

016721



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCION DE Salmonella sp y Listeria monocytogenes COMO AGENTES CONTAMINANTES EN QUESO FRESCO TIPO PANELA Y SEMIMADURADO TIPO CHIHUAHUA POR MEDIO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

T E S I S PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS PRESENTADA POR: CLAUDIA DOLORES ALCAZAR MONTAÑEZ

COMITE TUTORAL:

PhD. MA. SALUD RUBIO LOZANO

MVZ. MCV. J. FERNANDO NUÑEZ ESPINOSA

DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN

MEXICO D. F.

2002

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.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. CLAUDIA DOLORES ALCÁZAR MONTAÑEZ

DEDICATORIA

Para estimar la magnitud de un logro, es necesario contrastarlo con el esfuerzo o sacrificio que hubo de hacerse para obtenerlo; dedico este esfuerzo y su *consecuente logro a mi hija, con todo mi ser*

A Dios.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Doctora Ma. Salud Rubio Lozano, por su invaluable asesoría, por su apoyo, por su exigencia, por su amistad.

Al Doctor José Fernando Núñez Espinosa, por su interés, por sus valiosos comentarios, por concederme esta oportunidad y por tratarse de una persona de extraordinaria calidad humana.

Al Dr. Víctor H. Bustamante Santillán, por su apreciable colaboración, su paciencia y su tiempo.

Al Honorable Jurado, el Dr. Francisco Suárez Güemes y la Dra. Gabriela Bárcenas Morales, por sus atinadas observaciones así como por toda su buena disposición y amabilidad.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales, por permitirme la realización de este trabajo, por todo el apoyo proporcionado en el laboratorio de Genética Molecular.

A la QFB. Mireya Nicoli Tolosa, por su amabilidad y su gentil contribución, misma que dio viabilidad a la fase microbiológica de este proyecto.

A todo el personal que labora en el laboratorio de Genética Molecular, en particular a la Biol. Amanda Gayosso Vázquez y a la MVZ. Esperanza García López.

Al Dr. Marco Antonio Casillas Fabila, por las facilidades y el apoyo total para la fase del proyecto desarrollada en el Departamento de Medicina Preventiva.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Introducción	1
Revisión de la literatura	2
Hipótesis y objetivos	16
Materiales y métodos	18
Resultados	28
Discusión	36
Conclusiones	40
Agradecimientos	42
Literatura citada	43

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.	47
Cuadro 2	48
Cuadro 3.	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Anexo	50
Figura 1.	51
Figura 2.	52
Figura 3.	53
Figura 4	54

RESUMEN

Se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como una herramienta de diagnóstico para la detección de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes* como agentes contaminantes en quesos frescos tipo panela y semimadurados tipo Chihuahua; el objetivo fue determinar las condiciones para la amplificación simultánea de ADN de ambos microorganismos a partir de una reacción única de PCR. Como parte de la caracterización, se probaron muestras inoculadas artificialmente en concentraciones de 30 y 300 UFC/g de muestra, los cuales generaron resultados de amplificación positivos. Por otra parte, se realizó un análisis con muestras de campo, en el que los resultados obtenidos por esta técnica se compararon con los resultados de cultivos bacteriológicos con base en el tiempo empleado para desarrollar cada una de las técnicas; para dicho análisis se realizó un muestreo por conveniencia de acuerdo con la gravedad y la extensión de riesgo que representa cada microorganismo. Para esto se emplearon quesos de producción nacional, 60 unidades de muestra del tipo panela y 60 del tipo Chihuahua que se expendían en mercados sobre ruedas en la Delegación Coyoacan del Distrito Federal. Mediante las pruebas microbiológicas no se encontraron muestras positivas a ninguno de los dos microorganismos en ambos tipos de queso; en contraste, empleando la técnica de PCR se detectaron tres muestras del tipo panela que fueron positivas a la presencia de *Salmonella sp*, cabe señalar que tales muestras procedían del mismo mercado sobre ruedas.

SUMMARY

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes* in two types of Mexican cheese, fresh *panela* and partly aged *Chihuahua*. The objective was established simultaneous DNA amplification conditions for both microorganisms using only one PCR. Samples inoculated on 30 and 300 UFC/g was probed for establish amplification capacity on these conditions, and these samples was resulted positive. On the other hand, samples naturally contaminated was probed. At the same time, samples was analyzed by bacteriological probes. Time-needed-for-analysis were contrasted. Food sampling guidelines was conventional according with extension and seriousness for each microorganism. 60 cheese's *panela* type and 60 cheese's *Chihuahua* type were employed. The cheeses employed for this study are produced locally, and they are sold in flea markets located in Coyoacan, Mexico City. By bacteriological analysis was not positive samples for *Salmonella*; although, by PCR analysis three samples were positive. These samples were coming from only one flea market.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de la industria de la leche y algunos de sus productos como los quesos frescos y semimadurados, es la contaminación microbiológica que pueden sufrir durante su elaboración y venta.

Estos procesos interrelacionan diversos factores de riesgo, como por ejemplo, la manipulación continua a que se someten, condiciones sanitarias inadecuadas del establecimiento donde se elaboran; insuficiente higiene del personal e inadecuada limpieza de equipo y utensilios (Adams y Moss, 1995).

La contaminación del queso por diversos microorganismos patógenos hace que se convierta en una fuente importante de las llamadas Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), que tienen gran impacto económico y social en diversos países.

La venta de alimentos en la vía pública, como por ejemplo en mercados sobre ruedas, es considerada como de alto riesgo sanitario, ya que las condiciones en las que se expenden productos como el queso no son apropiadas. Esto, aunado a sus características bioquímicas, los convierte en altamente perecederos y propicios a sufrir contaminación, sobre todo de tipo bacteriano, por lo que se consideran potencialmente peligrosos para la salud del consumidor (Barreiro, 1998).

Dadas estas circunstancias, existe la necesidad inminente de proponer métodos que permitan un diagnóstico oportuno y eficaz para la detección de microorganismos patógenos en alimentos. El empleo de técnicas altamente sensibles y específicas, para la identificación de dichos agentes como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), podría ofrecer una alternativa de solución a dicha necesidad (Chen, 1997)

Salmonella sp y *Listeria monocytogenes* se encuentran entre los agentes causales más importantes de identificar por su implicación en la salud pública debido a los brotes que han generado. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo para la detección simultánea de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes* utilizando una técnica rápida, específica y sensible como es la PCR

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1. Situación sanitaria en México por brotes de enfermedades alimentarias originadas por *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*

Las enfermedades diarreicas, incluida el cólera, están señaladas entre los principales problemas de salud pública y donde los alimentos son fuentes importantes de contagio.

La información disponible en Latinoamérica, indica que las ETA están entre las primeras cinco causas de muerte en niños menores de cinco años y tienen una incidencia promedio de cuatro episodios diarreicos anuales por niño, además, muestran anualmente un franco aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad. De aquí la importancia de poder detectar microorganismos patógenos y/o toxigénicos en los alimentos que puedan ser generadores de brotes de ETA's.

En este contexto, la venta de alimentos en la vía pública tiene un impacto muy connotado sobre la salud pública, aunque en ocasiones, insuficientemente argumentado

La falta de protección higiénica para muchos productos alimenticios se debe a las condiciones que prevalecen en los mercados sobre ruedas en los cuales se comercializan. Tales condiciones incluyen prácticas como la manipulación inadecuada por parte del vendedor y el consumidor, los malos hábitos de higiene del personal, la exposición constante del producto a factores como son el aire, el polvo, la falta de control de temperatura de mantenimiento

Estas prácticas de riesgo, incluso pueden asociarse al tipo de proceso de elaboración al que estos productos están sujetos, como cuando se elaboran a nivel artesanal con la manipulación que este proceso implica, además de la falta de regulación sanitaria a este nivel (Organización Panamericana de la Salud, 1993).

En lo que se refiere a salmonelosis, en México sigue siendo un problema de salud pública que provoca importantes pérdidas económicas. En los últimos 30 años, ha disminuido paulatinamente la mortalidad por este padecimiento diarreico

en México; sin embargo, continúa provocando enfermedad entre la población menor de cinco años y en los ancianos principalmente

Hasta el 30 de octubre de 2001, habían ocurrido 6,171 casos registrados, 8.2% menos que para el mismo periodo en el año 2000 (Boletín Epidemiológico SSA, 2001; ICMSF: The International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996).

No se dispone de información confiable en cuanto al número de casos de salmonelosis, debido al subregistro que existe, ya que sólo se notifican los casos cuyo diagnóstico se basa en estudios de laboratorio

En México, el Laboratorio Nacional de Salud Pública con el propósito de conocer los agentes y alimentos involucrados con más frecuencia en los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, realizó la revisión de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario de 1980 a 1989.

Se estudió un total de 79 brotes de los cuales la *Salmonella* entérica causó 34% de los mismos, es decir, 18 de los 79 brotes estudiados, los cuales implicaron 596 casos de entre los que hubo 4 defunciones.

S. typhimurium fue aislada el mayor número de ocasiones, asociado a 4 casos confirmados por 94 brotes; así como también las serovariedades *Derby*, *Javiana*, *Anatum*, *Montevideo* y la subespecie *Arizona*

El queso (no se señala de qué tipo) resultó ser el alimento con mayor frecuencia implicado en el 31.43% de los brotes, de éstos, más de la tercera parte fueron causados por *Salmonella sp* (Parrilla et al, 1993)

Por otra parte, *L. monocytogenes* es un microorganismo que puede aislarse de una amplia variedad de alimentos y de distintos hábitats incluyendo el suelo, los silos e incluso heces provenientes de humanos y animales sanos

En años recientes han ocurrido brotes de enfermedades alimentarias causadas por *Listeria monocytogenes* en varias partes del mundo; sin embargo, a pesar de que en México no existen casos reportados de brotes de listeriosis, el microorganismo está considerado como emergente (Boletín SSA, 1998)

Por otra parte, teniendo en consideración la subnotificación de diversas

enfermedades en nuestro país, no resulta imposible que dichos casos sí se generen involucrando varios alimentos como carne, productos cárnicos, leche y productos lácteos, así como vegetales (Vázquez, Rodas and Quiñones, 2000).

La contaminación con el microorganismo puede ocurrir durante la preparación de los alimentos, el sacrificio de los animales para abasto, la cosecha o la venta, o bien cuando los productos, tales como la leche, provengan de animales infectados (Manzano et al, 1997).

L. monocytogenes puede ser eliminada por la vaca a través de la leche. Las superficies húmedas en plantas de procesamiento de alimentos frecuentemente contienen *L. monocytogenes*, y esto, combinado con la habilidad del microorganismo para crecer a bajas temperaturas se refleja en la frecuencia con que se presenta en unidades de enfriamiento y refrigeración.

Los alimentos parecen ser la principal fuente para infección humana con *L. monocytogenes*.

La prevención de la listeriosis humana debe comenzar en la granja y continuar a lo largo del procesamiento, para la selección y manejo de los alimentos por el consumidor. *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo y la obtención de una dieta normal totalmente libre de dicha bacteria es sumamente difícil (ICMSF, 1996).

Dadas las características del microorganismo mencionadas anteriormente, las cuales favorecen su permanencia y multiplicación, es necesario realizar un monitoreo de los alimentos, así como del equipo y utensilios de proceso de los mismos. Este procedimiento es necesario pese a que los alimentos son sólo potencialmente peligrosos cuando contienen entre 1000 y 10,000 células de *L. monocytogenes/g*.

Cabe destacar que el riesgo potencial del desarrollo de casos de listeriosis disminuye cuando los alimentos se someten a un cocinado correcto, y que procesos como la pasteurización pueden inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos (Manzano et al, 1997).

Existen varios estudios en torno a la posibilidad de que *L. monocytogenes*

resista la pasteurización, generados a raíz de un brote de listeriosis producido en 1983 en Massachusetts, Estados Unidos, aparentemente causado por consumo de leche pasteurizada (Adams y Moss, 1995), sin embargo, en tales estudios pudo demostrarse que el microorganismo sí se destruye durante el proceso.

