Salmonella*; mientras que 4 muestras (4.4%) fueron cultivo positivo y PCR negativo (tabla 4, figura 4).

Considerando al cultivo como la prueba estándar de oro para la detección de *Salmonella* se encontró que para muestras de alimentos la PCR tuvo una sensibilidad del 88% y una especificidad del 98% con un valor predictivo (+) de 92% y un valor predictivo (-) del 97%. Y para muestras fecales la sensibilidad fue del 92% con una especificidad del 100%, valor predictivo (+) del 100% y valor predictivo (-) del 91%. Se analizó si existía una asociación entre ambas pruebas de diagnóstico calculando el coeficiente de contingencia con un valor de 0.66 y 0.67 para muestras de alimentos y muestras fecales respectivamente.

Automatización para la detección de productos de PCR específico para Salmonella.

Como un estudio preliminar para futuras optimizaciones, se practicó en las mismas muestras PCR específico para IS-200 de *Salmonella* adicionando al tubo de reacción 5 μ l de bromuro de etidio, encontrándose que a una concentración de 0.5 μ g/ml no hay inhibición de la PCR, detectando los productos del mismo tanto por electroforesis en geles de agarosa como en el Citofluorometro, para el control positivo de *Salmonella* se usaron diluciones seriadas de diez, tomando como valor límite de positividad la última dilución de DNA molde que fue amplificada por PCR y detectada por electroforesis, obteniendo un valor de aproximadamente 800 UAF, menor a este valor hubo ausencia de bandas visibles en geles de agarosa, considerándolas negativas. De igual forma usando como control negativo a *E. coli* la PCR resultó ser negativa para todas las diluciones y cuya fluorescencia fue menor a 800 UAF (tabla 5, figura 5A). Además se ensayo la reproducibilidad de la PCR con 0.1ng/ μ l de DNA blanco tanto de *Salmonella* como de *E.coli* en presencia de bromuro de etidio (figura 5B). Se estableció que al practicar PCR en las muestras de alimentos y muestras fecales aquellas que presentaran un valor superior a 800 UAF se consideraron PCR positivo confirmando con la presencia o ausencia de productos de PCR en geles de agarosa.

152 muestras de alimentos: de las cuales 26 fueron PCR positivo, presentaron una fluorescencia superior a 800 UAF con una media de alrededor de 1003.33 UAF y una desviación estándar de ± 176 , las otras 126 muestras que fueron PCR negativo los valores fueron menores de 800 UAF con un valor promedio de 637 UAF y una desviación estándar de ± 146.8 , se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los PCR positivos y negativos ($p < 0.001$). Para el caso de las 92 muestras de materia fecal: las 46 con PCR positivo dieron un promedio de 1522 UAF, con una desviación estándar de ± 184.0 , y 46 fueron PCR negativo con una fluorescencia promedio de 1190, superior al valor de corte para muestras negativas y una desviación estándar de ± 109.0 , con una diferencia estadísticamente significativa entre PCR positivo y PCR negativo ($p < 0.001$), (figura 6). Se puede ver que, para la reacción con y sin la presencia de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), el resultado de la PCR fue similar, obteniendo aproximadamente un 17% y un 50% de PCR positivos para *Salmonella sp.* en alimentos y heces respectivamente.

Tabla 1

PCR ESPECIFICO PARA LA DETECCION DE *Salmonella* sp.
UTILIZANDO CEBADORES SF1/SR2 PARA LA AMPLIFICACION DE
SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS-200).

MICROORGANISMO (cepas)	¹ EXTRACCION (fenol/cloroformo) [DNA _{260nm}] µg/ml.	² EXTRACCION (GuSCN/SiO ₂) [DNA _{260nm}] µg/ml.	PCR
<i>S. newport</i> ^a	530	850	+
<i>S. newport</i> ^a	500	1125	+
<i>S. agona</i> ^a	500	1150	+
<i>S. agona</i> ^a	600	1200	+
<i>S. cubana</i> ^b	650	980	+
<i>S. cubana</i> ^b	700	800	+
<i>S. enteritidis</i> ^b	580	1140	+
<i>S. enteritidis</i> ^a	630	995	+
<i>S. heidelberg</i> ^a	500	1230	+
<i>S. heidelberg</i> ^a	600	1000	+
<i>S. panama</i> ^a	430	1110	+
<i>S. panama</i> ^a	410	1380	+
<i>S. paratyphi</i> A ^a	530	850	+
<i>S. paratyphi</i> A ^b	610	825	+
<i>S. typhi</i> ^a	550	900	+
<i>S. typhi</i> ^b	600	1250	+
<i>S. typhimurium</i> ^b	710	830	+
<i>S. typhimurium</i> ^b	611	950	+
<i>S. dublin</i> ^a	620	1105	+
<i>S. dublin</i> ^a	680	1000	+
<i>S. anatum</i> ^b	520	890	+
<i>S. anatum</i> ^b	530	980	+
<i>S. gallinarum</i> ^b	590	1200	+
<i>S. gallinarum</i> ^b	500	1000	+

continuación tabla 1....

Tabla 1 continuación....

PCR ESPECIFICO PARA LA DETECCION DE Salmonella sp.
UTILIZANDO CEBADORES SF1/SR2 PARA LA AMPLIFICACION DE
SECUENCIAS DE INSERCIÓN (IS-200).

MICROORGANISMO (cepas)	¹ EXTRACCION (fenol/cloroformo) [DNA _{260nm}] µg/ml	² EXTRACCION (GuSCN/SiO ₂) [DNA _{260nm}] µg/ml	PCR
<i>Y. enterocolitica</i> ^a	650	800	-
<i>Y. enterocolitica</i> ^b	680	850	-
<i>C. jejuni</i> ^a	500	880	-
<i>C. jejuni</i> ^a	450	1080	-
<i>C. freundii</i> ^b	600	900	-
<i>C. freundii</i> ^b	520	800	-
<i>E. aerogenes</i> ^b	580	920	-
<i>E. aerogenes</i> ^b	500	950	-
<i>E. coli</i> ^b	620	1000	-
<i>E. coli</i> ^b	680	905	-
<i>K. pneumoniae</i> ^b	600	910	-
<i>K. pneumoniae</i> ^b	580	1200	-
<i>M. morgani</i> ^b	600	945	-
<i>M. morgani</i> ^b	400	1025	-
<i>P. vulgaris</i> ^b	630	1010	-
<i>P. vulgaris</i> ^b	710	1200	-
<i>S. marcesens</i> ^b	718	930	-
<i>S. marcesens</i> ^b	700	1200	-
<i>S. boydii</i> ^a	520	1140	-
<i>S. boydii</i> ^a	500	955	-
<i>S. dysenteriae</i> ^b	500	950	-
<i>S. dysenteriae</i> ^b	550	1080	-
<i>S. sonnei</i> ^b	580	1100	-
<i>S. sonnei</i> ^b	600	800	-
H2O desionizada	0	0	-
H2O desionizada	0	0	-

Extracción de ADN a partir de cepas en cultivo de caldo de Soya Trypticaseina (TSB) a una concentración de aproximadamente 10⁷-10⁸ UFC/ml.