Sin embargo, el riesgo puede mantenerse, bien por la probabilidad de contaminación cruzada al mezclarse la leche pasteurizada con leche cruda o bien, cuando existen fallas en el proceso de pasteurización, situación que puede ocurrir de la misma forma con la contaminación por *Salmonella sp* (O'Donell, 1995)

La importancia de este riesgo radica en la posibilidad de contaminación de la leche empleada para la elaboración de los quesos.

En forma particular en el caso de los quesos madurados, en donde el riesgo se ve incrementado debido a que durante el proceso, la utilización del lactato por los microorganismos, así como la liberación de aminas, aumentan el pH de la superficie permitiendo a *L. monocytogenes* multiplicarse hasta alcanzar niveles peligrosos (Adams M and Moss, 1995; Rudolf et al, 2001).

El brote de listeriosis que alertó a la comunidad científica del mundo sobre el papel de los alimentos en la diseminación de la listeriosis, tuvo lugar en California, E.U , durante 1985 en el cual se reportaron 142 casos de los cuales se generaron 48 decesos; *L. monocytogenes* fue aislada de un queso fresco tipo mexicano, así como del mobiliario de la planta en que fue procesado. El brote se interrumpió luego de que el queso fue retirado del mercado, situación que induce a poner especial atención a este producto respecto a los brotes de listeriosis (ICMSF, 1996)

1.2. Características, aislamiento e identificación de los microorganismos: *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*

Salmonella es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por gérmenes de forma bacilar, no esporulados, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque existen ciertas cepas mutantes inmóviles.

Los microorganismos de este género son Gramnegativos, aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas. No fermentan la lactosa. Soportan un rango de pH entre 4.5 y 9, con un óptimo de 6.5 a 7.5. Reducen nitratos a nitritos. Son citocromo-oxidasa negativos.

Dentro de la sistemática analítica para el aislamiento e identificación del género *Salmonella*, habitualmente se siguen varias etapas (Pascual A, 1992):

i. Preenriquecimiento en medio sólido no selectivo

En esta etapa se logra la revivificación de las *Salmonella* lesionadas, se incrementa su vitalidad y se adquieren las condiciones fisiológicas adecuadas para su desarrollo óptimo

ii. Enriquecimiento en medio líquidos selectivos

Durante esta fase, se estimula y favorece el crecimiento de las *Salmonella* y se restringe la proliferación de la flora competitiva.

iii. Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos

En esta etapa se restringe, aún más, el crecimiento de la flora competitiva y se estimula el de las *Salmonella*. Además, la composición de los distintos medios permite el crecimiento de colonias con aspecto característico en cada uno de ellos

iv. Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.

Acorde con las reacciones típicas de *Salmonella*, las pruebas bioquímicas se consideran como confirmatorias y permiten comprobar la pureza del cultivo.

v. Confirmación serológica.

En el caso de estas pruebas, el resultado esperado es la aglutinación en

aquellas secciones donde se mezclan cultivos y antisueros. Los cultivos bioquímicamente puros típicos de *Salmonella* y serológicamente negativos a este género no se consideran *Salmonella* y requieren más pruebas

En lo que concierne a *Listeria monocytogenes*, dicho género está próximo a la familia *Lactobacillaceae* y pertenece a la misma sección que *Erysipelothrix*

L. monocytogenes es un bacilo Grampositivo, que puede agruparse en empalizada, no esporulado, a veces cocobacilar, no ácido-alcohol resistente, catalasa positivo, oxidasa negativo.

Se desarrolla óptimamente en presencia de una tensión reducida de oxígeno. Su pH de crecimiento está próximo a la neutralidad, los valores están entre 7.2 a 7.6. El pH límite está alrededor de 5.6. Sin embargo, *L. monocytogenes* es bastante resistente a valores de pH ácidos.

Para la detección de *Listeria* en alimentos hay que recurrir a técnicas de preenriquecimiento, usualmente se utilizan medios líquidos selectivos que contienen antibióticos como acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximidas.

Posteriormente, el aislamiento se realiza en un medio sólido selectivo, como el agar feniletanol adicionado de cicloheximida o glicina y de cloruro de litio o sobre agar con ácido nalidíxico (agar Palcam) (Burgeois C, Mescle F and Zucca J, 1994).

Para la identificación del microorganismo, se utilizan también pruebas de fermentación de carbohidratos al 0.5% en caldo púrpura de bromocresol. Los resultados esperados sobre la fermentación de dichos carbohidratos son: manitol negativo, ramnosa positivo, maltosa positivo y xilosa negativo (NOM-143-SSA1-1995).

1.3. Comercialización de quesos en la vía pública

El queso es el producto resultante de la concentración de una parte de la materia seca de la leche, por medio de la coagulación.

La mayoría de los métodos de elaboración del queso, fueron descubiertos y desarrollados en forma empírica, las condiciones ambientales de cada zona (de acuerdo a la flora bacteriana predominante) determinaron a través del tiempo la adopción de métodos prácticos de trabajo basados en la observación.

Antes de que se desarrollara la aplicación de la microbiología en la industria alimentaria mediante el empleo de cultivos iniciadores, los quesos eran producidos por fermentación natural, la cual estaba condicionada por el ambiente, situación que favorecía la contaminación del producto por microorganismos patógenos.

Con el empleo de la pasteurización resultó necesario sustituir la flora bacteriana natural de la leche por flora seleccionada y controlada tecnológicamente, con el fin de garantizar una estandarización rigurosa desde el punto de vista sensorial, brindando además, una mayor seguridad sanitaria. Sin embargo, esta última puede verse afectada cuando los quesos se comercializan en la vía pública, tal como se realiza la venta en los mercados sobre ruedas.

La venta de alimentos en la calle es una actividad que no puede soslayarse en la situación internacional del comercio de alimentos actual y es, además, una actividad que no está reglamentada desde el punto de vista sanitario.

En México, la comercialización de alimentos en la vía pública es una práctica común que ha proliferado debido a una necesidad económica generada por diversas causas.

Entre tales causas, la insuficiencia de empleos es una problemática que se presenta principalmente en las grandes ciudades, mismas en donde se han tomado algunas medidas de control y fomento sanitario como son la capacitación y formación del personal que expende alimentos en la vía pública, así como la promoción de la educación para la salud en la población que los consume. Todas estas acciones han estado encaminadas a obtener una mejoría en la higiene y

sanidad de dichos alimentos

Cada año, la Organización Mundial de la Salud recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de miles de casos de ETA's en todo el mundo. Estos informes indican que las ETA's más frecuentes y numerosas son aquellas ocasionadas por los alimentos que han sufrido una contaminación biológica

La Organización Mundial de la Salud estima, que a pesar del número tan elevado de casos que son informados, las cifras constituyen tan sólo una pequeña fracción de lo que está ocurriendo realmente.

La contaminación microbiológica es responsable de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias. Esta contaminación es un indicador de prácticas de higiene deficientes en la preparación y almacenamiento de los alimentos

Los factores que contribuyen a la contaminación del queso por su comercialización en la vía pública son:

- Falta de refrigeración, que implica un almacenamiento inadecuado;
- uso de agua no potable para la limpieza

Además, sobresalen las malas prácticas de manipulación de los alimentos, lo que genera riesgos de contaminación cruzada. Otro de los factores es la acumulación de basura, que favorece la presencia de roedores e insectos (OPS, 1992).

El panela es un queso fresco, de pasta blanda, autoprensado, elaborado con leche pasteurizada de vaca. Como todos los quesos mexicanos frescos, su composición incluye un porcentaje elevado de humedad (hasta 58%) y por ello es altamente perecedero, de ahí que deba conservarse en refrigeración hasta el momento de ser consumido.

No obstante que su pH es relativamente bajo, debido a la alta concentración de humedad y a la escasez de sal, ese parámetro no logra ejercer un gran efecto inhibitorio en los microorganismos deteriorantes. Por ello la vida de almacén es corta, aún en condiciones de refrigeración.

El queso tipo Chihuahua es elaborado con leche entera de vaca (con un contenido mínimo de grasa del 3%) frecuentemente estandarizada, pasteurizada y adicionada de fermentos lácticos tales como *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*

La elaboración de este producto consta de una tecnología más que artesanal ya que requiere el empleo de leche pasteurizada, el manejo de cultivos lácticos, aditivos (cloruros de calcio y nitrato de potasio), corte con liras, prensado y madurado del producto.

Para ambos tipos de queso, es indispensable el empleo de temperaturas de refrigeración para preservarlos, condición que no se cumple cuando tales productos son expuestos para su venta en los mercados sobre ruedas ¹

¹ http://www.veterin.unam.mx/mexpec/Animales_Mex/alimentos/Lacteos/quesos.htm

1.3. Utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de microorganismos en alimentos

Ciertas características genéticas de los microorganismos, pueden ser empleadas para su identificación e inclusive su tipificación. Este tipo de detección no depende de factores medioambientales que intervienen en el desarrollo de los cultivos, como es el caso de la identificación bacteriológica, resultando, por lo tanto, más precisa

Actualmente existen métodos moleculares rápidos como herramientas de diagnóstico para la detección de microorganismos a partir de muestras; entre dichos métodos se encuentran: la hibridación con sondas genéticas, el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite una identificación rápida y altamente selectiva de microorganismos en diferentes matrices de alimentos mediante la amplificación específica de fragmentos de genes.

La PCR es un método de amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN *in vitro*, a partir de dos iniciadores que son complementarios a los extremos de la secuencia de ADN que se desea amplificar. Esto se logra a través del empleo de la enzima Taq-polimerasa, en presencia de iones de Mg^{++} la cual extiende el extremo 3' de cada iniciador, utilizando la secuencia de ADN blanco como molde para polimerizar los nucleótidos complementarios a dicha secuencia.

Dependiendo de la especificidad de la detección (género y especie, o bien, cepa específica), pueden emplearse diferentes regiones del genoma como blanco.

Entre los blancos más comúnmente empleados están aquellos genes que codifican para la producción de ciertas toxinas. Lo mismo genes asociados a la producción de enzimas específicas; o bien, aquellos que regulan ciertas características de virulencia o de patogenicidad

La reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso de iniciadores que hibridan al nuevo ADN que se sintetizó en el ciclo anterior de manera que se convierten en el blanco para la nueva síntesis.

Esta reacción ocurre en una serie de ciclos repetitivos que incluyen tres fases: la desnaturalización de la doble cadena de ADN; la hibridación de los iniciadores a los extremos del fragmento de ADN y la extensión de estos iniciadores sobre el ADN molde por la polimerasa termoestable.

Como resultado de la reacción, se genera entonces la acumulación exponencial del fragmento específico cuya dimensión está definida por los finales 5' de los iniciadores, en donde el producto de extensión sintetizado en un ciclo sirve como molde para el siguiente, de manera que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo (Harris and Griffiths, 1992; Erlich, 1992; Harvard Medical School, 1992).

Los ciclos necesarios para la amplificación se llevan a cabo en un termociclador que permite oscilar las temperaturas entre 94, 55 y 72° C, en promedio. A temperaturas de entre 90 y 94° C ocurre la desnaturalización del ADN, es decir, la doble cadena se abre para permitir la hibridación de los iniciadores. Esto ocurre a temperaturas de entre 50° y 60° C; y por último, la extensión de las nuevas cadenas se lleva a cabo generalmente a 72° C; esto representa un ciclo el cual se repite de 30 a 35 veces (Erlich, 1992).

La técnica de PCR es muy específica y altamente sensible, ya que solamente se amplifican los fragmentos de ADN limitados por los iniciadores dando lugar a la producción de un fragmento de un tamaño determinado, incluso en presencia de otro tipo de ADN no relacionado.

La técnica permite, además, detectar pequeñas concentraciones de ADN blanco, correspondientes a bajos números de células bacterianas en corto tiempo.

Una vez obtenido, el producto de PCR se evalúa y compara a un marcador de peso molecular en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, sobre un haz de luz ultravioleta (Harris and Griffiths, 1992; Erlich, 1992).

Frecuentemente los métodos tradicionales para la detección de

microorganismos pueden proporcionar resultados falsos negativos debido, por una parte, a que su desarrollo depende de cultivos en medios de selectivos; y por otra parte, al antagonismo entre *Salmonella sp* y *L. monocytogenes* con otros microorganismos respectivamente, en adición a las dificultades que tales bacterias ofrecen para su cultivo (ICMSF, 1996; Manzano et al, 1997; Chen, 1997).

Además, estos métodos requieren varios días para completarse y en muchas ocasiones para cuando se han obtenido resultados de ellos, los alimentos de corta vida de almacén ya han sido consumidos. De aquí la necesidad de desarrollar métodos que ofrezcan la posibilidad de emplear un menor tiempo para obtener resultados, así como que sean sensibles y específicos para facilitar la identificación de microorganismos que pudieran contaminar productos alimenticios.

Las características de especificidad y sensibilidad, así como el corto tiempo necesario para desarrollar la técnica, inherentes a la amplificación enzimática de ADN bacteriano a través de la reacción en cadena de la polimerasa *in vitro*, ofrecen una excelente alternativa a los métodos de cultivo bacteriológico tradicionales (oficiales) para detectar tipos específicos de microorganismos en muestras de alimentos.

Además, la reacción puede realizarse buscando la detección de las bacterias señaladas en forma simultánea (la cual se conoce como PCR combinada o múltiple); esto último es posible debido a que los productos de PCR esperados para cada microorganismo tienen diferentes tamaños moleculares (pares de bases).

El criterio más importante para la utilización de la técnica de PCR en la detección de microorganismos en alimentos son la especificidad y la sensibilidad

La especificidad está determinada básicamente por dos factores: uno de ellos son las secuencias de los iniciadores (oligonucleótidos), los cuales son diseñados exclusivamente para un determinado ADN blanco. El otro factor son las condiciones de hibridización, las cuales deben ser optimizadas con el fin de minimizar aquellas amplificaciones inespecíficas (Scheu, 1998).

La sensibilidad no depende únicamente de las condiciones de la reacción, está influenciada también por la matriz que ofrece la muestra del alimento a analizarse y por el método de extracción de ADN.

Para la sensibilidad de la técnica de PCR, la matriz de la muestra de alimento es decisiva, por ejemplo, la detección límite de *L. monocytogenes* en cultivos puros se encuentra entre 1 y 10 UFC/ml en tanto que en quesos de diferentes tipos tal límite se ha detectado entre 10^3 a 10^6 UFC/ml (Herman and De Ridder, 1993).

La principal limitante en el uso de la técnica de PCR en alimentos es la presencia de inhibidores.

Resultados falsos negativos pueden ocurrir debido a varias razones: la presencia de sustancias quelantes de cationes de magnesio, los cuales son indispensables para que se lleve a cabo la reacción; la degradación de ácidos nucleicos del ADN blanco y/o de los iniciadores debido a la presencia de endonucleasas, así como la inhibición directa de la ADN polimerasa (Demeke and Addams, 1992).

El grado de inhibición de la enzima está relacionado en gran medida con el tipo de alimento; por ejemplo, se ha demostrado que los quesos de pasta suave (entre los que se puede considerar el queso fresco), inhiben por completo la reacción, lo cual presumiblemente se debe a las concentraciones de caseína hidrolizada debido a la coagulación de la proteína durante la PCR.

Otros factores relacionados con la inhibición de la reacción pueden ser las enzimas propias del ADN extraído, conocidas como nucleasas endógenas que pueden comenzar su actividad en forma temprana, catalizadas por ciertos minerales contenidos en el alimento.

Los iones de calcio también han sido identificados como causas de inhibición de la PCR aplicada a la detección de *L. monocytogenes* en lácteos (Bickley et al, 1996).

De la misma forma, diferentes medios de enriquecimiento y sus componentes pueden inhibir las reacciones, por ejemplo, el citrato férrico de

amonio, sales biliares, esculina y acriflavina. Este problema, sin embargo, puede verse corregido al hacerse diluciones de las muestras en un orden de 1:10 a 1:50, pero con la desventaja de disminuir la sensibilidad para la detección de microorganismos al disminuir su concentración (Abbott, 1988).

La remoción de sustancias inhibitorias es, por lo tanto, un paso de suma importancia para la realización de la PCR, algunos de los procedimientos más sencillos para ese fin es la dilución de las muestras de alimentos (con la desventaja señalada anteriormente).

Otros procedimientos mediante los cuales es posible lograr dicho objetivo pueden ser: la centrifugación, mediante la cual se obtiene una porción precipitada de microorganismos (pastilla o pellet), y que fue el método empleado en este estudio (Fluit, 1993); o bien, la separación mediante sistemas de ultrafiltración como la diálisis, que presentan como desventaja consumir mucho tiempo para su realización (Khan, 1991).

HIPÓTESIS

La amplificación enzimática de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa *in vitro* permite la determinación de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados en un menor tiempo en comparación con los métodos bacteriológicos tradicionales y la capacidad de la técnica desarrollada permite la detección de tales microorganismos en una concentración de hasta 30 UFC/g de muestra.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa que permitan la detección simultánea (PCR combinada o múltiple) de los microorganismos patógenos *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*, como agentes contaminantes en quesos frescos y semimadurados, comercializados en mercados sobre ruedas; comprobar su capacidad de amplificación a través del empleo de muestras inoculadas a concentraciones conocidas; así como comparar los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR con aquellos obtenidos por los métodos bacteriológicos tradicionales (oficiales) con base en el tiempo empleado para el desarrollo de cada una de las técnicas,.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones de ciclos, tiempos y temperaturas para la técnica de PCR combinada o múltiple empleando ADN purificado de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*.
- Determinar el tiempo para la detección de los microorganismos seleccionados,

así como comprobar la capacidad de amplificación de la técnica de PCR, según la metodología desarrollada, a concentraciones de 30 y 300 UFC/g de muestra en quesos inoculados artificialmente.

- Aplicar la técnica de PCR a un estudio de campo, empleando un muestreo por conveniencia, así como aplicar los métodos de cultivo bacteriológico a las muestras en forma simultánea y comparar los resultados

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio realizado se clasifica como experimental y también como observacional, comparativo, transversal y prospectivo.

Como experimental, dado que se determinaron las condiciones para la realización de la PCR múltiple para la detección de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*; así como la capacidad de la misma que permitiera la detección de los microorganismos a una concentración de 30 UFC/g, así como a 300 UFC/g de muestra. Para realizar ambas determinaciones las variables fueron manipuladas, razón por la que el estudio corresponde a esta categoría

Es observacional, dado que para la realización del estudio de campo no se manipularon las variables. Es comparativo, ya que fueron contrastados los resultados provenientes de cada una de las técnicas en dicho estudio.

Transversal, puesto que cada unidad de muestra de las que lo conformaron fue analizada únicamente en una ocasión, con el fin de conocer la prevalencia de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*; y es prospectivo, dado que los resultados fueron obtenidos en forma posterior a la realización de los análisis (Méndez et al, 1996).

Es de suma importancia señalar el orden cronológico que se siguió para el desarrollo de este estudio:

- En primera instancia, se trabajó con cultivos bacterianos puros, cepas tipificadas que fueron donadas por el Laboratorio Nacional de Salud Pública (de la Secretaría de Salud), para la obtención de ADN puro, proveniente de cada uno de los microorganismos. De acuerdo con el orden de los objetivos señalados, las condiciones para la PCR múltiple se determinaron empleando dicho ADN puro, lo mismo que para comprobar la especificidad de los iniciadores seleccionados.
- Para la determinación de la rapidez y la capacidad de la PCR múltiple para

amplificar a partir de las concentraciones predeterminadas, se emplearon muestras de queso que fueron inoculadas artificialmente, desarrollando en este caso, la metodología específica para la obtención del ADN bacteriano presente en dichas muestras.

- El último objetivo señalado implicó el procesamiento de muestras sospechosas de encontrarse contaminadas naturalmente, bajo condiciones de alto riesgo de contaminación, como lo es la venta en mercados sobre ruedas, con el propósito de realizar su análisis para la detección bacteriana de los microorganismos señalados, tanto por PCR, como por los métodos bacteriológicos oficiales

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

a. Extracción de ADN de cultivos bacteriológicos puros

Se tomaron 2 ml del cultivo respectivo de cada uno de los microorganismos en caldo Luria (LB) en un tubo eppendorf y se centrifugó 10 min a 3,400 rpm; el sobrenadante se decantó cuidadosamente y a la pastilla resultante del precipitado se le agregaron 500µl de solución de lisis (8% sacarosa, 5% tritón X -100, 50mM EDTA, 50 mM tris-HCl pH 8) y se dejó reposar durante 10 min. Se agregaron 30µl de lisozima (50mg/ml), dejando reposar nuevamente 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó el tubo en agua hirviendo durante 1 min. Se agregaron 15µl de RNAsa dejándose incubar con esta enzima a 37° C durante 1 h para posteriormente depositar una solución de cloruro de sodio 5M a la muestra, de manera que se obtuvo una solución 2M, se mezcló vigorosamente y se sometió a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó en congelación a -20° C durante 2 h. Luego de este lapso, se centrifugó a 13,600 rpm durante 15 min, decantando cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó en dos ocasiones con etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 10,000 rpm y se decantó nuevamente para someterlo a secado en termoblock. Se agregaron 90 µl de agua bidestilada para resuspender el ADN obtenido y finalmente se verificó la integridad de éste, corriendo la muestra en un gel de agarosa al 1%, cuantificando los nanogramos obtenidos en el fluorómetro, mediante la relación concentración-índice de transmitancia, que realiza automáticamente dicho aparato (Silhavy T; Berman M and Enquist J, 1984.)

b. Técnica de PCR

Se utilizaron iniciadores ya probados para la amplificación del gen *lap* de *L. monocytogenes* (Manzano et al, 1997) y el gen *invA* de *Salmonella sp* (Galán, 1998), los cuales fueron ensayados juntos en una PCR combinada o múltiple, con la posibilidad de detección de ADN de ambos microorganismos a partir de una

reacción única de PCR

Las temperaturas, tiempos y ciclos en el termociclador se ajustaron de manera que los dos juegos de iniciadores funcionen en la misma reacción en un solo microtubo. La PCR múltiplex se ensayó inicialmente con ADN extraído de suspensiones de bacterias provenientes de cultivos puros

La PCR se realizó en condiciones estándares de volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos; una vez cuantificado el ADN obtenido proveniente de cada microorganismo, se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar una concentración final de 25 ng/μl; dicha concentración fue utilizada para todas las reacciones que se llevaron a cabo.

El gen *lap* forma parte del genoma del microorganismo y permite diferenciar *L. monocytogenes* de otras especies como son: *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanocii*, *L. seeligeri* y *L. murrayi* (Wang, 1992; Hein, 2001)

Para la identificación de *L. monocytogenes* se empleó el siguiente par de iniciadores los cuales detectan al gen *lap* (Manzano et al, 1997):

Tamaño del producto de PCR en pares de bases (pb)	Designación del iniciador	Secuencia del iniciador (y su tamaño en nucleótidos)
453	Mar 1	5'-GGGCTTTATCCATAAAATA-3 (19 bases)
	Mar 2	5'-TTGGAAGAACCTTGATTA-3' (18 bases)

En el caso de *Salmonella* se ha identificado una región específica del ADN que pertenece al gen *invA*, el cual es el primero de un operón constituido por tres genes que confieren a los serotipos patógenos de *Salmonella* la habilidad de invadir a las células epiteliales de los huéspedes.