¹Extracción con fenol/cloroformo con un rendimiento promedio de 5.7x10⁻⁴g/ml.

²Extracción con GuSCN/SiO₂ con un rendimiento promedio de 1x10⁻³g/ml.

a) Departamento Microbiología, Hospital Sor Dureta Sevilla.

b) Departamento Microbiología, California Polytechnic.

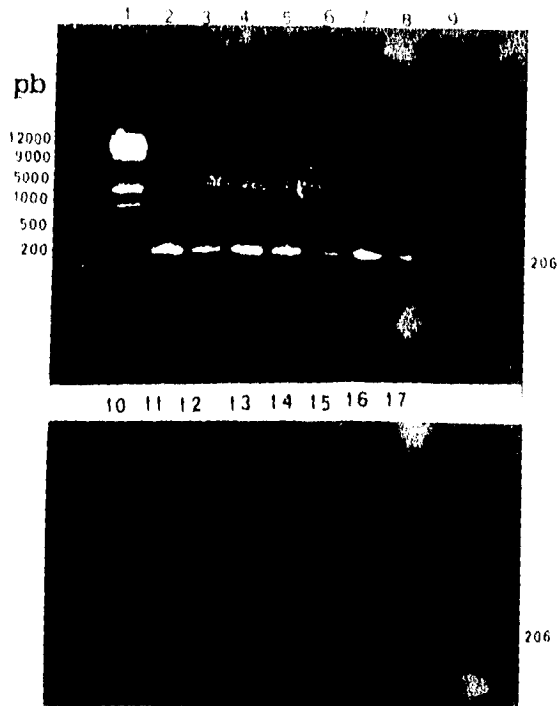


Figura 1

Productos amplificados IS-200 por PCR específico para *Salmonella*, con cepas puras de diferentes serotipos de *Salmonella* y otras Enterobacterias: 5 μ l de producto de PCR se depositaron en los pozos de un gel de agarosa al 2% en 0.5X de Tris-Borato EDTA (TBE), corriéndose a 80 volts por 30 min. a temperatura ambiente.

1.-Marcador de Peso Molecular; 2.-*S. agona*; 3.-*S. newport*; 4.-*S. enteritidis*; 5.-*S. panama*; 6.-*S. typhi*; 7.-*S. anatum*; 8.-*S. dublin*; 9.-*Y. enterocolitica*; 10.-*C. jejuni*; 11.-*C. freundii*; 12.-*E. aerogenes*; 13.-*E. coli*; 14.-*K. pneumoniae*; 15.-*M. morganii*; 16.-*P. vulgaris*; 17.-*S. marcescens*.

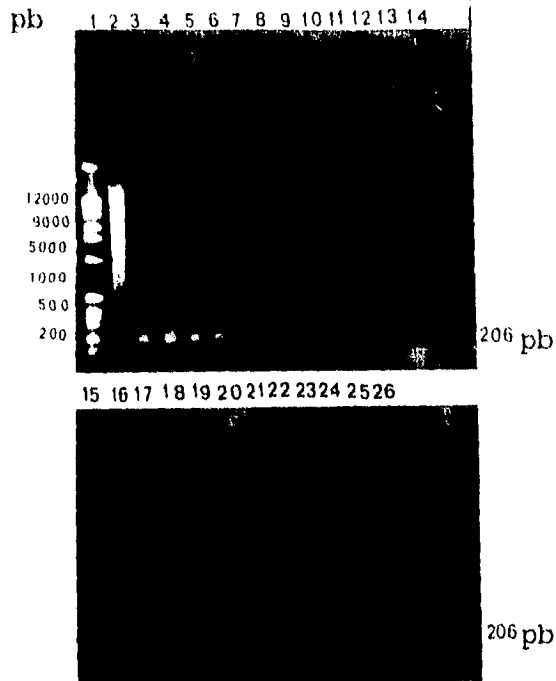


Figura 2.

Niveles de detección para IS-200 empleando diluciones seriadas de DNA que fueron amplificadas para IS-200 por PCR específico para *Salmonella*: Ej. *S. panama* desde 34ng/ μ l hasta 3.4×10^{-4} fg/ μ l. La máxima dilución que se amplificó fue de 34fg/ μ l. Para *E. coli* la PCR fue negativa en todas las diluciones.

1.-Marcador de peso molecular; *Salmonella* (pg/ μ l): 2.-
 3.4×10^4 ; 3.- 3.4×10^3 ; 4.- 3.4×10^2 ; 5.- 3.4×10^1 ; 6.-3.4;
7.- 3.4×10^{-1} ; 8.- 3.4×10^{-2} ; 9.- 3.4×10^{-3} ; 10.- 3.4×10^{-4} ; 11.-
 3.4×10^{-5} ; 12.- 3.4×10^{-6} ; 13.- 3.4×10^{-7} ; 14.-*E. coli* (pg/ μ l)
 3.4×10^4 ; 15.- 3.4×10^3 ; 16.- 3.4×10^2 ; 17.- 3.4×10^1 ; 18.-3.4;
19.- 3.4×10^{-1} ; 20.- 3.4×10^{-2} ; 21.- 3.4×10^{-3} ; 22.- 3.4×10^{-4} ; 23.-
 3.4×10^{-5} ; 24.- 3.4×10^{-6} ; 25.- 3.4×10^{-7} ; 26.-agua desionizada.

3A

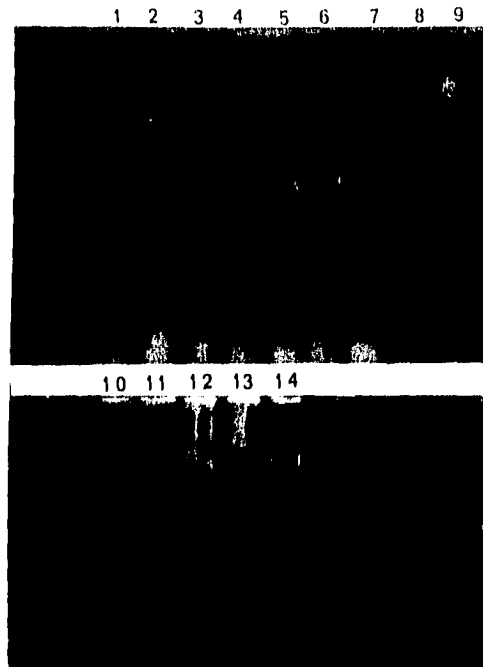
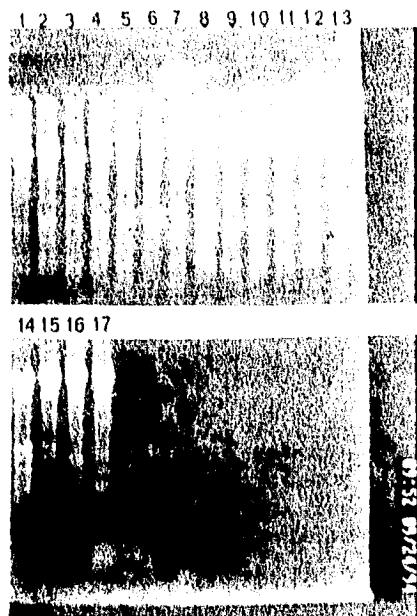
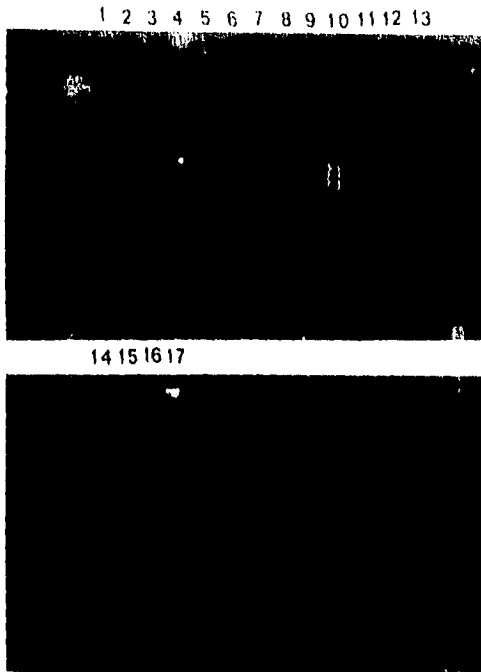


Figura 3A

Extracción de material genómico de cepas puras con la técnica de Boom modificada: 1.-*S. panama*; 2.-*S. agona*; 3.-*S. enteritidis*; 4.-*S. typhi*; 5.-*S. dublin*; 6.-*S. heidelberg*; 7.-*S. anatum*; 8.-*E. coli*; 9.-*Y. enterocolitica*; 10.-*C. jejuni*; 11.-*C. freundii*; 12.-*K. pneumoniae*; 13.-*P. vulgaris*; 14.-*S. sonnei*.

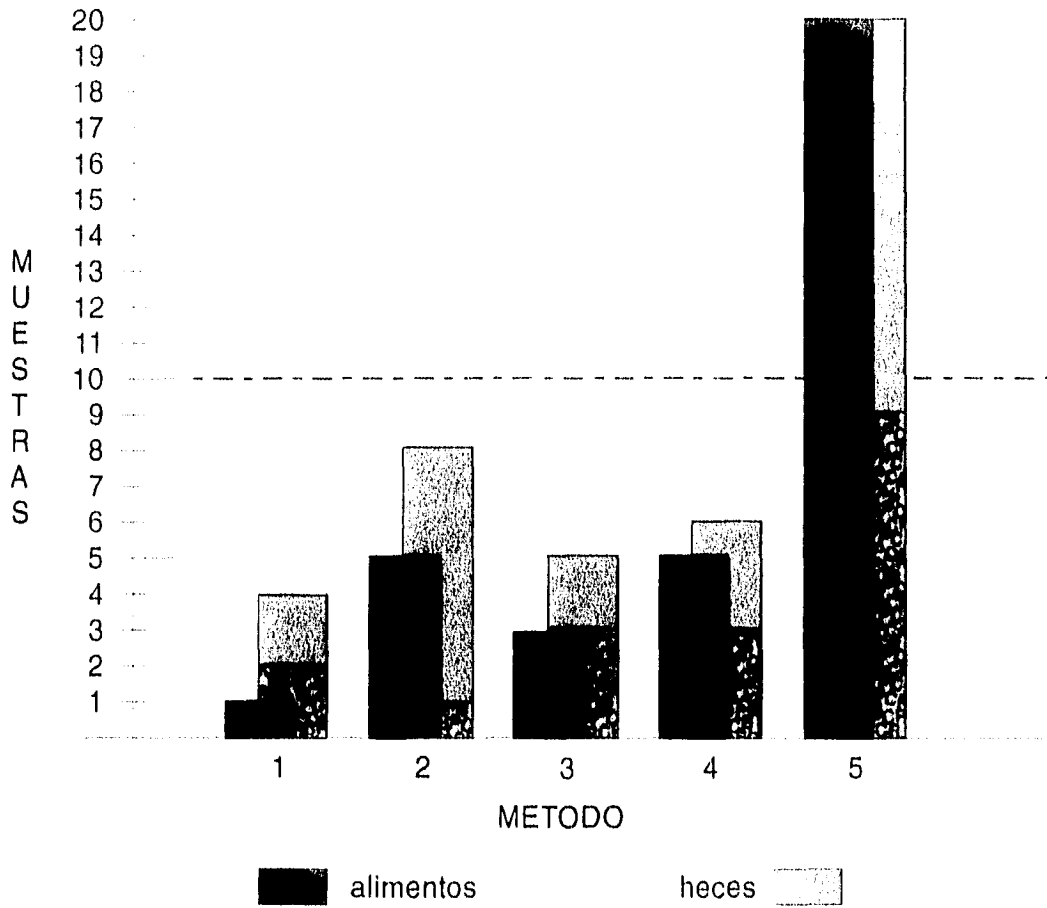


Figuras.

3B.-Extracción de material genómico directamente en muestras de alimentos con la técnica de Boom modificada: 1.-Jamón de puerco; 2.-Salsa roja; 3.-Ensalada de pimientos; 4.-Lomo de cerdo; 5.-Salomillo de cerdo; 6.-Salsa de marisco con crema; 7.-Jamón ahumado; 8.-Aderezo con huevo; 9.-Mortadela; 10.-Chuleta de cerdo; 11.-Chorizo; 12.-Queso de puerco; 13.-Pollo crudo; 14.-Ensalada cruda; 15.-Huevo crudo; 16.-Salami; 17.-Carne cruda.

3C.-Extracción de material genómico directamente en muestras fecales de pacientes con diarrea por la técnica de Boom modificada: 1-17.