El gen *invA* está involucrado en provocar la señal de transducción con la que empieza la endocitosis de los microorganismos y se ha demostrado su presencia en las siguientes serovariedades patógenas de *Salmonella*: *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. montevideo*, *S. newport*, *S. anatum*, *S. arkansas*, *S. enteritidis* y *S. javiana* (Galán, 1998; Nguyen, Khan and Lu, 1994)

Para la amplificación del gen *invA*, se empleó el siguiente par de iniciadores (Galán, 1998):

Tamaño del producto de PCR (pb)	Designación del iniciador	Secuencia del iniciador (y su tamaño en nucleótidos)
284	INVA-1	5'-CAgTggTgTCATATCATTgCC-3' (21 bases)
	INVA-2	5'-gTAAgAAggTgCTTATACATCTgC (22 bases)

Para llevar a cabo la reacción, los iniciadores seleccionados se emplearon a una concentración 10 mM; se utilizó una solución buffer de amplificación constituida por tritón X-100 pH 8 al 2%, albúmina sérica bovina (BSA) 3mg/ml; 1.5 mMoles de KCl; 2 mMoles de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, respectivamente, y 1.75 unidades/ μ l de ADN Taq polimerasa, empleando como vehículo agua bidestilada estéril. Esta mezcla se hizo en tubos eppendorf estériles que contenían todos los reactivos mencionados excepto el ADN blanco, el cual era el primero en ser dispensado en tubos de policarbonato (Biological brand, No. de Catálogo 34268), depositando posteriormente la mezcla descrita llevando cada reacción a un volumen final de 20 μ l.

Para cada reacción se utilizó un control interno que fue producto de la amplificación de ADN plasmídico denominado pBlueScript KS (PBS, Gen Bank No. x52327(KS+) x52329 (KS)) proveniente de *E. coli* cuyas secuencias de iniciadores denominados BS759 son las siguientes: GTA CCG GGC CCC CCC TCG AG y ACC GCG GTG GCG GCC GCT CT (cuyo tamaño es de 20 bases cada uno), los cuales generan un producto de PCR de 100 pares de bases. Asimismo, también se empleó agua bidestilada estéril como control negativo sustituyendo el ADN blanco.

c Electroforesis en gel de agarosa

Tanto para confirmar la integridad del ADN obtenido como para observar los

productos resultantes de la PCR, se elaboraron geles de agarosa en una solución de TBE 1x.

Para observar integridad del ADN, se disolvió 1% de agarosa (GIBCO BRL) en una solución de TBE 0.5 x, en tanto que para observar los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, se disolvió 2.5% de agarosa en la solución que ya se señaló, calentando hasta su ebullición; cuando la temperatura fue aproximadamente 50° C, se vertió en el molde de la cámara de electroforesis y una vez gelificado, se llenó la cámara con solución TBE 0.5 x, se mezclaron 4 µL de la muestra con 2 µl de solución de carga y se depositaron en el pozo correspondiente. Se utilizó un marcador de peso molecular (PBR digerido con HIND III) para comparar los productos obtenidos por PCR. Concluida la electroforesis a 50-70 voltios, el gel se depositó en un recipiente con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su tinción, tras lo que fue observado sobre un haz de luz ultravioleta (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989)

d Muestras

Las muestras empleadas, tanto en el caso de aquellas inoculadas en forma artificial, como las que formaron parte del estudio de campo fueron de quesos tipo panela y tipo Chihuahua, provenientes de diferentes plantas procesadoras; empacados a granel y comercializados en mercados sobre ruedas y, por lo tanto, expuestos a condiciones de riesgo de contaminación microbiológica.

e Procesamiento de las muestras para su análisis por PCR

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos (Manual sobre los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos, Secretaría de Salud) y preparación y dilución de las mismas (NOM-110-SSA1-1994), el mismo día en que se adquirieron, se tomaron 25 g provenientes de cada muestra (las cuales fueron de 250 g de peso, de acuerdo con lo señalado por la normatividad) en condiciones de esterilidad y se depositaron en 225 ml de agua

peptonada (proporción 1:9) desbaratándose completamente con una varilla de vidrio estéril hasta obtener una solución homogénea, dejándose incubar durante 24 h (NOM 114-SSA1, 1995) (Diagrama de flujo, anexo 1).

f. Extracción de ADN bacteriano a partir de las muestras inoculadas y muestras de campo

Después del tiempo de incubación, se tomaron 10 ml de la solución homogeneizada en tubos Falcon estériles para la obtención del ADN bacteriano; se debe señalar que fue necesario hacer algunas modificaciones al protocolo de extracción que se había seguido para la obtención de ADN de los cultivos bacterianos puros; dichas modificaciones fueron las siguientes:

1. Se aumentó el tiempo de 10 a 20 min en el que las muestras en caldo de cultivo una vez centrifugadas, deben resuspenderse en solución de lisis.
2. Igualmente, el tiempo de incubación con lisozima se aumentó de 20 a 30 min.
3. Se empleó una tercera enzima, proteinasa K, con el propósito de eliminar parte de los remanentes de proteína propios de la muestra que pudieran causar alguna interferencia con los resultados de la PCR, a una concentración de 100 µg/ml dejándose incubar durante 2 h a 55° C
4. El tiempo y velocidad de centrifugación para precipitar el ADN obtenido se aumentó de 10 a 15 minutos y de 12,000 rpm a 13,600 rpm

g. Análisis de datos.

Se determinó si existió concordancia entre ambas pruebas a través de la descripción y el análisis de los resultados, desde el punto de vista epidemiológico, comparando la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR tomando como referencia los resultados obtenidos por las técnicas de cultivo bacteriológico tradicionales.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

a. Técnica de cultivo bacteriológico

La detección bacteriológica mediante cultivo para *Salmonella sp*, se llevó a cabo conforme lo señala la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios: Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos; y el método de prueba microbiológico para alimentos: determinación de *L. monocytogenes* (NOM-143-SSA1-1995).

Como se señaló en el apartado correspondiente al procesamiento de muestras para su análisis por PCR, se tomaron 25 g de cada muestra en condiciones de esterilidad y se depositaron en 225 ml de agua peptonada (proporción 1:9) desbaratándose completamente con una varilla de vidrio y dejándose incubar durante 24 h a $37 \pm 1^\circ \text{C}$

Para llevar a cabo el análisis bacteriológico, tras el tiempo de incubación señalado, se tomó 1 ml del líquido bien homogeneizado y se depositó en 9 ml de caldo tetrionato; un segundo mililitro para 9 ml de caldo selenito-cistina; y un tercer mililitro para el caldo de enriquecimiento para *L. monocytogenes*, *Listeria* Enrichment Broth (LEB), dejándose incubar nuevamente en los medios líquidos durante 24 h a $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

Para la identificación de *Salmonella sp*, transcurrido el tiempo de incubación para los tubos con caldos de enriquecimiento tetrionato así como los de caldo selenito-cistina, se procedió a sembrar, mediante la técnica de gota estriada, en los medios: agar Hektoen y en agar xilosa-lisina desoxicolato (XLD); siendo incubados durante el mismo lapso e iguales condiciones de temperatura que en los medios líquidos (NOM 114-SSA1)

Posteriormente, a las muestras que resultaron sospechosas según las reacciones generadas en los medios selectivos Hektoen y XLD se realizaron las pruebas bioquímicas en agar triple azúcar-hierro (TSI) y agar lisina-hierro (LIA), cuyos resultados fueron observados luego de 24 h de incubación a temperatura ambiente.

Por último, a aquellas muestras que resultaron positivas a las pruebas bioquímicas en los medios TSi y LIA, se les aplicaron pruebas serológicas, las cuales se llevaron a cabo por parte del Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud (NOM-114-SSA1-1994).

Por otra parte, para la identificación de *Listeria monocytogenes*, se procedió a sembrar en agar Palcam un inóculo proveniente de los tubos que contenían caldo de enriquecimiento LEB, dejándose incubar nuevamente, por espacio de 48 h a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$

Las muestras sospechosas de contaminación por *Listeria monocytogenes*, según su crecimiento en el medio selectivo Palcam, fueron sometidas también a pruebas bioquímicas para su identificación. Las pruebas realizadas correspondieron a la fermentación de carbohidratos en púrpura de bromocresol. Dichos carbohidratos fueron: manitol, ramnosa, maltosa y xilosa. Estas muestras fueron incubadas a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 7 días (NOM-143-SSA1-1995).

b. Procedimiento de muestreo

Todas las muestras se transportaron al laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la FMVZ-UNAM para su análisis bacteriológico, siguiendo los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos (Manual sobre los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos) y preparación y dilución de las mismas (NOM-110-SSA1-1994)

c. Tamaño de la muestra

Se empleó un muestreo por conveniencia, lo cual se decidió en función a la heterogeneidad del marco muestral, mismo que estuvo conformado por quesos de los tipos ya señalados y fueron de diferentes marcas comerciales así como de diferentes fechas de elaboración

El plan de muestreo se determinó acorde a las características de patogenicidad y extensión de riesgo de los microorganismos a detectar, así como por las

condiciones bajo las cuales se expenden los productos; de esta manera, se determinó un total de 60 muestras de queso tipo Chihuahua de 250 g cada una y 60 muestras de queso tipo panela del mismo peso (ICMSF, 1973; Wachter, 1998)

Las muestras fueron adquiridas en varios puestos de cuatro diferentes mercados sobre ruedas ubicados en la delegación Coyoacan. El total de muestras analizadas se lotificó adquiriendo 30 unidades en cada tianguis. El primero y tercer lotes fueron conformados por quesos tipo panela; en tanto el segundo y el cuarto lotes fueron de quesos tipo Chihuahua.

RESULTADOS

I. Técnica de PCR

a. Especificidad de los iniciadores

Para determinar su especificidad, los iniciadores seleccionados para la amplificación del gen de *inva* (del genoma de *Salmonella sp*), fueron probados, en otros estudios, con ADN proveniente de diferentes géneros y especies bacterianas. Tales microorganismos fueron (Rahn K et al, 1992; Laberge, 1997):

Cultivo	No. de cepas probadas	Cultivo	No. de cepas probadas
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Actinobacillus ligneresii</i>	1	<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Aeromonas caviae</i>	1	<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2
<i>Aeromonas salmonicida</i>	2	<i>Citrobacter amaloniticus</i>	4
<i>Aeromonas sobria</i>	1	<i>Proteus morgani</i>	1
<i>Aeromonas sp.</i>	2	<i>Pasteurella multocida</i>	1
<i>Pasteurella hemolytica</i>	1	<i>Proteus vulgaris</i>	10
<i>Pseudomonas sp</i>	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Micrococcus lutea</i>	2	<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Citrobacter sp</i>	8	<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Rodococcus equi</i>	1	<i>Serratia liquefaciens</i>	1
<i>Shigella sp</i>	4	<i>Shigella sonnei</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	<i>Staphylococcus sp</i>	4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	3

Para corroborar la especificidad de los iniciadores elegidos para la amplificación del gen *invA*, en este estudio se realizaron diferentes ensayos de PCR para los cuales se utilizó ADN proveniente de: *Escherichia coli*, *Streptococcus cremoris*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Estos microorganismos (con excepción de *L. monocytogenes*), se seleccionaron dado que son algunos de los que forman parte de la carga microbiológica contaminante más frecuentemente identificada en el queso. *L. monocytogenes* fue probado con la finalidad de descartar ampliificaciones inespecíficas como producto de la PCR combinada o múltiple

Los resultados de amplificación de los iniciadores con el ADN de los microorganismos citados, fueron negativos en todos los casos.

Por otra parte, los iniciadores seleccionados para la amplificación del gen *lap* fueron probados, también en otros estudios, con ADN proveniente de diferentes géneros y especies bacterianas, para determinar su especificidad. Dichos microorganismos se enlistan a continuación (Hein et al, 2001; Wang and Hong, 1999):

Cultivo	No. de cepas probadas	Cultivo	No. de cepas probadas
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	<i>Rhodococcus equi</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1	<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	1	<i>Streptococcus cremoris</i>	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	<i>Sc. faecalis</i>	1
<i>L. welshimeri</i>	1	<i>Sc. durans</i>	1
<i>L. innocua</i>	17	<i>Sc. diacetilactis</i>	1
<i>L. seeligeri</i>	1	<i>Sc. faecium</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	<i>Kurthia gibsonii</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<i>K. zopfii</i>	1
<i>L. grayi</i>	1	<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Lactobacillus casei</i>	1	<i>Lb. plantarum</i>	1

De la misma forma, para corroborar la especificidad de estos iniciadores, en este estudio, fueron probados con el ADN proveniente de los microorganismos: *Escherichia coli*, *Streptococcus cremoris*, *Staphylococcus aureus*, seleccionados por las razones expuestas anteriormente; así como *Salmonella sp*. Los resultados fueron negativos (Figura 1)

b. Determinación de las condiciones de PCR para la amplificación simultánea de ADN de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*

Los iniciadores seleccionados para la detección del gen *lap* de *L. monocytogenes* y el gen *InvA* de *Salmonella sp*, fueron ensayados juntos en una PCR combinada o múltiple, con la posibilidad de detección de ADN de ambos microorganismos a partir de una reacción única de PCR

Las temperaturas, tiempos y ciclos en el termociclador se ajustaron de manera que los dos pares de iniciadores funcionan en la misma reacción en un solo microtubo. Bajo estas condiciones también se obtuvo la amplificación del plásmido pBlueScript KS, utilizado como control interno.

La PCR múltiple se ensayó inicialmente con ADN purificado, extraído de suspensiones de bacterias provenientes de cultivos puros. Se realizaron varios ensayos de PCR a diferentes temperaturas, las condiciones para la amplificación simultánea fueron: 94° C para la desnaturalización, 53° C para la hibridización o alineamiento y 72° C para la extensión (Figura 2).

Acorde con lo señalado en el apartado de material y métodos, se verificó que los productos de PCR obtenidos, efectivamente correspondieron con los tamaños en pares de bases que se esperaban; es decir, 453 pb de la amplificación del gen *lap* de *L. monocytogenes* y 284 pb de la amplificación del gen *invA* de *Salmonella sp* comparándolos con el marcador de peso molecular PBR digerido con HIND III.

c. Capacidad de amplificación de la PCR mediante el empleo de ADN bacteriano extraído de muestras de queso inoculadas artificialmente a concentraciones de 30 y 300 UFC/g de muestra

En primera instancia, se empleó un total de 20 muestras de queso inoculadas con *L. monocytogenes*. Diez de ellas, a una concentración de 30 células/g de muestra y las restantes a una concentración de 300 células/g de muestra.

La concentración de los inóculos se determinó por espectrofotometría; los inóculos fueron procedentes de cultivos puros de *L. monocytogenes*, luego de un tiempo de incubación de 48 h en medio líquido selectivo (LEB) para dicho microorganismo. Este mismo medio líquido (LEB), fue empleado para realizar las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas.

De las 10 muestras totales inoculadas a cada concentración señalada, 5 de ellas fueron de queso tipo panela y las 5 muestras restantes, de queso tipo Chihuahua.

Las muestras inoculadas fueron manejadas bajo las mismas condiciones que aquellas que formaron parte del estudio de campo, es decir, como se señala en el apartado de material y métodos, se siguieron los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos (Manual sobre los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos, Secretaría de Salud) y preparación y dilución de las mismas (NOM-110-SSA1-1994).

Los resultados de amplificación del gen *lap* empleando muestras inoculadas con *L. monocytogenes* a concentraciones de 30 y 300 UFC/g, fueron positivos.

Para asegurarse que en las muestras inoculadas no existiera previamente la presencia de los microorganismos a detectar mediante la técnica de PCR, dichas muestras fueron analizadas en forma simultánea por cultivos bacteriológicos, los cuales arrojaron resultados negativos.

Por otra parte, se empleó un total de 20 muestras de queso inoculadas con *Salmonella sp.* Diez de ellas, a una concentración de 30 células/g de muestra y las restantes a una concentración de 300 células/g de muestra.

La concentración de los inóculos se determinó por espectrofotometría, también procedentes de cultivos puros, luego de un tiempo de incubación de 24 h en medio líquido de enriquecimiento LB, mismo que se empleó para realizar las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas

De igual forma, de las 10 muestras inoculadas con *Salmonella sp*, a cada concentración señalada, 5 de ellas fueron de queso tipo panela y las restantes de queso tipo Chihuahua.

El manejo de estas muestras se realizó también siguiendo los procedimientos sugeridos por la normatividad, tal y como en el caso de aquellas inoculadas con *L. monocytogenes*. También fueron analizadas mediante cultivos bacteriológicos en forma simultánea para asegurarse que no existiera en ellas la presencia del microorganismo previa a la inoculación

Los resultados de amplificación del gen *invA* fueron positivos tanto para la concentración 30 UFC/g de muestra, como para 300 UFC/g de muestra (Figura 3).

II. Análisis bacteriológico de las muestras de campo

De acuerdo con lo señalado en el apartado de material y métodos, las muestras de campo se adquirieron en lotes de 30 unidades por cada mercado sobre ruedas, siendo analizadas mediante métodos bacteriológicos el mismo día en que se obtuvieron.

Las condiciones en que se encontraron los quesos muestreados fueron muy similares en los cuatro mercados sobre ruedas de donde se obtuvieron las muestras.

En todos los casos, los puestos de venta de los quesos, se encontraban colocados sobre la avenida y la sección del puesto en donde se atendía al público se encontraba del lado opuesto a la circulación vehicular.

También en todos los casos, los quesos se encontraban sobre las mesas de venta que forman parte de los puestos, colocados tras una vitrina de vidrio; el

empaquete que los protegía era plástico, el cual se encontraba rasgado únicamente sobre el sitio del que se habían estado cortando las porciones para venta

Así mismo, en ninguno de los mercados sobre ruedas se observó que hubiera disponibilidad de agua potable para la limpieza, como tampoco ningún medio de refrigeración o bien, empleo de hielo para mantener los productos a bajas temperaturas con el fin de conservarlos adecuadamente.

En lo que corresponde a la detección de *Salmonella sp*, se eligieron los medios selectivos Hektoen y XLD. Un total de 12 muestras provenientes de los quesos tipo panela resultaron sospechosas de contaminación por *Salmonella*, de acuerdo con las reacciones características que son observables en los medios que fueron seleccionados (Cuadro 1)

De entre las muestras sospechosas, 3 de ellas correspondieron al primer lote y las 9 restantes al tercero. A estas muestras, se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes, las cuales son: crecimiento en agar triple azúcar hierro (TSI) y en agar lisina-hierro (LIA). En estos medios se evidencia la generación de ácido sulfhídrico, característico del género *Salmonella*

De las 12 muestras analizadas con estas pruebas, 11 de ellas resultaron negativas, a excepción de una que provenía del tercer lote. Para confirmar si se trataba de la presencia de *Salmonella*, la muestra se sometió a la prueba de serología (misma que se llevó a cabo por parte del Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud), a la cual resultó negativa (NOM-114-SSA1-1994) (Cuadro 2)

En lo referente a la probable contaminación por *Listeria monocytogenes*, de acuerdo con el aspecto característico de la presencia del microorganismo en el medio Palcam, resultaron sospechosas 7 muestras provenientes de quesos panela exclusivamente. Del total de muestras sospechosas, 4 correspondieron al primer lote y las otras 3, al tercero

Siguiendo lo que indica la normatividad para la identificación del microorganismo, a las muestras sospechosas se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes. Dichas pruebas fueron de fermentación de

carbohidratos en púrpura de bromocresol.

Los resultados esperados sobre la fermentación de carbohidratos para la identificación de *L. monocytogenes* son: ramnosa positivo, manitol, maltosa y xilosa negativos.

De los resultados obtenidos, la fermentación de manitol se observó positiva, por lo que las muestras analizadas se consideraron como negativas a la presencia de *L. monocytogenes* al no coincidir con lo establecido por la norma correspondiente (NOM-143-SSA1-1995) (Cuadro 3)

III. Análisis de las muestras de campo mediante PCR

Realizada la extracción del ADN a partir de las muestras de campo, se llevaron a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa por duplicado para cada una de las muestras. Tres muestras de queso tipo panela, correspondientes al tercer lote, generaron resultados de amplificación positivos para el gen *invA* de *Salmonella*. Sólo una de las 3 muestras mencionadas, coincidentemente resultó sospechosa al análisis por métodos bacteriológicos (Figura 4)

IV. Tiempo requerido para la detección de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes* mediante la técnica de PCR múltiple y mediante los métodos bacteriológicos tradicionales (oficiales)

La metodología para la utilización de la técnica de PCR múltiple desarrollada en este estudio requiere un total de 28 horas para lograr la detección de cualquiera de los microorganismos *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*, ya sea por separado o en forma conjunta.

Para la detección de *Salmonella sp* por medio de los métodos bacteriológicos tradicionales (oficiales), fue necesario emplear un total de 7 días,

considerando desde el periodo de preenriquecimiento hasta las pruebas de identificación de género por serología.

La detección de *L. monocytogenes*, por su parte, requiere un total de 9 días, teniendo en consideración desde el periodo de cultivo en caldo de enriquecimiento hasta la identificación mediante pruebas bioquímicas.

DISCUSIÓN

Debido a las repercusiones que en materia de salud y economía representa la contaminación de los alimentos por diferentes microorganismos patógenos, la técnica de PCR, por sus múltiples ventajas con respecto a los métodos de cultivo microbiológico tradicionales (oficiales), ha sido propuesta como herramienta diagnóstica por varios autores tales como Wang (1992), Laberge (1997), Heine (2001) y Chen (1997), entre otros.

La metodología desarrollada en este estudio, permitió la amplificación simultánea de fragmentos de ADN provenientes de *L. monocytogenes* y *Salmonella sp.*

Se seleccionaron iniciadores que permiten la amplificación de un fragmento del gen *invA*, para la identificación de *Salmonella sp.* Estos iniciadores fueron probados, en estudios anteriores, con ADN bacteriano proveniente de un gran número de microorganismos, lo cual avala su alta especificidad (Rahn K et al, 1992; Laberge, 1997).

De igual manera, los iniciadores seleccionados para la amplificación del gen *lap* utilizados para la detección de *L. monocytogenes*, fueron probados, en otras investigaciones, con ADN bacteriano extraído de una amplia variedad de microorganismos, incluso con distintas especies del mismo género *Listeria*, sin generar amplificaciones sin que hubiera resultados de amplificación positivos, razón por la que es posible también considerarlos como altamente específicos (Hein et al, 2001; Wang and Hong, 1999)

Los iniciadores para la amplificación del gen *lap* fueron utilizados por Manzano et al (1997), quienes probaron la capacidad de amplificación de la técnica que desarrollaron, en el mismo intervalo que se empleó en este estudio para la PCR múltiple, es decir de 30 a 300 UFC/g, concentraciones que permitieron la amplificación del ADN del microorganismo en muestras de quesos.

Dichas concentraciones también coinciden con las determinaciones de Hein (2001), así como las de Mckillip (1999), quienes desarrollaron un método de

extracción de ADN bacteriano partiendo de muestras contaminadas artificialmente

Por otra parte, en lo que se refiere a la detección de *Salmonella sp*, otras metodologías como el ensayo Amplisensor (Chen et al, 1997) permiten la detección hasta un límite de 3 UFC/g de *Salmonella sp* con PCR, lo cual es similar a los resultados por Southern blot cuyo valor mínimo es de hasta 9 UFC/g (Stone et al, 1994) Cabe señalar que, aún cuando en este estudio no se determinó el nivel mínimo de concentración de UFC/g, la amplificación se logró probando con una concentración mínima de 30 UFC/g de muestra y mientras que los resultados de los estudios señalados anteriormente, únicamente aplican para la detección de uno solo los microorganismos, este estudio se propone hacerlo en forma combinada o múltiple.