Figura 3D
 Métodos de Extracción de Acidos Nucléicos directamente de
 muestras de alimentos y muestras fecales.



- | | |
|----------------------------------|---------|
| 1) Ebullición/filtración | 20 min. |
| 2) Proteinasa K/fenol-cloroformo | 90 min. |
| 3) Triton 10%/silice | 45 min. |
| 4) NaI/silice | 30 min. |
| 5) GuSCN/silice | 45 min. |

Tabla 4

RESULTADOS DEL ENSAYO PCR ESPECIFICO PARA Salmonella EN MUESTRAS DE ALIMENTOS Y MUESTRAS FECALES.

Muestras	C(+) PCR(+)	C(+) PCR(-)	C(-) PCR(+)	C(-) PCR(-)	S	E	VP (+)	VP (-)
Alimentos	24	3	2	123	88%	98%	92%	97%
Total	152							
Heces	46	4	0	42	92%	100%	100%	91%
Total	92							

C:cultivo
 S:sensibilidad
 E:especificidad
 VP(+):Valor predictivo positivo
 VP(-):Valor predictivo negativo

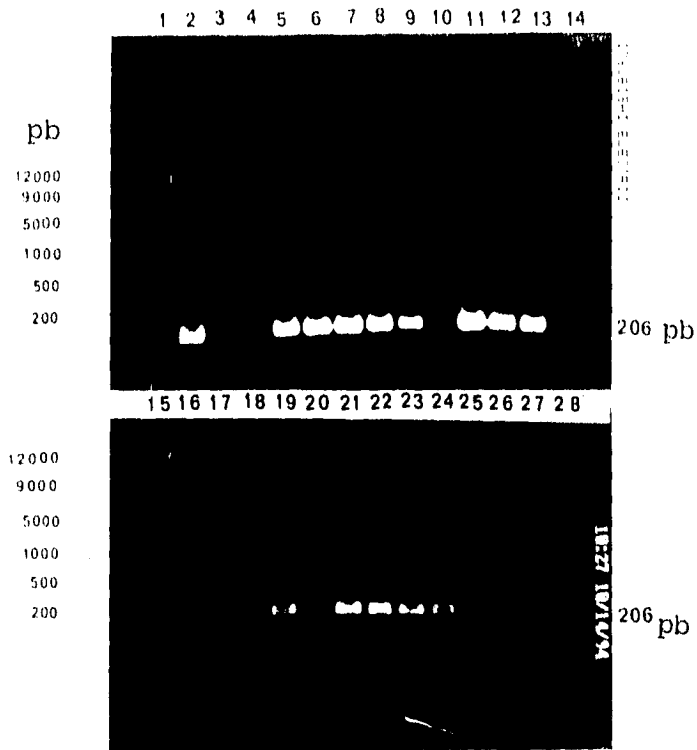


Figura 4

Productos de PCR: amplificación de IS-200 específicas de *Salmonella* de DNA genómico extraído directamente de muestras de alimentos y muestras fecales con la técnica de Boom modificada. 1.-Marcador de peso molecular; 2.-Control positivo de *S. enteritidis* 1ug/ μ l de DNA; 3.-Control negativo de *E. coli* 1ug/ μ l de DNA; Muestras fecales: 4-14, observándose que en la línea 10 no hubo producto amplificado y cuyo cultivo fue positivo para *C. jejuni*, y línea 14 fue PCR (-) y cultivo (-); 15.-Marcador de peso molecular; Muestras de alimentos: 16-18 PCR (-) y cultivo (-); 19-25 PCR (+) y cultivo (+); 26-28 PCR(-) y cultivo (-).

Tabla 5

AUTOMATIZACION PARA LA DETECCION DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR CITOFUOROMETRO.
 PCR ESPECIFICO PARA LA AMPLIFICACION DE IS-200 DE Salmonella EN PRESENCIA DE 0.5µg/ml DE BROMURO DE ETIDIO PARA CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO.

Salmonella enteritidis.

[ADN _{260nm}] pg/µl	PCR*	FLUORESCENCIA
3.4x10 ⁴	+	1711 UAF**
3.4x10 ³	+	1207 "
3.4x10 ²	+	964 "
3.4x10 ¹	+	943 "
3.4	+	900 "
3.4x10 ⁻¹	+	857 "
3.4x10 ⁻²	+	830 "
3.4x10 ⁻³	+/-	800 "
3.4x10 ⁻⁴	-	608 "
3.4x10 ⁻⁵	-	602 "
3.4x10 ⁻⁶	-	600 "
3.4x10 ⁻⁷	-	594 "

E. coli

3.4x10 ⁴	-	790 UAF
3.4x10 ³	-	766 "
3.4x10 ²	-	753 "
3.4x10 ¹	-	744 "
3.4	-	700 "
3.4x10 ⁻¹	-	660 "
3.4x10 ⁻²	-	640 "
3.4x10 ⁻³	-	604 "
3.4x10 ⁻⁴	-	600 "
3.4x10 ⁻⁵	-	598 "
3.4x10 ⁻⁶	-	590 "
3.4x10 ⁻⁷	-	587 "
H ₂ O	-	575 "

**UAF el valor de fluorescencia obtenido se denominó como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

* PCR interpretado como positivo cuando fue visible la banda de aproximadamente 200pb por electroforesis en geles de agarosa.

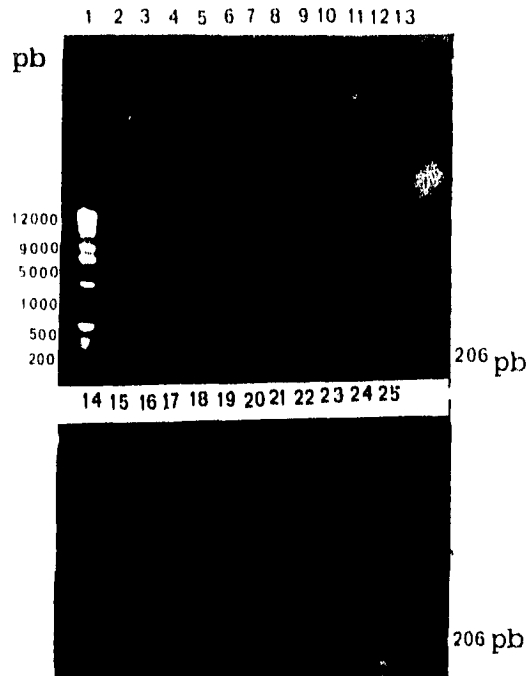


Figura 5A

Productos amplificados por PCR con la adición de bromuro de etidio 0.5µg/ml a la mezcla reactiva. 1.-Marcador de peso molecular; Control positivo de *Salmonella* (pg/µl): 2.- 3.4×10^4 ; 3.- 3.4×10^3 ; 4.- 3.4×10^2 ; 5.- 3.4×10^1 ; 6.-3.4; 7.- 3.4×10^{-1} ; 8.- 3.4×10^{-2} (última dilución amplificada); 9.- 3.4×10^{-3} ; 10.- 3.4×10^{-4} ; 11.- 3.4×10^{-5} ; 12.- 3.4×10^{-6} ; 13.- 3.4×10^{-7} . Control negativo *E. coli*: 14-25 diluciones seriadas de 10 desde 3.4×10^4 pg/µl hasta 3.4×10^{-7} pg/µl, observando la no amplificación de IS-200 únicos de *Salmonella*.

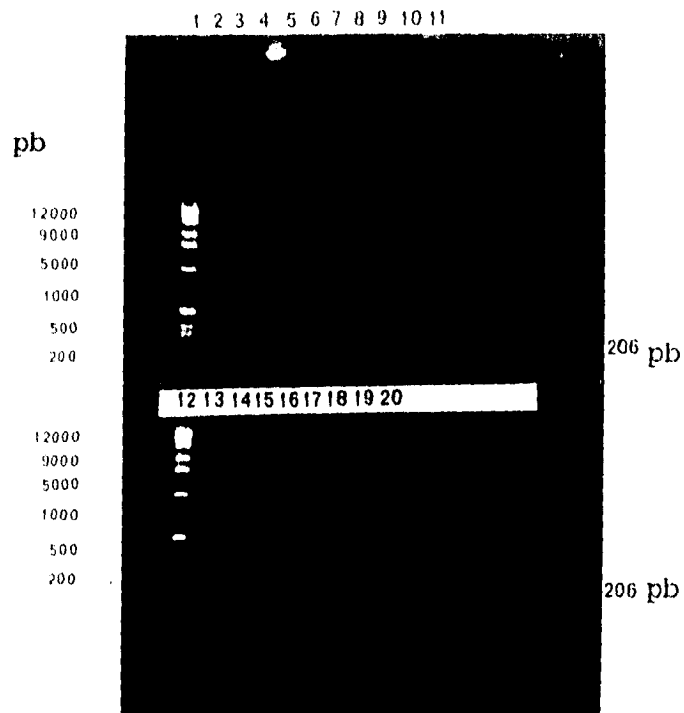


Figura 5B

Reproducibilidad en los resultados para la amplificación de IS-200 de *Salmonella* con 0.1ng/ μ l de DNA blanco agregando bromuro de etidio 0.5 μ g/ml en la mezcla reactiva de la PCR: 1 y 12.-Marcador de peso molecular; 2.-Control positivo *Salmonella*; 3.-Control negativo *E. coli*; 4-11.-0.1ng/ μ l de DNA de *S. enteritidis*; 13-20.-0.1ng/ μ l de DNA de *E. coli*.

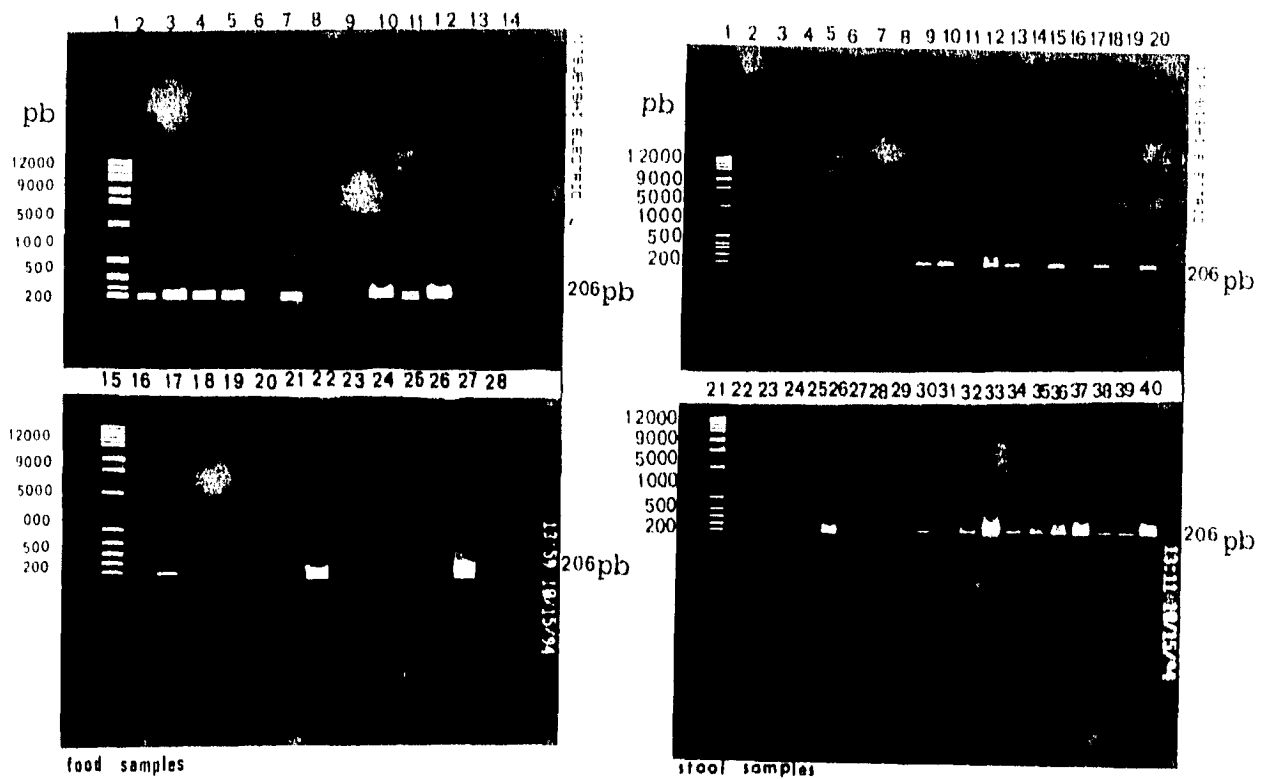


Figura 6

Ejemplo de algunos productos amplificados IS-200 por PCR en presencia de bromuro de etidio 0.5µg/µl.

A.-Muestras de alimentos: 1 y 15.-Marcador de peso molecular; 2-5,10,12,17,22,27 PCR (+) y cultivo (+); 7,11 PCR(+) y cultivo (-); el resto de las muestras fueron PCR(-) y cultivo (-).

B.-Muestras fecales: 1 y 21 Marcador de peso molecular; 2-9,12,15,17,19,27,28,29 PCR(-) y cultivo negativo para *Salmonella* y positivo para *C. jejuni*; 10,11,13,14,16,18,20,26,30,32-40 fueron PCR (+) y cultivo (+); 22-25,31 PCR (-) y cultivo (-).

DISCUSION

El uso de los iniciadores SF1/SR2 en PCR resultó ser altamente confiable para la confirmación en cepas puras de *Salmonella* e identificación de la misma en muestras problema, ya que sólo amplificó Secuencias de Inserción (IS-200) únicas para el género *Salmonella*, que a diferencia de otros iniciadores, descritos por Gilbert et al.(48) para la amplificación de IS-200 por PCR presenta reacción cruzada con algunas especies de *Shigella*. Por otro lado es capaz de amplificar a partir de 6 a 60 organismos de *Salmonella* lo cual representa una cantidad muy pequeña en comparación con el uso de otros iniciadores reportados por Widjoatmodjo et al. (60) para la detección de *Salmonella* en un ensayo de PCR Inmunomagnético, que es capaz de amplificar secuencias de DNA a partir de 100 organismos, mientras que Rahn et al. (61) reportó un ensayo de PCR para la detección de un gen *invA* a partir de 3×10^2 moléculas de DNA e Iida et al. (62) uso iniciadores que amplifican secuencias en la región 16S a partir de 10^4 bacterias. Se sugiere que esta diferencia favorable para la amplificación de IS-200, se deba a que estas secuencias pueden encontrarse en múltiples copias en el genoma de *Salmonella* mientras que para otros genes posiblemente exista una sola copia. Además la cantidad de organismos detectados (6-60) por PCR es tan pequeña que difícilmente se favorece su crecimiento en los medios de cultivo tradicionalmente usados. Técnicas de hibridización también han sido descritas para la identificación de *Salmonella*, sin embargo, la cantidad de material genético que se requiere es mayor que para la PCR (63, 64).

De acuerdo al tipo de muestra a analizar, existe una gran variedad de materia orgánica e inorgánica presente en muestras de alimentos y heces, así como una amplia flora microbiana particularmente en heces, por lo que resulta problemático la extracción de DNA bacteriano con un buen rendimiento, pureza e integridad, en este trabajo se uso la técnica de Boom modificada resultando ser consistente la presencia de DNA durante la realización de las extracciones tanto en las cepas puras como en las muestras de alimentos y heces, que a diferencia de la técnica de extracción con Proteinasa K/fenol-cloroformo (que es la más comunmente utilizada) no siempre se obtenía DNA directamente de las muestras problema o el rendimiento era menor, de manera semejante se comportaron las otras técnicas utilizadas. La eficiencia de la técnica de Boom modificada se atribuye al carácter caotrópico que tiene el Tiocianato de Guanidinio y

a la presencia de altas concentraciones de sales que hace que las bacterias se lisen fácilmente, permitiendo la liberación de material genético que al estar en contacto con partículas de sílice presentan una unión selectiva, eliminando en gran medida cualquier otra sustancia que no sea material genético. Otra de las razones por las cuales se puso especial énfasis en la extracción de material genético, es que existen muchas sustancias utilizadas en diferentes técnicas que son capaces de inhibir la PCR (principalmente aquellos que inhiben la polimerasa Taq) o el que se encuentren sustancias contaminantes en la muestra dando lugar a resultados falsos negativos. Según nuestros resultados, la realización de la PCR para *Salmonella* a partir de DNA genómico extraído por la técnica de Boom modificada, dió el mayor número de PCR verdaderamente positivos y verdaderamente negativos, lo cual significa que las sustancias utilizadas en dicha técnica de extracción además de no dañar la estructura del DNA, inhiben en un bajo grado la PCR, ya que muestras de DNA que tenían algunas partículas de sílice inhibían la amplificación de IS-200. Esto confirma el trabajo de Rossen et al. (65) donde demuestran que la presencia de diversos componentes a ciertas concentraciones ya sean de la muestra en estudio o bien de sustancias utilizadas en las diferentes técnicas de extracción pueden inhibir la reacción enzimática de la PCR, por ejemplo la presencia de fenol de tan sólo 0.5% y de SDS al 0.01% inhiben la PCR, mientras que menos de 100mM de isotiocianato de guanidinio no inhibe dicha reacción. Por lo tanto consideramos que la extracción de material genético juega un papel muy importante para el éxito en la PCR.

Con base al cálculo del coeficiente de contingencia (0.66 en alimentos y 0.67 en materia fecal), existe una alta asociación entre el diagnóstico por cultivo y por PCR para la detección de *Salmonella* tanto en muestras de alimentos como en muestras fecales, lo cual significa que la PCR es una alternativa para la detección de *Salmonella sp.*, con la ventaja de que es un método más rápido que puede llevar alrededor de 6 a 8 h de trabajo en comparación de 4 a 5 días que tarda un cultivo, además de presentar una mayor sensibilidad y especificidad respecto al cultivo. Como se puede observar en los resultados para muestras de alimentos y heces (Fig. 6) se detectó en su mayoría *Salmonella* con la amplificación de IS-200 por PCR y cuyo cultivo fue positivo para dicho microorganismo, sin haber reacción cruzada con otras bacterias presentes en la muestra, especialmente en heces.

Por último presentamos la posibilidad de automatizar la detección de productos amplificados IS-200 por medio de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al enlazarse con el DNA, siendo directamente proporcional a la cantidad de DNA amplificado, con la ventaja de que en presencia de dicho cromógeno durante la reacción de PCR, ésta no se ve

afectada, pero consideramos que se requiere de más ensayos para su estandarización ya que en el caso de las muestras fecales los valores de fluorescencia para los PCR (-) fueron superiores a las 800 UAF, esto quizás se debió a la presencia de DNA de bacterias diferentes a *Salmonella sp.* al cual también se une el bromuro de etidio aumentando así el grado de fluorescencia. Proponemos para futuros ensayos que, si se utiliza una secuencia de nucleótidos por arriba de 600-800pb como DNA blanco para la amplificación, se diferenciaran mejor los valores de fluorescencia entre PCR positivos y negativos para poder automatizar el ensayo y ser utilizado en la rutina para el análisis de un número grande de muestras.

La PCR específica para IS-200 de *Salmonella* que presentamos aquí, no diferencia a nivel de especies a en comparación a el cultivo, sin embargo resulta ser de gran utilidad para el control y reducción en la transmisión de infecciones por *Salmonella*, a través de alimentos, agua o heces contaminadas.

Por lo tanto el validar este ensayo de PCR para la detección de *Salmonella sp.* puede ser de gran atracción en el campo de la Epidemiología Molecular, ya que identificando a nivel molecular características propias de un microorganismo nos permite conocer la etiología, la distribución y los factores de riesgo en las infecciones diarreicas causadas por *Salmonella* y otros agentes infecciosos con el objeto de tener un mayor control tanto en la calidad de productos alimenticios como en la vigilancia y prevención de enfermedades infecciosas para un mejor nivel de Salud Pública.

CONCLUSIONES

1.- La técnica por PCR con el uso de los iniciadores SF1/SR2 que amplifican Secuencias de Inserción (IS-200) para la identificación de *Salmonella sp.* en muestras de alimentos y muestras fecales, tiene una alta validez, confiabilidad y reproducibilidad, por lo tanto es una opción para la detección de *Salmonella sp.*

2.-La extracción de DNA directamente en muestras de alimentos y muestras fecales es un factor determinante para el éxito en la PCR. La técnica de Boom modificada con el uso de Tiocianato de Guanidinio y partículas de sílice fue la más eficiente.

3.-La presencia de bromuro de etidio en la mezcla reactiva de la PCR no inhibe la amplificación de Secuencias de Inserción (IS-200) en muestras de alimentos y muestras fecales. La detección de 206 pares de bases, pertenecientes a IS-200, por fluorometría fue consistente para muestras de alimentos pero no para muestras fecales.

REFERENCIAS.

- 1.-WHO: Programme for control of diarrhoeal diseases. Interim programme report 1992. Geneve, 1993.
- 2.-WHO: Global health situation II. WER 47:350, 1992.
- 3.-WHO: Programme for control of diarrhoeal disease. VIII programme report 1990-1991. Geneve, 1993.
- 4.-WHO: Global health situation III. WER 6:33, 1993.
- 5.-WHO: Global health situation IV. WER 7:43, 1993.
- 6.-HULLAN, S., GUANG, ZL., MATHAN. 1991 Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull WHO* 89:542.
- 7.-Anonym. 1986. Concensus development conference statement on traveler s diarrhoea. *Rev. Inf. Dis.* 8 (Sup.): 227.
- 8.-TAYLOR, DN., AND ECHEVERRIA P. 1986. Etiology and Epidemiology of traveler s diarrhea in Asia. *Rev. Infect. Dis.* 8 (Sup.):136.
- 9.-HUGHES, JM., TAUXE, RV. Food-borne disease in Mandell GL, Douglas RG, Bennett EJ. *Principles and practice in infectious diseases* 3ED, Churchill Livingstone. New York, 1990.
- 10.-SSA/ops. Diagnóstico sobre la situación de la protección de los alimentos en México. *Secretaría de Salud, México*, 1993.
- 11.-GUTIERREZ, CL., GONZALEZ, BC., GIONG, CS. Y BELTRAN, LG. 1994. Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 10703 cepas en México entre 1982 y 1993. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 36:221-226
- 12.-PEARSON R. AND GUERRANT RL. Enteric fever and other causes of abdominal symptoms with fever. In: Mandel G.L., Douglas R.G., Benett E.J. *Principles and practice of infectious diseases*, 3Ed. Churchill Livingstone, 1990.
- 13.-MIMS, A., PLAYFAIR, HL., ROITT, M., WAKELIN, D. AND WILLIAMS, R. Infecciones de tracto gastrointestinal. *Microbiología Médica. Mosby/Doyma*, 1Ed. London, 1995.
- 14.-CARMELI, Y., RAZ, R., SCHAPIRO, JM., AND ALKAN, M. 1993. Typhoid fever in ethiopian immigrants to Israel and native-

born Israelis: a comparative study. *Clin Infect Dis.* 16:213-215.

15.-DIRECCION GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA. Boletín Semanal de Epidemiología, SSA. México. 1980-1992.

16.-BUISSON Y. 1992. Food poisoning outbreak. An epidemiological study. *Ann Gastroenterol Hepato Paris.* 28:268-273.

17.-EL-GAZZAR, FE. & MARTH, EH. 1992. Salmonellae, salmonellosis and dairy foods: a Review. *J Dairy Sci.* 75:2327-2343.

18.-Centers for Disease Control. 1990. Update: *Salmonella enteritidis* infectious and grade. A shell eggs. *United States, Morbidity and Mortality Weekly Report* 38:877-880.

19.-JUNE, GA., SHERROD, PS. AND WH ANDREWS, WH., 1992. Comparison of two enzyme immunoassays for recovery of *Salmonella sp.* from four low moisture foods. *J. Food Prot.* 55:601-604.

20.-PERALES, I. AND AUDICANA, A. 1989. Semisolid media for isolation of *Salmonella spp.* from coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3032-3033.

21.-ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Control de Salmonellosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal: Informe Técnico 774. Ginebra:OMS 1988.

22.-KAKU, M., PERESI, JT., TAVECHIO, AT., FERNANDEZ, SA., BATISTA, AB., CASTANHEIRA, IA., GARCIA, GM., IRINO, K. AND GELLI, DS. 1995. Food poisoning outbreak caused by *Salmonella enteritidis* in the north west of Sao Paulo State, Brazil. *Rev. Saude Publica.* 29:127-31

23.-AXON, ATR. AND POOLE, D. 1973. Salmonellosis presenting with cholera-like diarrhoea. *Lancet* i: 745-746.

24.-KROUPAL, RL. AND DEIBEL, RH., 1975. Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 11: 14-22.

25.-CHOPRA, AK., HOUSTON, CW., PETERSON, JW., PRASAD, R. AND MEKALANOS, JJ. 1987. Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 169: 5095-5100.

26.-FERNANDEZ, M., SIERRA, JM., DE LA VEGA,, VAZQUEZ, M., LOPEZ VIDAL, Y., RUIZ, P. AND CALVA E. 1988. Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT-like enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* 2: 821-825.

- 27.-EDWARDS, PR. AND EWING, WH. Identification of Enterobacteriaceae, 4th. ed. Burgess Publishing Co, 1986.
- 28.-BRENNER DJ. Facultative anaerobic Gram negative rods. Family 1: Enterobacteriaceae (Rahn, 1973). In: Bergey's manual of determinative bacteriology, vol. 1, NR Krieg, JG Holt (ed). Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. pp 408-516.
- 29.-DUSCH, H. AND ALTWEGG M. 1995. Evaluation of five New Plating Media for isolation of *Salmonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 33:802-4.
- 30.-ALVARADO-ALEMAN, FJ., RUIZ CASTAÑEDA, M., KUMATE, J. 1987. Prueba de floculación-aglutinación en capilar en el diagnóstico serológico de fiebre tifoidea en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 44:74-80.
- 31.-THOMASON, BM. 1971. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. *Appl. Microbiol.* 22:1064-1069.
- 32.-HERNANDEZ ELARDE, R., SANCHEZ CASTILLO, J., DIAZ, GM. AND MUÑOZ, O. 1980. Utilización de la técnica enzimático inmuno-específico (ELISA) para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. I. Estandarización de la técnica. *Arch. Invest. Med. (México)* 11:137-145.
- 33.-RUBIN, FA., KOPECKO, DJ., NOON, KF. AND BARON, LS. 1985. Development of a DNA probe to detect *Salmonella typhi*. *J. Clin. Microbiol.* 22:600-605.
- 34.-RUBIN, FA., KOPECKO, DJ., SACK, RB., SUDARMONO, P., YI, A., MAURTA, D., MEZA, R., MOECHTAR, MA., EDMAN, DC. AND HOFFMAN, SL. 1988. Evaluation of a DNA probe for identifying *Salmonella typhi* in Peruvian and Indonesian bacterial isolates. *J. Infect. Dis.* 157:1051-1053.
- 35.-RUBIN, FA., MCWHIRTER, PD., PUNJABI, NH., LANE, E., SUDARMONO, P., PULUNGSIH, SP., MLESMANA., KUMALA, S., KOPECKO, DJ. AND HOFFMAN, SL. 1989. Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1112-1114.
- 36.-MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. AND ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
- 37.-SAIKI, RK., GELFAND, DH., STOFFEL, S., SCHARF, SJ., HIGUCHI, R., HORN, GT., MULLIS, KB. AND ERLICH, HA. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-494.

- 38.-ARNHEIM, N., WHITE, T. AND RAYNEY, WE. 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *Bio. Sciences*. 40:174-182.
- 39.-WANG, RF., CAO, WW. AND JOHNSON, MG. 1992. Development of cell surface protein associated gene probe specific for *Listeria monocytogenes* and detection of the bacteria in food by PCR. *Mol. Cell. Probes*. 6:119-29.
- 40.-TSAY, Y-L. AND OLSEN, BH. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Env. Micro*. 58:754-7
- 41.-WAY, JS., JOSEPHSON, KL., PILLAI, SD., ABBASZADEGAN, M., GERBA, PC. AND PEPPER, IL., 1993. Specific Detection of *Salmonella spp* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Appl. Env. Micro*. 59:1473-1479.
- 42.-REXACH, L., DILASSER, F. AND FACH, P. 1994. Polymerase chain reaction for salmonella virulence-associated plasmid genes detection: a new tool in *Salmonella* epidemiology. *Epidemiol. Infect*. 112:33-43
- 43.-FADL, AA., NGUYEN, AV. AND KHAN, MI. 1995. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol*. 33:987-989.
- 44.-FDA (Food Drug Administration). Code federal regulation Food and Drugs parts 300-499. *The National Archives of the U.S.* 1986.
- 45.-LAM, S. AND ROTH, JR. 1983. IS-200: a *Salmonella*-specific insertion sequence. *Cell* 34:951-61.
- 46.-CANO, RJ., TORRES, MJ., KLEM, RE., PALOMERES, JC. AND CASADESUS, J. 1992. Detection of *Salmonellas* by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. *J. Appl Bacteriol*. 72:393-399.
- 47.-CANO, RJ., TORRES, MJ., KLEM, RE. AND PALOMERES, JC. 1992. DNA Hybridization assay using AttoPhosTM, a fluorescent substrate for alkaline phosphatase. *Bio. Techniques*. 12:264-269.
- 48.-GILBERT, I., BARBE, J., CASADESUS, J. 1990 Distribution of insertion sequence (IS-200) in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol*. 136:2555-60.
- 49.-GILBERT, I., CARROL, K., HILLYARD, DR. 1991. IS-200 is not a member of the IS-600 family of insertion sequences. *Nuc. Acids. Res*. 19:1343.

- 50.-SAIKI, RK., WALSH, PS., LEVENSON, CH. AND ERLICH, HA. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6230-6234.
- 51.-HEIGER, DN., COHEN, AS. AND KARGER, BL. 1990. Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. *J. Chromatogr.* 516:33-48.
- 52.-CHEHAB, FF., DOHERTY, M., CAI, SP., KAN, YW., COOPER, S. AND RUBIN, EM. 1987. Detection of sickle cell anemia and thalassemias. *Nature.* 329:293-294.
- 53.-HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, PS. AND GRIFFITH, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 10:413-417.
- 54.-EDEL W.A.E.H.K. 1983. Comparative studies of sublethally injured salmonellae in nine European laboratories. *Bulletin of the World Health Organization* 48:167-174.
- 55.-SAMBROOK, J., FRITSCH, ET. AND MANIATIS, T. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Press. *Cold Spring Harbor N.Y.* 1989.
- 56.-BOOM, RE., SOL, CJA., SALIMANS, MMM., JANSEN, CL., WERTHEIM-VAN DILLEN PME. AND NOORDAA, J. 1990. Rapid and Simple Method for purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.
- 57.-CAVE, H., MARIANI, P., GRANDCHAMP, B., ELION, J. AND DENAMEER, E. 1994. Reliability of PCR Directly from Stool Samples: Usefulness of an Internal Standard. *Biotechniques.* 16 (5):809-810.
- 58.-ILSTRUP, DM. 1990. Statistical methods in Microbiology. *Rev. Clin. Microbiol.* 3:219-226.
- 59.-SIDNEY SPIEGEL. Estadística no Paramétrica: Las medidas de correlación y sus pruebas de significación. 2ª Ed. Trillas, 1980.
- 60.-WIDJOJOATMODJO, MN., FLUIT, AC., TORENSMA, R., KELLER, BHI., VERHOEF, J. 1991. Evaluation of the Magnetic Immuno PCR Assay for Rapid Detection of *Salmonella*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:935-938.

1994 FEB 10 10 30 AM
 1994 FEB 10 10 30 AM

61.-RAHN, K., DE GRANDIS, SA., CLARKE, RC., MCEWEN, SA., GALAN, JE., GINOCCHIO, C., CURTISS, III. AND GYLES, CL. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes*. 6:271-279.

62.-IIDA, K., ABE, A., MATSUI, H., DANBARA, H., WAKAYAMA, S. AND KAWAHARA, K. 1993. Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella* strains using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 114:167-172.

63.-FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C. AND NERI, M. 1983. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1146-1151.

64.-TOMPKINS, LS., TROUP, N., ROUSSEL, L. AND COHEN, MI. 1986. Clonal, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J. Infect. Dis.* 154:156-163.

65.-ROSSEN, L., NORSEKOV, P., HOLMSTROM, K. AND RASMOSSEN, OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37-45.