La amplificación de los genes *lap* e *invA* de los microorganismos a detectar fue posible a partir de ADN obtenido de cultivos puros, como de muestras contaminadas Sin embargo, es importante señalar que en el caso del ADN obtenido de las muestras contaminadas tanto artificial como naturalmente, fue necesario realizar modificaciones al protocolo de extracción que originalmente se había empleado con los cultivos puros (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989)

Wang et al (1992), señalan haber detectado interferencias debidas a factores inhibitorios propios del alimento, probablemente relacionados con la concentración de caseína hidrolizada, según lo propuesto por Bickley (1996).

En este estudio, como parte del manejo de las muestras, tanto de las inoculadas como las de campo que se analizaron, se llevo a cabo una centrifugación preliminar (Fluit, 1993), con el propósito de precipitar en lo más posible, los sólidos provenientes de la muestra de queso. No se presentaron problemas de inhibición de la PCR.

También se han reportado interferencias debidas a algunos componentes del caldo de enriquecimiento LEB, problema que se evitó en este estudio con la metodología de extracción modificada, que incluyó el empleo de la enzima proteinasa K, con el fin de eliminar remanentes de proteína generados por la coagulación de la leche durante la obtención del queso, así como de inhibir la

acción de las nucleasas endógenas, ventaja lograda también con el empleo de la metodología propuesta por Laberge (1997)

En lo referente a los resultados obtenidos en el estudio de campo, es necesario resaltar que las condiciones en que se encontraban los quesos analizados eran inadecuadas desde el punto de vista sanitario para su venta y manejo. Los productos se encuentran expuestos a las condiciones del medio que ofrece la vía pública y, sobre todo, no se cuenta con sistemas que permitan la preservación adecuada de los mismos a través del mantenimiento de bajas temperaturas.

Resulta de particular relevancia no haber encontrado muestras positivas a la detección de *Salmonella* mediante los métodos bacteriológicos tradicionales (oficiales), dadas las circunstancias señaladas, más aún, considerando el estudio realizado por el Laboratorio Nacional que abarcó de 1980 a 1989 y en donde se señala que el queso fue uno de los alimentos mayormente implicados en la generación de brotes causados por dicho microorganismo.

De la misma forma, a pesar de dichas circunstancias, los resultados del análisis bacteriológico difieren con lo encontrado por Solano y Hernández (2000). Dichos autores detectaron *L. monocytogenes* en muestras de quesos mexicanos que incluían el queso tipo Chihuahua, empero, presumen se trate de una contaminación cruzada posterior al proceso de pasteurización de la leche con la que se elaboran dichos quesos, dadas las deficientes condiciones sanitarias de las plantas procesadoras en donde realizaron su estudio. La probabilidad de que dicha contaminación, efectivamente, ocurra de forma posterior a la pasteurización resulta de gran importancia, dado que algunos autores han llegado a proponer la sobrevivencia de *L. monocytogenes* a dicho proceso (Adams y Moss, 1995).

También Vázquez et al (2001), detectaron hasta 13% de positividad a *L. monocytogenes*, pero, en leche cruda, señalando también la relevancia de la pasteurización.

Resulta altamente probable que tal diferencia en los resultados señalados y los obtenidos en este estudio, radique precisamente en que los quesos analizados

fueron de marcas comerciales registradas, cuyas etiquetas señalaban, conforme lo indica la normatividad, haber sido elaborados con leche pasteurizada.

Dado que la técnica de PCR es muy sensible, como ya se ha señalado, es de suma importancia descartar la posibilidad de falsos positivos generados por remanentes de ADN de células bacterianas tras la pasteurización, dado que es posible hallar ADN bacteriano proveniente aun de células muertas o células no viables para su multiplicación.

Esta posibilidad puede eliminarse por dos razones: por una parte, los niveles mínimos de detección que fueron probados corresponden a células que se están reproduciendo activamente. Además, en un estudio realizado por Herman (1997), se probó la efectividad de la PCR para la detección de células de *L. monocytogenes* sometidas a diferentes condiciones de estrés que incluían tratamientos térmicos a diferentes intervalos de tiempo; así como exposición a distintos desinfectantes, pudiendo observar que al aumentar los tiempos de exposición a dichos factores, el ADN era fragmentado por nucleasas endógenas, impidiendo su amplificación por PCR.

Cabe destacar el hecho de que una de las muestras que resultaran positivas a la detección de *Salmonella* por medio de la PCR, también resultara sospechosa mediante el análisis bacteriológico, misma que, sin embargo, fue negativa una vez que se le realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de género. La positividad de esta muestra resulta de particular relevancia puesto que es aquí en donde tiene lugar la posibilidad de que la técnica de PCR sea más sensible que los métodos bacteriológicos, obteniendo así resultados positivos, aún a concentraciones menores que las que fueron probadas en el estudio. Ahora bien, dicha sensibilidad podría representar una ventaja que necesariamente debe ser verificada a través de la determinación de los máximos niveles de sensibilidad, tanto para los métodos bacteriológicos tradicionales (oficiales), como para la técnica de PCR.

La técnica de PCR múltiplex que fue desarrollada requiere únicamente de 28 horas para detectar tanto *Salmonella sp* como *L. monocytogenes* en quesos

frescos y semimadurado, dado que no es necesario realizar el aislamiento y el cultivo del microorganismo lo cual requiere un total de 7 días.

Es importante señalar que el tiempo que se requiere para la obtención de resultados por PCR incluye el tiempo de incubación de las muestras, que, en el caso de *L. monocytogenes* pudo reducirse hasta 24 horas. Esto representa una ventaja, ya que incluso para la detección del microorganismo en superficies inertes, el tiempo mínimo de preenriquecimiento necesario es de 6 horas (Nada, 1993). En tanto que en los alimentos, por ejemplo, Manzano et al (1997), emplearon tiempos de incubación de 48 horas para obtener resultados positivos de sus muestras inoculadas artificialmente; o bien, estudios como el de Laberge (1997), donde, tras 24 horas de incubación, los límites de detección en muestras de quesos fueron de entre 95 y 320 UFC/g. Por su parte, Ericsson and Stalhandske (1997) probaron con distintos tiempos de incubación para el microorganismo y proponen el empleo de un mínimo de 6 horas y al igual que Laberge (1997) y Nada (1993), señalan que al disminuir el tiempo, la capacidad para detectar resultados positivos, disminuye.

Desde el punto de vista epidemiológico, no fue posible comparar las técnicas. No existió ningún valor de concordancia entre los resultados obtenidos por la técnica de PCR y los métodos bacteriológicos, considerando a estos últimos como estándar o prueba dorada (es decir, guía o base); (Thrusfield, 1990) ya que hasta el momento son las pruebas oficiales, puesto que mediante tales análisis no se detectó ninguna muestra positiva.

CONCLUSIONES

Dado que la capacidad de amplificación de la técnica de PCR desarrollada fue probada únicamente con concentraciones de 30 y 300 UFC/g de muestra inoculada, obteniendo resultados positivos; se sugiere que la capacidad de la técnica en cuestión, bajo estas condiciones, puede ser aún mayor; es necesario entonces, la realización de una serie de ensayos que permitan determinar el nivel mínimo de sensibilidad

Para la consecución de tal objetivo, pudiera realizarse una comparación directa entre la técnica de PCR desarrollada y los métodos bacteriológicos en forma simultánea, reduciendo en forma gradual las concentraciones de los microorganismos.

De esta manera no sólo sería posible conocer la concentración mínima de UFC/g de muestra de sensibilidad de la técnica de PCR desarrollada, sino también, el nivel de sensibilidad de los métodos bacteriológicos oficiales. La importancia de esto último radica en el hecho de incrementar la confiabilidad de los resultados, descartando por completo la posibilidad de que los resultados de amplificación por PCR fuesen producto de células bacterianas muertas o no viables. Por otro lado, podría observarse hasta qué punto los resultados obtenidos por la técnica y los métodos coinciden; o bien, podría confirmarse que, en efecto, la técnica de PCR desarrollada es más sensible que los métodos bacteriológicos oficiales

Esto resulta particularmente importante para eliminar la posibilidad de que los resultados obtenidos por la técnica de PCR sean falsos positivos, mismos que pudieran llegar a ser generados por algún tipo de contaminación posterior

A reserva de determinar el nivel de sensibilidad, la ventaja que representa el tiempo para la obtención de resultados mediante la técnica de PCR, hace factible proponer su implantación como una prueba preliminar con carácter oficial, seleccionando aquellas muestras que resultasen positivas para continuar su análisis mediante los métodos bacteriológicos oficiales.

De igual manera, bajo la consecución de los objetivos planteados, resultaría posible hacer la comparación de la técnica de PCR y los métodos bacteriológicos desde el punto de vista epidemiológico, al ir determinando los niveles de sensibilidad a diferentes concentraciones de UFC/g de muestra, dado que para realizar dicha comparación es indispensable la obtención de resultados positivos mediante la prueba determinada como estándar dorado o guía, que en este caso son los métodos bacteriológicos, en su carácter de pruebas oficiales.

Teniendo en consideración los estudios epidemiológicos en los cuales se señala la incidencia de *Salmonella* y el alto porcentaje en que el queso se vio involucrado en los brotes causados por dicho microorganismo, la baja proporción de muestras positivas pudiera, en este momento, ser reflejo de la efectividad que han llegado a tener los programas de fomento sanitario y educación para la salud que se han implementado en los últimos años y a los cuales se les ha dado una difusión importante. Esta posibilidad también se sustenta en la paulatina disminución de la mortalidad y la morbilidad en los casos de *Salmonella*, como se ha reportado durante estos últimos años.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio estuvo financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN226798. De manera muy especial se agradece a la QFB Mireya Nicoli Tolosa y a la Biol. Amanda Gayosso Vázquez, por su valiosa colaboración para la realización de este proyecto

VII. LITERATURA CITADA

1. Adams MR y Moss MO. Microbiología de los alimentos. España: Acribia, 1995.
2. Barreiro IA. Determinación de riesgos y puntos críticos de control en alimentos en puestos de venta en la vía pública (taco al pastor), en Coyoacan, D. F (Tesis de Maestría) D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
3. Chen S, Yee A, Griffiths K, Wang C, Rahn K and De Grandis S. A rapid, sensitive and automated method for detection of *Salmonella* species in foods using AG9600 Amplisensor Analyzer. Journal of Applied Microbiol. 1997;83:314-321.
4. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. OPS, 1993.
5. Boletín de la SSA Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. Vols. 1997, enero-junio de 1998 México.
6. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies Blockie Academic and Professional. Microorganisms in foods. ICMSF; 1996.
7. Parrilla CC, Vázquez CJ, Saldade CO, Nava HL. Brotes de toxi-infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pùb Méx. 1993; 35:456-463.
8. Boletín de la SSA Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología Vols. 2000, enero-junio de 2001 México.
9. Vazquez S, Rodas S and Quiñones R. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms of the outskirts of Mexico City. Food Microbiol 2001;18:177-181.
10. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C and Comi G. Detection and identification of *Listeria monocitogenes* from milk and cheese by a single-step PCR. Mol Biotech. 1997;7:85-87.
11. O' Donell, E. The incidence of *Salmonella* and *Listeria* in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. Journal of the society of dairy technology. 1995;48:233-239.

12. Rudolf G, Melanie B, Scherer E, Siegfried A. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. Int Journal of Food Microbiol 2001;63:91-98.
13. Pascual AR. Microbiología alimentaria España: Diaz de Santos, 1992.
14. Burgeois CM, Mescle JF and Zucca J Microbiología alimentaria. España:Acribia, 1994.
15. Secretaría de Salud. NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos Determinación de *L. monocytogenes*. D O F. 19 noviembre de 1997.
16. Harris LJ and Griffiths MW The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction Food Research Int 1992;25:457-459.
17. Erlich HA PCR technology, principles and applications for DNA amplification. USA: Oxford University Press, 1992.
18. Harvard Medical School Short protocols in Molecular Biology USA: Green Publishing Associates and John Wiley and sons, 1992
19. Scheu P, Berghof K and Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. Food Microbiol. 1998;15:13-31.
20. Herman L and De Ridder H. Cheese components reduce the sensitivity of detection of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction Neth milk dairy J 1993;47:23-29.
21. Demeke T and Adams R. The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. BioTechniques. 1992;12:333-334.
22. Bickley J, Short J, McDowell D and Parkes H. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett. Appl Microbiol. 1996;22:153-158
23. Abbott M, Poiesz B, Byrne B, Kwok S, Sninsky J and Erlich G Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro J Infect Diseases.1988;158:1158-1169.
24. Fluit A, Torensma R, Visser M, Aarsman C, Poppelier M, Keller B Klapwijk P and Verhoef J. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. Appl Environ. Microbio. 1993;59:1289-1293.

25. Khan G, Kangro H, Coates P and Heath R Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin. Pathol* 1991;44:360-365.
26. Méndez R, Namihira G, Moreno A and Sosa M. El protocolo de investigación. México: Trillas, 1996
27. Silhavy, T.; Berman, M. and Enquist, J.: Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1984.
28. Organización Panamericana de la Salud Seminario sobre venta de alimentos en la vía pública. OPS, 1992
29. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T Molecular cloning a Laboratory Manual. USA: Coldspring harbor laboratory Press, 1989.
30. Silhavy T, Berman M and Enquist J. Experiments with gene fusions. USA: Coldspring harbor laboratory Press, 1984.
31. Wang R, Cao W and Johnson M. 16S rRNA-base probes and Polymerase Chain Reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992;58:2827-2831.
32. Galán J, Ginocchio C and Costeas P Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gen *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family *Journal of bacteriology* 1998;174:4338-4349
33. Nguyen AV, Khan MY and Lu Z. Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction *Avi Disea* 1994;38:119-126
34. Secretaría de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Manual sobre los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos.
35. Secretaría de Salud. NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico D.O.F. 16 octubre de 1995.
36. Secretaría de Salud. NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. D.O.F 22 octubre de 1995
37. Wachter R.C.. Planes de muestreo y criterio microbiológico. Memorias del III Curso de Actualización en Higiene y Calidad de la Carne; 1998 México D.F. División de Educación continua, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Organización Panamericana de la Salud y Secretaría de Salud.

38. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies Blockie Academic and Professional. Microorganismos de los alimentos 2, métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. España: Acribia, 1973
39. Rahn K, De Grandis, Clarke R, McEwen S, Galán E, Ginocchio C and Gyles C. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol and Cell probes 1992;6:271-279.
40. Laberge I, Blais B and Pandian S. Detection of *Listeria monocytogenes* inoculated in dairy products by AmpliScript. Food Microbiol. 1997;14:283-290.
41. Hein I, Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E and Wagner M. Detection and quantification of the *lap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. Res. Microbiol. 2001;152:37-46.
42. Wang C, Hong C. A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish. Food Microbiol. 1999;16:291-297.
43. Stone G, Orbest R, Hays M, McVey S, and Chengappa M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. Journal of Clinical Microbiol. 1994;32:1742-1749.
44. McKillip J, Jaykus L and Drake M. DNA extraction method from artificially contaminated food. Department of Food Science and Technology, Southeast Dairy Foods Research Center, Mississippi State University. <http://www.confex.com/ift/99annual/abstracts/3551.htm>.
45. Solano L and Hernandez S. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. Int Journal of Food Microbiol. 2000;62:149-153.
46. Herman L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. Food Microbiol. 1997;14:103-110.
47. Nada B, Batt C. A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. Molecular and Cellular probes. 1997;7:243-249.
48. Ericsson H and Stalhandske P. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in "gravad" rainbow trout. Int. J. Food Microbiol. 1997;35:281-285.
49. Thrusfield M. Epidemiología veterinaria. España: Acribia, 1990.

CUADRO 1. Muestras sospechosas de contaminación por *Salmonella sp*, según resultados de cultivo bacteriológico en medios selectivos.

Muestras	Selenito-Cistina		Tetracionato	
	Agar Hektoen	Agar XLD	Agar Hektoen	Agar XLD
Queso panela	12	12	12	12
Queso Chihuahua	-	-	-	-

CUADRO 2. Resultados de pruebas bioquímicas y serología a 12 muestras sospechosas de contaminación por *Salmonella sp.*

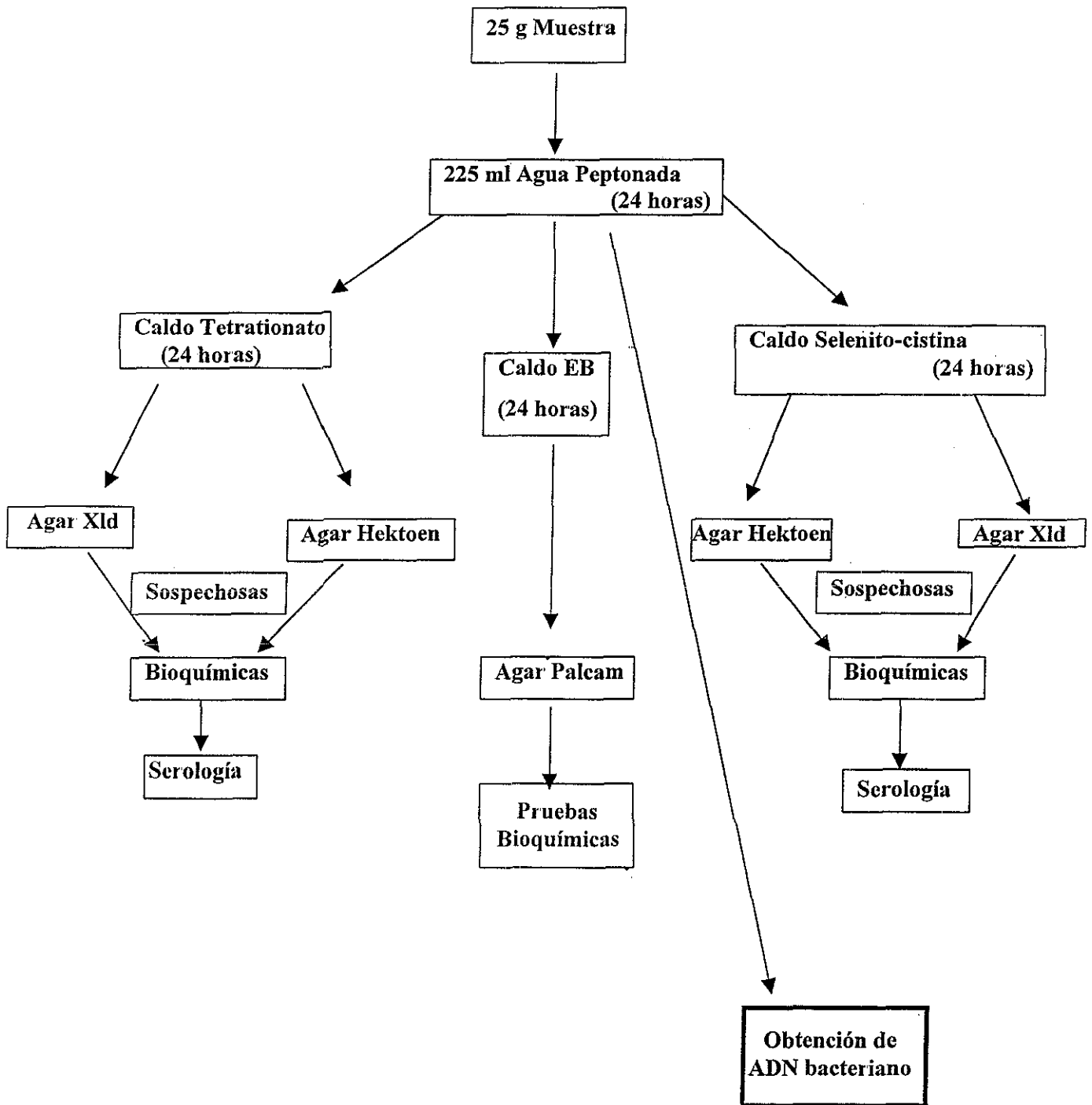
Muestra (Tipo de queso)	Triple-Azúcar-Hierro		Lisina-Hierro		Serología	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Queso panela	1	11	1	11	-	1

ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 3. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de las muestras sospechosas de contaminación por *L. monocytogenes*

Fermentación carbohidratos									
No. de muestras (Queso panela)	Ramnosa		Maltosa		Xilosa		Manitol		Identificación como <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	
7	7	-	7	-	1	6	7	-	-

ANEXO 1
Diagrama de flujo del Procesamiento de las muestras de campo



Especificidad de los iniciadores de *Salmonella* sp y *L. monocytogenes*

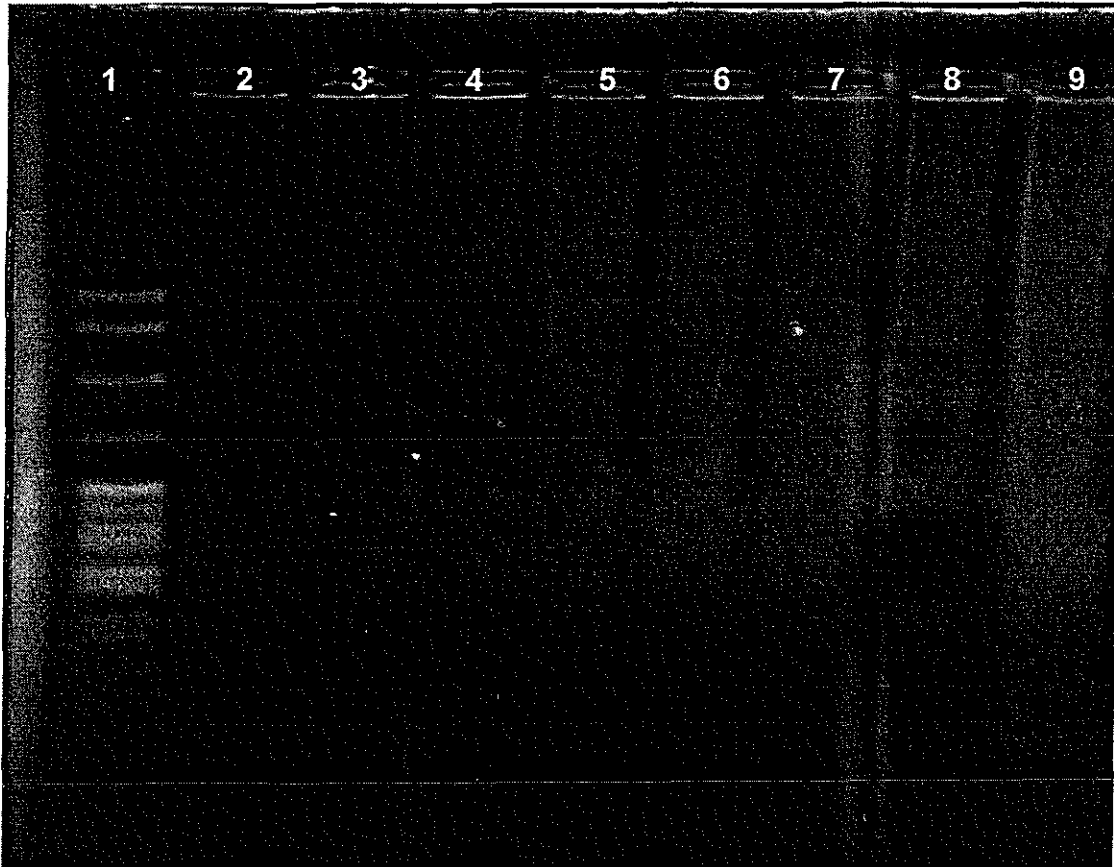


Figura 1. Resultados negativos de amplificación con el ADN proveniente de distintos microorganismos: Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, ADN de *Salmonella* e iniciadores para gen el *lap*, propio de *L. monocytogenes*; carril 3, ADN de *L. monocytogenes* e iniciadores para el gen *InvA*, propio de *Salmonella* sp; carril 4, y 5, ADN de *Staphylococcus aureus*; carriles 6 y 7, ADN de *Streptococcus cremoris*; en todos los casos se observa la amplificación únicamente del control interno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de las condiciones para la amplificación simultánea de ADN de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*

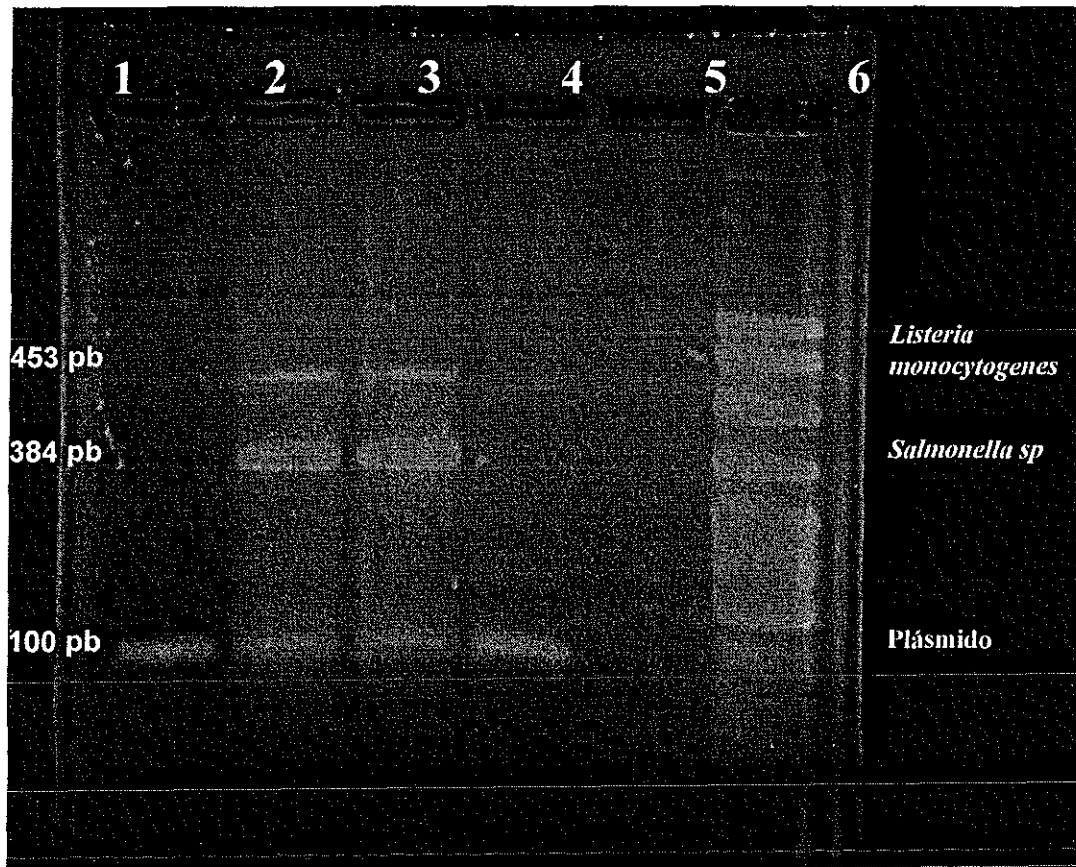


Figura 2. Determinación de las condiciones para la amplificación simultánea de ADN proveniente de *Salmonella sp* y *L. monocytogenes*: Carril 1, control negativo y control interno. Carril 2 y 3, amplificación de ADN de ambos microorganismos y control interno. Carril 4, control negativo y control interno. Carril 5, control negativo. Carril 6 marcador de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capacidad de amplificación de ADN de *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes* a partir de muestras inoculadas a 30 UFC/ml

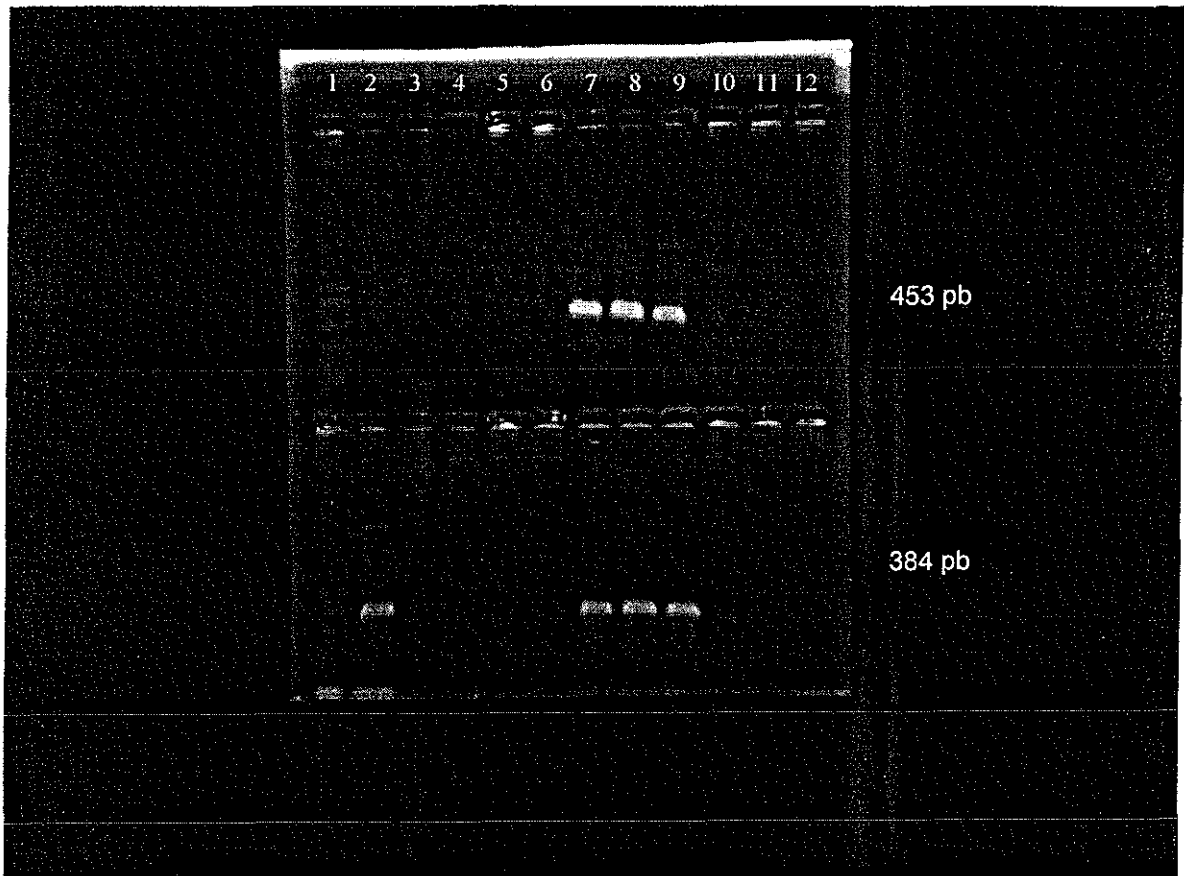


Figura 3. Carril 1, parte superior e inferior del gel, marcador de peso molecular; carril 2 (parte inferior del gel únicamente), control positivo más control interno; carriles 3, 4, 5 y 6 partes superior e inferior del gel, control negativo; carriles 7,8 y 9, parte superior del gel, muestras inoculadas a 30 UFC/ml con *Listeria monocytogenes*; carriles 7, 8 y 9, parte inferior del gel, muestras inoculadas a 30 UFC/ml con *Salmonella sp*; carriles 10, 11 y 12, vacíos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Muestras de queso positivas a la detección de *Salmonella sp* mediante
Reacción en Cadena de la Polimerasa

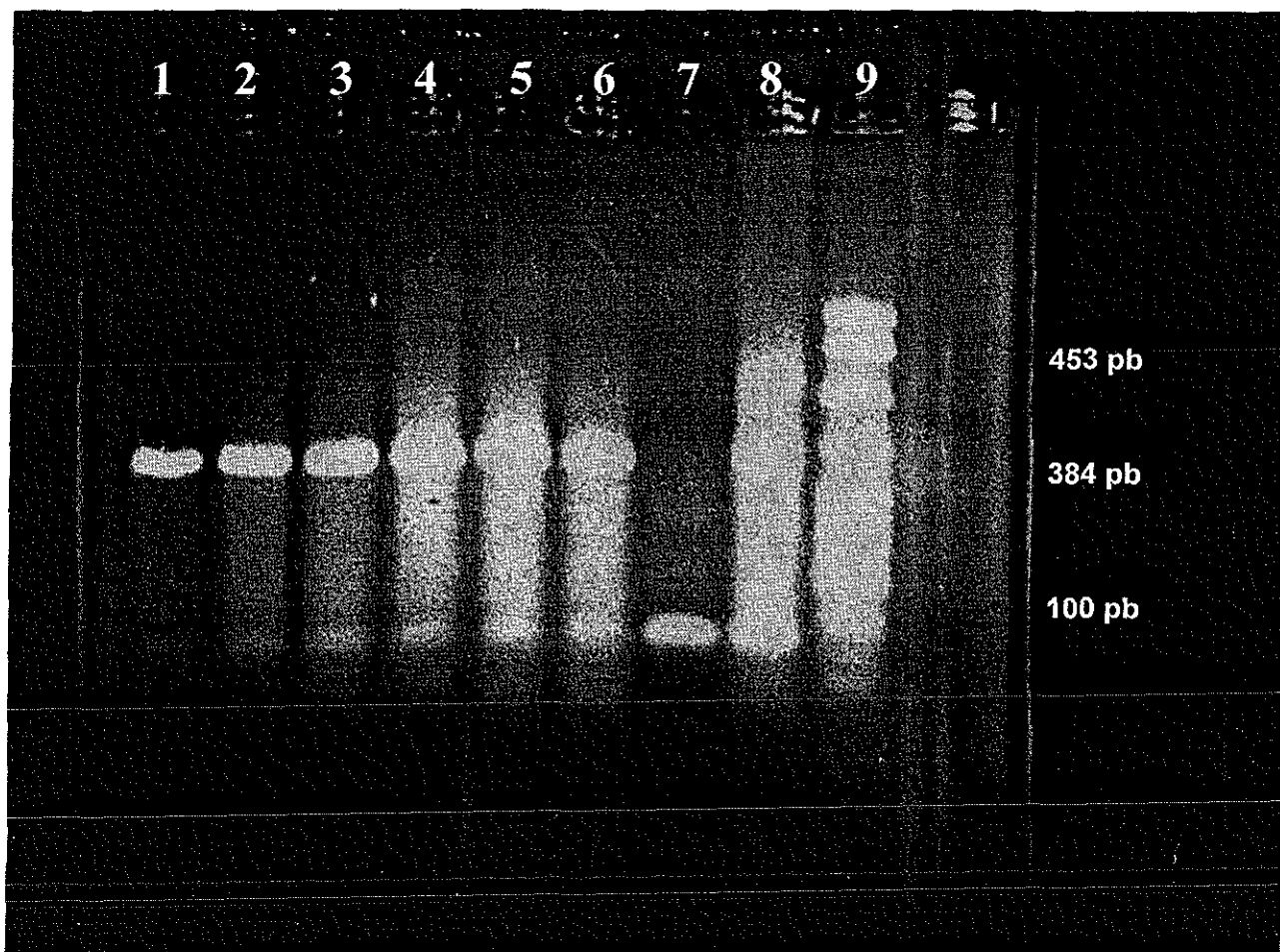


Figura 4. Carril 1, 2, 3, 4, 5, 6, muestras de queso tipo panela por duplicado, positivas por la amplificación de ADN de *Salmonella sp*, más control interno. Carril 7, únicamente control interno. Carril 8, control positivo, amplificación de ADN de ambos microorganismos y control interno. Carril 9, marcador de peso molecular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN