



0167425

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**División de Estudios de Posgrado**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL.**

**DETERMINACIÓN DE *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 EN CAMARÓN PARA  
EXPORTACIÓN PROCEDENTE DE ZONAS MARÍTIMAS DEL NOROESTE DE  
MÉXICO CON LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR).**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**TESISTA:**

**LISSETTE BEATRIZ PÉREZ CASAS**

**TUTOR:**

**JOSÉ FERNANDO NÚÑEZ ESPINOSA**

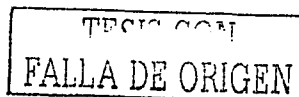
**COMITÉ TUTORAL:**

**VÍCTOR BUSTAMANTE SANTILLÁN**

**DANIEL VILLAGÓMEZ ZAVALA**

**MÉXICO, D.F.**

**2003**





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.

## **DEDICATORIA**

A mi papá +,  
por enseñarme el valor de la vida  
y lo importante que es luchar por  
lo que uno quiere. Gracias

A mi abuelita +,  
por enseñarme lo importante que  
es tener Calidad Humana. Gracias

A mi madre y hermano,  
por apoyarme y estar siempre conmigo.  
Los Quiero mucho. Gracias

A mis Amigos del Madrid y de la Facultad,  
por apoyarme en todo momento y  
compartir momentos de alegría y tristeza.  
Gracias.

A María, Danilo, Fernando, Daniel y Mireya,  
por ese apoyo tan grande y sincero.  
Gracias

TESIS CON  
FALLA DE CENCEN

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue demostrar la confiabilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PC) para la detección simultánea de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en camarón congelado para exportación. Para la reacción se amplificaron segmentos de ADN localizados en el gen *inv A* [284 pares de bases (pb)] de *Salmonella sp* y el gen *ctx AB* (777 pb) de *Vibrio cholerae* O1. Los iniciadores que amplifican estos segmentos fueron ensayados en una reacción de PCR para la detección del ADN de ambos microorganismos. Las condiciones de alineación para esta técnica fueron: 94° C, 58° C y 72° C durante 30 ciclos, lo que reduce el tiempo de diagnóstico por los métodos microbiológicos oficiales de 15 días, a 28 horas con la PCR. Las muestras de camarón crudo, descabezado y congelado provinieron de empacadoras certificadas para exportación, ubicadas en el estado de Sinaloa. Se realizó un muestreo al azar siguiendo los criterios del ICMSF y cumpliendo con lo establecido en el manual de procedimientos para la toma y manejo de muestras de alimentos para análisis bacteriológico de la SSA. Se obtuvieron 5 marquetas por lote y por empacadora; de cada marqueta de 5lb 8 oz (2.27 Kg) se realizaron 3 análisis bacteriológicos para la búsqueda de *Salmonella sp* y 3 para *Vibrio cholerae* O1, mismos que se analizaron con PCR. De las 60 muestras analizadas ninguna fue positiva con PCR y con los métodos microbiológicos oficiales no se encontraron tampoco muestras positivas a ninguno de los dos microorganismos. Sin embargo, con estos últimos métodos se identificaron otras especies de *Vibrio* y enterobacterias como son *Proteus* y *Acinetobacter*. Con estos resultados, se confirmó la rapidez, sensibilidad y especificidad del método, cumpliéndose el objetivo señalado. Se considera relevante la utilidad de la PCR para seleccionar productos contaminados y por lo tanto sujetos a un análisis microbiológico oficial, para confirmar su inocuidad.

**Palabras claves:** PCR, Camarón, *Vibrio cholerae* O1 y *Salmonella sp*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT

The objective of this work was the simultaneous detection of *Salmonella sp* and *Vibrio cholerae* O1 in frozen shrimp for export. Segments of DNA amplified were located in the gene *inv A* [284 pairs of bases (pb)] of *Salmonella sp* and the gene *ctx AB* (777 pb) of *Vibrio cholerae* O1. The primer pair that amplifies these segments was assayed in a PCR reaction for the detection of DNA of both microorganisms. The alignment conditions for the PCR were: 94° C, 58° C and 72° C during 30 cycles. These condition reduce time for 15 days (official microbiologic methods) to 28 hours (24 hours of preenrichment and 4 for the PCR). The samples raw shrimp, beheaded and frozen came from packers to certificate for exportation, located in the state of Sinaloa. We carried out random sampling, following the guidelines of the ICMSF, and fulfilling with the criteria established by the SSA in the manual of procedures for the taking and handling of food samples for bacteriological analysis. Five packages were obtained by lot and by packers. From each package (5Lb 8 Oz), we carried out 3 bacteriological analyses, looking for *Salmonella sp* and 3 for *Vibrio cholerae* O1; which were also analyzed by PCR. Of the 60 analyzed samples none was positive with PCR and with the official microbiologic methods they were not positive for microorganisms. However, with these methods we identified other species of *Vibrio* and enterobacterias like *Proteus* and *Acinetobacter*. With these results, we completed the objective, confirming the speed, sensibility and specificity of the method. PCR is considered of great utility to select contaminated products which can then be proved by official microbiologic analysis, to confirm their innocuousness.

**Key words:** PCR, Shrimp, *Vibrio cholerae* O1 and *Salmonella sp*.

## CONTENIDO

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN                                                                                          | 1  |
| REVISIÓN DE LA LITERATURA                                                                             |    |
| 1.1. Situación Sanitaria en México por el consumo de Camarón                                          | 2  |
| 1.2 Características, aislamiento e identificación de <i>Salmonella sp</i> y <i>Vibrio cholerae</i> O1 | 4  |
| 1.3. Comercialización del Camarón                                                                     | 5  |
| 1.4. Utilización de la PCR para la detección de Microorganismos                                       | 6  |
| HIPÓTESIS                                                                                             | 7  |
| OBJETIVOS                                                                                             | 7  |
| MATERIAL Y MÉTODOS                                                                                    | 8  |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN                                                                                | 15 |
| CONCLUSIONES                                                                                          | 20 |
| AGRADECIMIENTOS                                                                                       | 21 |
| LITERATURA CITADA                                                                                     | 22 |

## LISTA DE CUADROS

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.1</b>                                                                                                                       | 25 |
| Aislamiento de <i>Salmonella sp</i> en camarón crudo congelado, proveniente de Culiacán, Sinaloa, México.                               |    |
| <b>Cuadro 1.2</b>                                                                                                                       | 25 |
| Pruebas Bioquímicas para la Identificación de <i>Samonella sp</i> en camarón crudo congelado, proveniente de Culiacán, Sinaloa, México. |    |
| <b>Cuadro 1.3</b>                                                                                                                       | 26 |
| Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en camarón crudo congelado, proveniente de Culiacán, Sinaloa, México.         |    |
| <b>Cuadro 2.1</b>                                                                                                                       | 26 |
| Aislamiento de <i>Samonella sp</i> en camarón crudo congelado, proveniente de Mazatlán, Sinaloa, México.                                |    |
| <b>Cuadro 2.2</b>                                                                                                                       | 27 |
| Pruebas Bioquímicas para la Identificación de <i>Samonella sp</i> en camarón crudo congelado, proveniente de Mazatlán, Sinaloa, México. |    |
| <b>Cuadro 2.3</b>                                                                                                                       | 27 |
| Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en camarón crudo congelado, proveniente de Mazatlán, Sinaloa, México.         |    |

## LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                            |    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1</b>  | Diagrama de flujo del proceso de camarón crudo, descabezado, congelado para exportación proveniente de altamar y bahía en Sinaloa, México. | 28 |
| <b>Figura 1</b> | Integridad del ADN en gel de agarosa al 1%                                                                                                 | 29 |
| <b>Figura 2</b> | Especificidad de <i>Salmonella sp</i> 25 ng/μl a 55°C                                                                                      | 29 |
| <b>Figura 3</b> | Especificidad de <i>Vibrio cholerae</i> O1 25 ng/μl a 58°C                                                                                 | 30 |
| <b>Figura 4</b> | Amplificación simultánea de <i>Vibrio cholerae</i> O1 (25 ng/ul y 7 ng/ul) y <i>Salmonella sp</i> (25 ng/ul) a 55°C                        | 30 |
| <b>Figura 5</b> | Secuencia genómica del gen <i>inv A</i> de <i>Salmonella sp</i>                                                                            | 31 |
| <b>Figura 6</b> | Secuencia genómica del gen <i>ctx AB</i> de <i>Vibrio cholerae</i> O1                                                                      | 32 |
| <b>Figura 7</b> | PCR a 58°C del gen <i>inv A</i> y RFLP con la enzima HhaI de <i>Salmonella sp</i>                                                          | 33 |
| <b>Figura 8</b> | PCR a 55°C del gen <i>ctx AB</i> y RFLP con ClaI de <i>Vibrio cholerae</i> O1                                                              | 33 |
| <b>Figura 9</b> | Amplificación simultánea de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y <i>Salmonella sp</i> a 55°C.                                                       | 34 |

## INTRODUCCIÓN

En México, uno de los principales problemas de salud pública está dado por las enfermedades gastroentéricas. Los datos en los últimos años indican que aproximadamente el 30% de los casos notificados en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Obligatorio, corresponde a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). De acuerdo a su etiología, las enfermedades entéricas de origen bacteriano ocuparon el primer lugar con un 54.79 % y 47.91% en los periodos 1986-1990 y 1994-1997, respectivamente. (SIRVE-ETA 1995; SIRVE-ETA 1998; SEMARNAP 1999)

Existen diversos métodos de eliminación de los microbios de estos productos, desde lavados con agua, a enjuagues con agua clorada. Sin embargo, la detección de microorganismos está relegada a los métodos tradicionales de tomas de muestras y cultivo de los microorganismos, cosa que puede durar varios días y tiene un costo relativamente alto.

Evidentemente, esto significa un retraso en tiempo y por lo tanto una pérdida económica importante para la empresa, sobre todo para aquellas que se dedican a la exportación; por lo que la industria necesita de métodos rápidos de detección de microorganismos. (SIRVE-ETA 1998; SEMARNAP 1999)

Por su implicación en la salud pública, *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 se encuentran entre los principales microorganismos patógenos como indicadores de inocuidad, en productos de exportación como el camarón. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo para la detección simultánea de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 utilizando una técnica rápida, específica y sensible como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1.1. Situación Sanitaria en México por el consumo de Camarón

El consumo de carne en México continúa siendo un factor constante en la dieta de un buen porcentaje de la población, la cual preserva hábitos de preferencia por las carnes y otros alimentos. La comercialización y consumo de los productos que provienen de la actividad pesquera, constituyen la fase última del circuito productivo del sector. Las estadísticas sobre el mercado nacional hacen referencia a tres variables principales: disponibilidad de productos pesqueros en sus diferentes formas de presentación, consumo (aparente y per cápita) y precios a los que fueron ofrecidos en el mercado. En México el consumo de productos pesqueros en 1997 fue de 1,227,919 toneladas (100 %), de las cuales 36,857 toneladas (5.66 %) fueron de consumo de camarón (SIRVE-ETA 1998; SEMARNAP 1999).

La contaminación del camarón por diversos microorganismos patógenos hace que se convierta en una fuente importante de las llamadas ETA. Entre los microorganismos más importantes de identificar están: *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 por su implicación en la salud pública debido a los brotes que se han generado por la comercialización del producto (SIRVE-ETA 1998; SEMARNAP 1999; INPPAZ).

En una revisión de los brotes de ETA, cuya transmisión tiene relación directa con el agua o con el alimento, fueron notificados a la Dirección General de Epidemiología durante el periodo 1981 a 1990, los siguientes datos: se registraron 393 brotes con un promedio anual de 39, la etiología se logró precisar en el 79% de los casos y los brotes de origen bacteriano ocuparon el primer lugar (42%) del total de las notificaciones (OPS/OMS/SSA 1993).

Para el control de la contaminación microbiana, la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP, actualmente SEMARNAT), a través de la Subsecretaría de Pesca, se encarga en México de realizar acciones específicas en el "Programa de Pesca y Acuicultura 1995-2000", con el subprograma establecido de "Calidad Sanitaria en la Industria Pesquera" el cual tiene como objetivo principal apoyar y orientar a la industria en el cumplimiento de la normatividad y, dadas las características de los productos pesqueros, se ha dado mayor importancia a las normas sanitarias. Las normas que marcan lineamientos sanitarios específicos para el procesamiento de los productos pesqueros son la NOM-120 "Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas" y la NOM-128 que establece "la aplicación de un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la planta industrial

procesadora de productos de la pesca". La instrumentación del subprograma se enfoca principalmente a la difusión de las Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad, así como a la implantación del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (SIRVE-ETA 1998; SEMARNAP 1999; NOM 1994; SSA; Giono 1993).

La prevención de la contaminación de estos productos está comenzando a tener éxito gracias a la implantación del Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (HACCP) que muchas empresas llevan a cabo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.2 Características, aislamiento e identificación de *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* O1

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos (1-2  $\mu\text{m}$ ), móviles, Gram negativos y no esporulados. Las salmonelas son anaerobios facultativos, caracterizados bioquímicamente porque fermentan la glucosa, con producción de ácido y gas, y no fermentan la lactosa y la sacarosa. Son relativamente termosensibles pues se destruyen a 60°C en 15 a 20 minutos y no crecen por debajo de los 5°C. Soportan un pH entre 4.5 y 9, con óptimo de 6.5 a 7.5 (Hayes 1993; Giono 1993).

El género *Vibrio* son bacilos Gram negativos que miden de 0.5 $\mu\text{m}$  a 0.8 $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.4 a 2.6 $\mu\text{m}$  de largo. Son anaerobios facultativos capaces de fermentar la D-glucosa dando como resultado producción de ácido pero no de gas. Adicionalmente, utilizan D-fructuosa, maltosa y glicerol. La mayoría de las especies son oxidasa positiva y todos crecen a 20°C aunque muchas a 30°C. No forman endoesporas, no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, todos son quimiorganotrofos (Hayes 1993; Giono 1993; Giono 1991 ). Se encuentran en hábitats acuáticos de una gran variedad de salinidad. Son comunes en ambientes marinos, algunas especies se encuentran sobre la superficie y en el contenido intestinal de animales marinos. Son susceptibles a la desecación, la ebullición, el cloro y a las tetraciclinas.

Las etapas a seguir en el laboratorio para llevar a cabo el diagnóstico de los microorganismos son:

### 1. Preenriquecimiento

En esta etapa se siembra una muestra de los alimentos en medios que contienen nutrientes suficientes para permitir el crecimiento del mayor número posible de microorganismos.

### 2. Aislamiento por medios selectivos

Son medios nutritivos que contienen agentes selectivos, como antibióticos, colorantes o productos químicos que suprimen el crecimiento de muchos microorganismos pero permiten el crecimiento de los organismos seleccionados.

### 3. Identificación bioquímica y serológica

Son pruebas confirmatorias que nos permiten comprobar la pureza del cultivo y una vez obtenida la cepa pura se procede a su serotipificación.(Giono 1993; Giono 1991)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **1.3 Comercialización del Camarón**

De acuerdo a las estadísticas realizadas por la SEMARNAT, en el año de 1997 el volumen de exportación de camarón fue de 36,898 toneladas, generando la mayor ganancia económica en productos pesqueros. Actualmente este producto se ha visto afectado principalmente por:

- La pesca indiscriminada y mal controlada en aguas marinas y de los sistemas lagunarios estuarios, marismas y bahías, ya que las épocas y zonas de veda no son respetadas por los pescadores.
- La contaminación ambiental por residuos peligrosos (Biológico infecciosos).
- La falta de capacitación del personal que labora en las empacadoras para prevenir el riesgo de la contaminación del producto al procesarlo.

Ante tales causas mismas para las que se han tomado algunas medidas de control y fomento sanitario, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario para Protección Ambiental establece mediante las normas, los límites máximos permisibles de contaminantes y las especificaciones sanitarias para la inocuidad del producto.

Además se han desarrollado cursos de capacitación y formación del personal que trabaja en el embalaje de alimentos en empacadoras de camarón. Todas estas acciones han estado encaminadas a obtener una mejoría en la higiene y sanidad del camarón (SIRVE-ETA 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 1.4. Utilización de PCR para la detección de Microorganismos

Se han desarrollado métodos moleculares rápidos como herramientas de diagnóstico para la detección de microorganismos a partir de muestras de tejidos, tales como la hibridación con sondas genéticas, análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Smith 1998; Junqueira 1997).

La PCR (del inglés: Polymerase Chain Reaction) puede superar la sensibilidad obtenida con las sondas de ADN, ya que los iniciadores o pequeñas sondas, de aproximadamente 20 nucleótidos, utilizadas en esta técnica son capaces de hibridar a los extremos de la secuencia específica de ADN del microorganismo que se desea identificar y la enzima Taq-polimerasa amplifica dicha secuencia de una manera exponencial a partir de las muestras de los tejidos afectados (Smith 1998; Junqueira 1997).

El método consiste en la 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. La enzima Taq-polimerasa, en presencia de iones de  $Mg^{++}$  extiende el extremo 3' de cada iniciador, utilizando la secuencia de ADN blanco como molde para polimerizar los nucleótidos complementarios a dicha secuencia. 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: desnaturalización de la doble cadena de ADN, hibridación de los iniciadores a los extremos del fragmento de ADN y la extensión de éstos iniciadores sobre el ADN molde por polimerasa termoestable.

Lo anterior da como resultando la acumulación exponencial del fragmento específico cuya dimensión está definida por los finales 5' de los iniciadores, ya que el producto de extensión sintetizado en un ciclo sirve como molde en el siguiente ciclo, de manera que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo. Así, 20 ciclos de PCR resulta en una amplificación de un millón de veces.

Tres ventajas principales de la técnica de PCR son la sensibilidad, la especificidad y la rapidez de la prueba. La selección de iniciadores que amplifiquen secuencias de ADN de genes responsables de codificar factores de virulencia o toxinas permite identificar únicamente aquellos organismos potencialmente patógenos. Además pequeñas concentraciones de ADN blanco, correspondientes a bajos números de células bacterianas pueden ser detectadas en un corto tiempo (Erlich 1992; Harris 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **HIPÓTESIS**

La PCR puede ser una técnica de diagnóstico más rápida, específica y de alta sensibilidad para detectar simultáneamente *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo descabezado congelado para exportación, comparada con los métodos bacteriológicos tradicionales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un sistema rápido, específico y de alta sensibilidad para detectar simultáneamente *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo descabezado congelado para exportación; así como comparar el tiempo y los resultados obtenidos con los métodos bacteriológicos oficiales.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Definir un protocolo para la identificación de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 mediante la técnica de PCR y de RFLP.
- ❖ Definir un protocolo para la identificación simultánea de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo descabezado congelado para exportación.
- ❖ Comparar los métodos microbiológicos oficiales para la determinación de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 contra los métodos de biología molecular.
- ❖ Detectar en 60 muestras la existencia de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo descabezado congelado para exportación.

TRFCS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio estuvo constituido por dos etapas:

### PRIMERA ETAPA: Laboratorio de experimentación

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 de ambos microorganismos.

Se determinaron las condiciones de ciclos, tiempos y temperaturas para la técnica de PCR, empleando ADN purificado, para la replicación simultánea de: *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1. Posteriormente se confirmó su efectividad mediante la utilización de muestras contaminadas en forma artificial con inóculos conocidos (una colonia) de las cepas patógenas. Se emplearon controles negativos y se verificaron los resultados con los métodos microbiológicos oficiales.

### 1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

#### a) Técnica de minipreparación de ADN genómico

Para la extracción de ADN se utilizaron cultivos de cepas puras de las bacterias de interés, se sembraron y después se aislaron. De las colonias obtenidas una fue depositada en 10 ml de caldo Luria (LB), centrifugándose 12 minutos a 3,400 rpm, se decantó el sobrenadante y al precipitado le fueron adicionados 500 µl de solución de lisis (8% de sacarosa, 5% de tritón X-100, 50 mM EDTA y 50 mM tris - HCl pH 8). Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, luego fue agregada lisozima [1.5 mg/ml] y se incubó 20 minutos también a temperatura ambiente; consecutivamente se hirvió durante un minuto en baño maría y se dejó enfriar un minuto. Después fue adicionada la RNAsa [15 µg/ml] incubándose una hora a 37 °C, para enseguida adicionar NaCl 5 M [2 M final]; se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos recuperándose el sobrenadante, el cual fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó durante 2 horas a - 20 °C. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, se decantó y se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70 % ( $\cong$  100 µl); nuevamente fue centrifugado a 12,000 rpm, durante 5 minutos, se secó la pastilla en centrifuga de vacío y se resuspendió en agua estéril ( $\cong$  50 µl). Por último fue verificada la integridad de ADN en un gel de agarosa al 1 %, donde se observó una

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

banda única, nítida y de peso molecular alto (más de 8454 pb), y se cuantificaron los nanogramos obtenidos en el fluorómetro, mediante la relación concentración-índice de transmitancia, que realiza automáticamente dicho aparato (Ver Figura 1) (Silhavy et al. 1984 modificado por el Dr. Rogelio Alonso del Laboratorio de Genética Molecular FMVZ-UNAM).

Con este protocolo de extracción, el tiempo consumido fue de 3 horas, por lo que se realizó la extracción de ADN genómico en crudo, logrando un tiempo de 1 hora; este último protocolo fue el de Sánchez (2000).

#### **b) Extracción de ADN genómico en crudo.**

Para la extracción de ADN en crudo, se sembraron cepas puras de las bacterias: *Vibrio cholerae* O1 en agar T1N1 y, *Salmonella sp* en agar sangre y agar para *Salmonella sp*. Después de 24 horas, se obtuvieron varias colonias; se tomó una colonia y fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 100 µl de buffer D que contenía KCL 50mM, Tris HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NP 40 0.45 % y Tween al 0.45% con Proteinasa K a una concentración de 8 mg/ml. Se incubó la muestra durante una hora a 50°C, y se inactivó la enzima al incubar la muestra a 90°C durante 10 minutos; posteriormente se tomaron 1.5 µl para la técnica de PCR (Sánchez 2000; Roberger 1997).

#### **c) Técnica de PCR**

Se utilizaron iniciadores ya probados para la amplificación del gen *inv A* de *Salmonella sp* (Galán, 1989) y del gen *ctx AB* (Mekalanos 1983), los cuales fueron ensayados juntos en una PCR combinada o múltiple.

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.

Posteriormente al realizar la extracción de ADN genómico en crudo ya no es necesario llevar a cabo la cuantificación del ADN.

El gen *inv A*, específico del género *Salmonella*, es el que permite que la bacteria penetre en las células epiteliales del intestino del hospedero (Galán 1989; Galán 1991). Para la amplificación del gen *inv A* de *Salmonella sp* (Kimura 1999, Sarawut 1995 y Rahn 1992) se emplearon los iniciadores que se presentan en el cuadro siguiente.

| Gen amplificado | Tamaño del producto de PCR (pb). | Designación del iniciador | Secuencia del iniciador                                                                 |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>inv A</i>    | 285                              | INVA1<br>INVA2            | 5' - gTg AAA TTA TCg CCA CgT TCg ggC AA - 3'<br>5' - TCA TCg CAC CgT CAA Agg AAC C - 3' |

Las condiciones de temperatura y ciclos en el termociclador, son de 1 ciclo para la desnaturalización a 94°C por 5 minutos; de 30 ciclos para el alineamiento a 94°C por 30 segundos, 53°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 1 ciclo a 72°C por 5 minutos (Sarawut 1995; Ranh 1992).

Para *Vibrio cholerae* O1 se utilizaron los iniciadores del gen *ctx AB* (Koch 1993, Shirai 1991, Fields 1992), el cual promueve la producción de la toxina colérica que actúa sobre la mucosa del intestino delgado, provocando la diarrea característica de la enfermedad. Este gen es una proteína compuesta de una subunidad A y cinco subunidades B, responsables de la fijación de la toxina al receptor. La subunidad B se une al receptor GM<sub>1</sub> en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. Por su parte la subunidad A es responsable de la activación del adenilato ciclase provocando la hipersecreción de sales y agua (Mekalanos et al 1983, Finkelstein).

| Gen amplificado | Tamaño del producto de PCR (pb). | Designación del iniciador | Secuencia del iniciador                                                       |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ctx AB</i>   | 777                              | VIBRIO P1<br>VIBRIO P3    | 5' - TgA AAT AAA gCA gTC Agg Tg - 3'<br>5' - ggT ATT CTg CAC ACA AAT CAg - 3' |

Estos juegos de iniciadores fueron ensayados juntos para lograr una reacción combinada o multiplex, con la posibilidad de detectar el ADN de cualquiera de los microorganismos mencionados, a partir de una reacción única con la técnica de PCR. Esto puede ser posible debido a que los productos del PCR esperados, para cada microorganismo, tienen tamaños moleculares diferentes (pares de bases / pb). El número de ciclos, las temperaturas y los tiempos, para la reacción en el termociclador, se ajustaron de tal manera que los iniciadores de *Salmonella sp* y los de *Vibrio cholerae* O1 pudieron funcionar en la misma reacción y en un solo microtubo; estandarizando así la amplificación en un lapso de 28 horas (24 horas de preenriquecimiento y 4 horas para la PCR).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 18.25  $\mu$ l, con los siguientes reactivos: Solución amortiguadora de PCR (1.0 mM Tris-Cl, 1.5 mM  $MgCl_2$  y 50 mM KCl, pH 8.3), 100  $\mu$ M de cada dNTP, 1.4 pM de cada iniciador, 2 U de Taq- polimerasa (Boheringer Mannheim), 1  $\mu$ g de ADN y agua estéril (Sánchez, 2000).

#### d) Electroforesis en Gel de Agarosa

Para observar los productos resultantes de la PCR, se elaboraron geles de agarosa al 2 % en una solución de TBE al 0.5x. Se disolvieron 2 g de agarosa NuSieve en 100 ml de buffer TBE 0.5% y con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio, se vertió el gel en el molde de la cámara de electroforesis y se colocaron los peines, ya solidificado se retiraron los peines y se agregó buffer TBE 0.5% hasta que superasara un poco el nivel del gel.

#### e) Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

Para confirmar si el producto de amplificación es el esperado, se digiere con una enzima específica que reconoce una secuencia de nucleótidos específica dentro del gen amplificado de cada microorganismo. Para identificar las enzimas específicas para cada gen se revisó el paquete de Análisis de Secuencia GCG de la Universidad de Wisconsin, E.U.A., a la cual está suscrito el Instituto de Biomédicas de la UNAM.

Se tomó en cuenta que estas enzimas no realizaran más de dos cortes para tener una adecuada lectura y que no fueran homólogas entre las secuencias genómicas de *Salmonella sp* y las de *Vibrio cholerae* O1 (Smith y Wood, 1998).

En *Salmonella sp* la amplificación del gen *invA* se digirió con la enzima **Hha I**, esta enzima reconoce en la secuencia las siguientes cuatro pares de bases 5'-GCG ↓ C-3'. Para el caso de *Vibrio cholerae* O1, el producto de amplificación del gen **ctx AB** fue digerido por la enzima **Cla I**, esta enzima corta cuando reconoce de 5'-AT ↓ CGAT-3'.

Para el análisis de la restricción se tomaron 8.5  $\mu$ l de muestra de PCR, se le adicionaron 0.5  $\mu$ l de enzima y 1  $\mu$ l de buffer; posteriormente se homogeneizó y se dejó a 37°C durante una hora, el corte se observó en un gel de agarosa al 3% (Sánchez, 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

### a) Técnica de cultivo microbiológico

La detección microbiológica mediante cultivo para *Salmonella sp.*, se realizó conforme lo señala la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Se tomaron 25 g de cada muestra y se maceraron en un mortero en condiciones de esterilidad, luego se depositaron en 225 ml de agua peptonada (proporción 1:9), incubándose 24 horas a 37°C. Posteriormente se tomó 1 ml, del líquido bien homogeneizado y se depositó en 9 ml de caldo tetratónico; enseguida se tomó un segundo mililitro y se depositó en nueve mililitros de caldo selenito-cistina, dejándose incubar nuevamente en los medios durante 24 horas a 37°C.

Para la identificación de *Salmonella sp.*, transcurrido el tiempo se procedió a sembrar en los medios: agar Hektoen y en agar xilosina-lisina desoxicolato (XLD); siendo incubados durante el mismo lapso e iguales condiciones de temperatura que para los medios líquidos (NOM-114-SSA).

A las muestras sospechosas, esto es, cuando se observaron colonias de color negro en agar Hektoen y XLD se les realizaron pruebas bioquímicas, en agar triple-azúcar-hierro (TSI) y agar lisina-hierro (LIA) cuyos resultados fueron observados luego de 24 horas.

El método de prueba microbiológico para *Vibrio cholerae* O1, se realizó conforme a lo establecido en la publicación técnica del INDRE No 10 y De la Rosa (1995) (Giono 1991; De la Rosa 1995).

Para *V. cholerae* O1 se tomaron también 25 g de muestra y ésta se maceró en un mortero en condiciones de esterilidad, se depositó después en 225 ml de agua peptonada alcalina (APW en una proporción de 1:9), incubándose durante 24 horas a 37°C. Posteriormente para su identificación, se procedió a sembrar en agar TINI y caldo Triptona, siendo incubada durante el mismo lapso e iguales condiciones de temperatura que en el APW.

A las colonias sospechosas se les realizaron las siguientes pruebas rápidas: string, oxidasa y por último, a aquellas muestras que resultaron positivas, se les aplicaron pruebas serológicas.

## **SEGUNDA ETAPA: Estudio de campo**

### **a) Ubicación de espacio y tiempo**

En el presente trabajo, las muestras se obtuvieron de 2 empacadoras de camarón crudo descabezado y congelado destinado a exportación, localizadas en Culiacán y Mazatlán, Sinaloa, México, próximas al Litoral del Pacífico Noroeste; en el mes de octubre de 1999.

### **b) Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión, para la selección de las plantas camaroneras fueron:

- a) Que la planta estuviera certificada para exportación
- b) Que tuviera una capacidad de producción entre 2 y 20 toneladas por semana
- c) Que la denominación del producto para su presentación comercial fuera: "camarón crudo, descabezado y congelado" (Diagrama de flujo, Anexo 1).
- d) Que el proceso estuviera sujeto a un control sanitario regular (ICMSF 1999; Wachter 1998)
- e) Que la procedencia del producto fuera de zonas marítimas de producción (bahía o altamar) del Litoral Pacífico Noroeste de México.

### **c) Universo de trabajo y población sujeta a estudio**

Estuvo conformado por las plantas camaroneras que participaron por invitación, cuyos lotes de producción (considerados la  $N$ =Población de la muestra) estuvieron constituidos por las cajas "master" (unidades muestrales) que contienen cada una, 10 marquetas de camarón, de 5 Lb 8 Oz (2.27 kg) (sub-unidades muestrales) cada marqueta (SSA 1992).

### **d) Tamaño y toma de la muestra**

Para obtener una muestra representativa del lote en cada empacadora, se verificaron las condiciones sanitarias del establecimiento y las prácticas de manipulación higiénica realizadas por el personal durante el proceso. Como resultado, se consideró que el proceso estuvo sujeto a un control sanitario regular, lo que nos permitió determinar el tamaño de la muestra por lote y por planta; un mínimo de 5 marquetas y un máximo de 10.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se identificó el lote de producción sujeto de estudio, se enumeraron las unidades que lo constituían (cajas "master") y, con la tabla de números aleatorios, se seleccionaron al azar las unidades muestrales. Así, de cada caja "master" fue tomada una marqueta de 5 Lb 8 Oz, obteniendo un total de 5 marquetas por lote y por empacadora.

De cada marqueta de 5Lb 8 Oz considerando la distribución heterogénea de las bacterias, se realizaron 3 análisis bacteriológicos (muestras analíticas) para la búsqueda de *Salmonella* sp y 3 para la búsqueda de *Vibrio cholerae* O1; las cuales fueron analizadas por la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (ICMSF 1999; Wachter 1998).

Por lo tanto, los resultados que se obtuvieron a partir del tamaño de la muestra, para los géneros de bacterias patógenas que se buscaban en el estudio, se consideran significativos de acuerdo con los criterios establecidos por la ICMSF (International Commission Microbiological Specifications for Foods) (ICMSF 1999; Wachter 1998).

Los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras, para los análisis microbiológicos del camarón, se realizaron de acuerdo con lo establecido en el Manual para alimentos, así denominado, elaborado por el Laboratorio Nacional de Salud Pública, de Referencia y publicado por la Secretaría de Salud (SSA 1992).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Laboratorio de experimentación.

La complejidad en la composición química de los alimentos (grasa, sangre, etc.) interfiere con los métodos analíticos, por lo que frecuentemente nos lleva a utilizar tratamientos selectivos o modificaciones en las técnicas de extracción de ADN a fin de obtener resultados confiables. Al analizar dos tipos de extracción de ADN se observó que ambos eran confiables, sin embargo el tiempo consumido por la técnica de Silhavy fue de 3 horas, por lo que se realizó la extracción de ADN genómico en crudo (Sánchez, 2000), logrando un tiempo de 1 hora. En ambos protocolos el medio de preenriquecimiento no afectó a la PCR. (Figura 1)

La técnica de PCR es un método preciso capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN del microorganismo específico, lo que la hace una prueba de elección en la industria de los alimentos.

### Técnica de PCR.

De acuerdo con lo señalado en el apartado de Material y Métodos, donde se indica que al realizar la extracción Silhavy para ADN, se cuantificó y se obtuvieron concentraciones de 25ng/μl (concentración utilizada para todas las reacciones), lo que se observó fue un ligero barrido en el carril. Además el tiempo consumido fue mayor, ya que se tuvo que cuantificar el ADN. Al realizar la extracción en crudo, el barrido en el carril no se observa, se ve una banda bastante nítida y, como se menciona anteriormente, se disminuye el tiempo de diagnóstico (Figura 2, 3 y 4).

### Sensibilidad y Especificidad del PCR.

La sensibilidad de la prueba ya ha sido evaluada por otros investigadores usando cultivo puro de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1, y cultivo de camarón preenriquecido en agua peptonada (AP) y agua peptonada alcalina (APW). El poder detectar bajos niveles de inoculación (1 colonia) en el camarón nos indica que es una prueba altamente sensible. En el caso de *Salmonella sp* se han obtenido resultados positivos a una concentración de  $10^3 - 10^4$  UFC, y en el caso de *Vibrio cholerae* O1 detecta 10 a 100 UFC/g de muestra; la técnica de PCR es por consiguiente más sensible que otros métodos rápidos como ELISA, inmunofluorescencia e hibridación del ADN (Shirai, 1991, Simonson, 1991 y Chen 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para este estudio un factor importante que se evaluó es la especificidad de las secuencias genómicas seleccionadas de ambos microorganismos, debido a que diferentes especies bacterianas han sido reportadas como poseedoras de la toxina o la proteína causante de la enfermedad. Rahn y colaboradores (1992) tuvieron éxito amplificando el gen *inv A* en 626 *Salmonellas* diferentes por la técnica de PCR, al igual que Chen y colaboradores (1997) tuvieron éxito amplificando este gen con 164 especies diferentes de *Salmonella*. En este estudio se probaron los iniciadores con otras bacterias como *E.coli*, *Yersinia sp*, *Shigella sp*, y *Vibrio cholerae* O1 dando un resultado negativo en todos los casos, indicando con ello la especificidad del PCR (Figura 2).

En relación a *Vibrio cholerae* O1, frecuentemente es aislado con otras especies de *Vibrio*, incluyendo *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. Una porción de la secuencia del gen *ctx AB* es homóloga en un 75 a 77% al gen *elt AB* de *Escherichia coli*. Para evitar esto Koch y colaboradores examinaron toda la secuencia genómica publicada en la base de datos del GeneBank-EMBL para comprobar la homología de los iniciadores, y como resultando propusieron el uso de un tercer iniciador (P3), el cual permite una mayor especificidad para *Vibrio cholerae* O1 y elimina la amplificación de fragmentos no específicos de *E. Coli*; a los iniciadores se les probó con otras bacterias, tales como: *E.coli*, *Yersinia sp*, *Shigella sp*, *Staphylococcus sp* y *Salmonella sp*, siendo negativa la amplificación en todos los casos y positiva a *Vibrio cholerae* O1 con lo que se confirmó la especificidad de la prueba. Por lo anterior es importante seleccionar cuidadosamente los iniciadores (Figura 3 y 4).

### Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

Se realizó un corte con una enzima de restricción (RFLP) para identificar los genes digiriendo el ADN con una endonucleasa que reconoce secuencias específicas en el ADN, que da lugar a fragmentos de tamaños diferentes obteniendo así un resultado seguro (Mekalanos 1983; Gorodezky 2000).

Así, para *Salmonella sp*, el producto de amplificación con un tamaño de 285 pb del gen *invA*, después de ser digerido por la enzima *Hha 1*, mostró dos bandas, una de 223 pb y otra de 62 pb, y para *Vibrio cholerae* O1, el producto de amplificación del gen *ctx AB* con un tamaño de 777 pb; después de ser digerido por la enzima *Cla 1*, se observaron dos bandas, una de 240 pb y otra de 537 pb (Ver Figura 5, 6, 7 y 8) (NCBI).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Condiciones para la amplificación simultánea en PCR con *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1

Los iniciadores seleccionados para la detección del gen *Inv A* para *Salmonella sp* y el gen *ctxAB* para *Vibrio cholerae* O1, fueron ensayados conjuntamente en una reacción de PCR con la posibilidad de detectar el ADN de los microorganismos.

Las condiciones de temperatura y ciclos, para que se lleve a cabo la reacción en el termociclador, son: De 1 ciclo, para la desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos para una alineación a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Acorde con lo señalado en el apartado de Material y Métodos, se verificó que los productos de PCR obtenidos, efectivamente correspondieron con los tamaños esperados en pares de bases; es decir, 284pb de la amplificación del gen *Inv A* de *Salmonella sp* y 777 pb del gen *ctx AB* de *Vibrio cholerae* O1 comparándolos con el marcador de peso molecular de 50 pb de GibcoBRL.

La metodología desarrollada en éste estudio, permitió la amplificación simultánea de fragmentos de ADN provenientes de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 (Figura 9).

### Rapidez de la prueba

Al diagnosticar *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1, se logró amplificar ambas en una sola reacción a 55°C en un lapso de 28 horas (24 horas de preenriquecimiento y 4 para la PCR), mientras que por el Método Microbiológico Oficial se requiere de un periodo de una semana. Esto es una ventaja importante del PCR sobre los Métodos Microbiológicos ya que al disminuir el tiempo de la obtención de resultados las pérdidas económicas serían menores.

### Análisis bacteriológico de las muestras de campo

A partir de las muestras de campo seleccionadas al azar, un total de 5 marquetas por lote y por empacadora, siendo analizadas mediante los métodos bacteriológicos, los resultados obtenidos en las marquetas de Culiacán, Sinaloa para *Salmonella sp* y para *Vibrio cholerae* O1 fueron:

De los aislamientos realizados se seleccionaron en total quince colonias sospechosas a *Samonella sp*. A estas colonias se les realizaron las pruebas bioquímicas para su identificación (Cuadro 1.1 y 1.2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las colonias aisladas resultaron negativas a *Salmonella sp.*, sin embargo, fueron positivas a otros coliformes, principalmente del género *Proteus sp.*, el cual es importante como indicador de contaminación fecal, pudiendo ocasionar toxoinfecciones alimentarias. Esto sugiere que no son muy estrictos en las buenas prácticas de higiene en el manejo y empacado del camarón (Hayes, 1993).

Para *Vibrio cholerae* O1 se observó que de las cinco marquetas, se aislaron veintidos (100%) colonias sospechosas a *Vibrio sp.* del medio TCBS. A estas colonias sospechosas, se les realizaron pruebas bioquímicas (TIN1, Triptona, Oxidasa, String) encontrando que nueve (41%) fueron *Vibrio sp.* Sin embargo, al realizar la serotipificación para *Vibrio cholerae* O1, fueron negativas. Cabe mencionar que de la maqueta número uno no hubo crecimiento de colonias en el medio TCBS (Cuadro 1.2).

Con la presencia de *Vibrio sp.* podemos interpretar de forma indirecta el posible riesgo potencial para la salud ya que es indicativo de que en cualquier momento el producto puede quedar expuesto a la contaminación con *Vibrio Cholerae* O1; este puede sobrevivir por largo tiempo en estado de congelación a temperaturas por debajo de 20°C, solo inhibe su crecimiento, pero no los elimina.

De las muestras tomadas en Mazatlán, Sinaloa para *Salmonella sp.* los resultados obtenidos fueron:

Se aislaron cuatro colonias sospechosas a *Samonella sp.*, a estas colonias aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas para identificar la especie bacteriana obteniendo resultados negativos (Cuadro 2.1).

En el Cuadro 2.2, se puede apreciar que de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias sospechosas en las marquetas número dos y tres fueron negativas a *Salmonella sp.* No obstante, de la maqueta número cuatro se aisló una colonia sospechosa a *Salmonella sp.*, que al realizarle la serotipificación resultó negativa.

Los resultados fueron positivos para otros coliformes principalmente *Acinetobacter sp.* Es una bacteria aerobia inmóvil y es un agente importante alterante de la carne de mariscos y aves (Hayes, 1993).

En las muestras utilizadas para la detección de *Vibrio* se puede observar que de las quince siembras realizadas en TCBS, se aislaron un total de veinticuatro (100%) colonias sospechosas a *Vibrio sp.* Al realizarles las pruebas bioquímicas (TIN1, Triptona, Oxidasa y String), para la identificación de *Vibrio sp.*, diecinueve (79%) colonias fueron positivas. Sin embargo, al realizar la serotipificación, para la confirmación de *Vibrio cholerae* O1, fueron negativas.

### **Análisis de las muestras de campo por PCR**

Después de realizar la extracción de ADN de las muestras de campo, se llevó a cabo la PCR múltiple por duplicado en donde no hubo amplificación de los fragmentos para *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1, coincidiendo éstos resultados con los obtenidos por los métodos microbiológicos oficiales.

La metodología desarrollada en este estudio, permitió la amplificación simultánea de fragmentos de ADN provenientes de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIÓN

Se logró establecer el protocolo de diagnóstico para la detección simultánea de *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* O1, mediante la técnica de PCR y de RFLP.

Con los resultados obtenidos, a partir de los métodos microbiológicos oficiales y por la técnica de PCR, se confirma la sensibilidad, especificidad y rapidez de esta prueba, al utilizarse en alimentos, para confirmar su inocuidad bacteriológica con respecto a *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* O1, aplicada al camarón.

Se considera relevante la utilidad que la PCR representa para seleccionar productos sujetos a exportación que estén contaminados y, de esta manera disminuir un riesgo para la salud.

La PCR es un método confiable ya que los resultados obtenidos fueron corroborados con los métodos microbiológicos oficiales pudiendo concluir así que es una técnica de diagnóstico para *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* O1 en camarón.

Además, se confirma la eficacia del Sistema de Análisis de Riesgos en Puntos Críticos de Control, llevado a cabo en las plantas camaroneras certificadas para exportación y cuyo objetivo fundamental es garantizar la inocuidad, en este caso bacteriológico del camarón crudo, descabezado, congelado para exportación.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente proyecto fue financiado por el Organismo Internacional de la Energía Atómica (AIEA) Viena, Austria, cuyo responsable es el MVZ MCV José Fernando Núñez Espinosa.

De manera muy especial se agradece a la QFB. Mireya Nicoli Tolosa de la FMVZ en el departamento de Medicina Preventiva, a la Dra. María de la Salud Rubio Lozano por todo su apoyo, al Dr. Daniel Villagómez Zavala por la capacitación de la técnica de PCR en el Centro de Biotecnología Animal del CUCBA-UDG y al Dr. Sergio Sánchez Esquivel de Biomédicas del departamento de Biotecnología, por su valiosa colaboración para la realización de este proyecto.

Agradezco enormemente el apoyo de todo el jurado de tesis, que sin su apoyo y confianza no hubiese sido posible el logro de esta meta.

Dra. María de la Salud Rubio Lozano

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Dr. Fernando Núñez Espinosa

Dr. Daniel Villagómez Espinosa

Dr. Víctor Bustamante Santillán

No es mi deseo omitir en este agradecimiento a ninguna persona, por lo que agradezco a todos aquellos que de alguna manera me apoyaron para el logro de esta meta.

## LITERATURA CITADA

1. Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. México (DF):SIRVE-ETA, 1995.
2. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Anuario Estadístico de Pesca. México (DF):SIRVE-ETA, 1998.
3. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. El papel de SEMARNAP en la inocuidad de los alimentos. México (DF):PARTENARIAT, 1999.
4. [http://www.inppaz.org.ar/menupal/INFTEC/FOS/VE\\_ETA/BOLETI95HTM](http://www.inppaz.org.ar/menupal/INFTEC/FOS/VE_ETA/BOLETI95HTM)
5. Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994 Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas. México (DF):1996.
6. <http://www.ssa.gob.mx/mx/dirucsbs/>
7. Giono CS, Escobar GA, Valdespino GJ. Diagnóstico de laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. México:INDRE, 1993.
8. Hayes PR. Microbiología e Higiene de los Alimentos. España: Acribia, 1993.
9. Giono S, Gutiérrez L, Hinojosa A. Publicación técnica del INDRE número 10. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. México (DF):INDRE, 1991.
10. Smith CA, Wood EJ. Biología Molecular y Biotecnología. Delaware, EUA:Addison-Wesley, 1998.
11. Junqueira LC, Carneiro J. Biología Celular y Molecular. 6a ed. Santiago, Chile:McGraw-Hill, 1997.
12. Erlich HA. PCR Technology principles and applications for DNA amplification. USA:Oxford University press, 1992
13. Harris LJ, Griffiths MW. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction. Food Research Int. 1992;25:457-459.
14. Silhavy T, Berman M, Enquist L. Experiments with Gene Fusions. USA:Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
15. Sánchez ChDR. Comportamiento productivo de líneas genéticas terminales de cerdo con especial referencia en el gen halotano. Tesis de Maestría. Jalisco (Guadalajara) México. Univ. Guadalajara, 2000.
16. Roberger C, Pommier S, Houde A. Rapid DNA Purification for Hal Gene PCR Diagnosis in Porcine Tissues and Extension to Other Meat Species. Meat Science 1997;45(1):17-22.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

17. Kimura B, Kawasaki S, Fujii T, Kusonoki J, Itoh T, Flood S. Evaluation a TaqMan Assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. *Journal of food protection*. 1999;62(4):329-335.
18. Sarawut J, Tassanakajon A, et al. A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 1995;9:375-382.
19. Rahn K, Grandis S, et al. Amplification of an *inv A* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 1992;6:271-279.
20. Galán JE, Curtiss IIR. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1989;86:6383-6387.
21. Galán JE, Curtiss IIR. Distribution of the *invA*, -B, -C and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *inv A* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and Immunity*. 1991;59:2901-2908.
22. Koch W, Payne W, Wentz B, Cebula T. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(2):556-60.
23. Shirai H, Nishibuchi M, Ramarmurth E, Bhattacharya SK, Pail SC, Takeda Y. PCR for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol* 1991;29:2517-2521.
24. Fields P, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin America cholera epidemic. *Journal of clinical microbiology*. 1992;2118-2121.
25. Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GDN. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature*. 1983;306:551-557.
26. Finkelstein RA. Cholera enterotoxin (choleragen) a historical perspectives. In: *Current topics in infectious disease: Cholera*. III (ed). London: Plenum Med B Co.
27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> National Center for Biotechnology Information (NCBI)
28. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México (DF):1995.
29. De la Rosa GR, Núñez EJ, Nicolli TL. Aislamiento de *Vibrio sp* en pescado fresco del mercado de La Viga en México, D.F. *Veterinaria México* 1995;26:45-50.
30. 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.
31. Wachter RC. 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.
  32. Manual de Procedimientos para la Toma y Manejo de Muestras de Alimentos para Análisis Bacteriológico. Laboratorio Nacional de Salud Pública, Subsecretaría de regulación y fomento sanitario, Secretaría de Salud. México;(DF):SSA, 1992.
  33. Bennett AR, Greenwood C, Tennant JG, Banks, Betts RP. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. Letters in Applied Microbiology 1998;26:437-441.
  34. Simonson JG and Siebling. Detection of *Vibrio cholerae* O1 serovars in oyster meat homogenate by a dipstick-ELISA method. Mar Technol Sci J 1991;25:52-59.
  35. Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, Paszko-Kolva, Rahn K, Grandis SAD. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. Int. J. Food Microbiology 1997;35:239-250.
  36. Gooding CM, Choudary PV. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes 1999;13:341-347.
  37. Gorodezky C, et. al. Manual de procedimientos de Genética Molecular. Departamento de Inmunogenética del INDRE. México, 2000.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CUADROS

Cuadro 1.1

Aislamientos de *Salmonella sp.*, en camarón crudo congelado, proveniente de Culiacán, Sinaloa, México.

| <b>CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO:</b> |          |         |    |          |         |    |
|-----------------------------------|----------|---------|----|----------|---------|----|
| N° Marqueta                       | Kauffman |         |    | Selenito |         |    |
| <b>MEDIOS SELECTIVOS:</b>         |          |         |    |          |         |    |
| (Muestras analíticas)             | XLD      | HEKTOEN | SB | XLD      | HEKTOEN | SB |
| 1 (A-B-C)                         | 1        | 3       | -  | -        | -       | -  |
| 2 (A-B-C)                         | -        | 2       | -  | -        | -       | -  |
| 3 (A-B-C)                         | 2        | 2       | -  | 1        | 2       | -  |
| 4 (A-B-C)                         | 1        | 2       | -  | -        | 1       | -  |
| 5 (A-B-C)                         | -        | 1       | -  | -        | -       | -  |
| TOTAL                             | 4        | 10      | 0  | 1        | 3       | 0  |

(-) resultado negativo

Cuadro 1.2

Pruebas Bioquímicas, para la Identificación de *Samonella sp* en camarón crudo, congelado, proveniente de Culiacán, Sinaloa, México.

| N° Marquetas          | <b>PRUEBAS BIOQUIMICAS:</b> |     |     |     |
|-----------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
|                       | LIA                         | TSI | LIA | TSI |
| (Muestras analíticas) |                             |     |     |     |
| 2 (A-B-C)             | -                           | -   | -   | -   |
| 3 (A-B-C)             | -                           | -   | -   | -   |
| 4 (A-B-C)             | -                           | -   | -   | -   |

(-) resultado negativo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1.3

Aislamiento e Identificación de *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo, congelado  
proveniente de Culiacán, Sinaloa, México.

| Nº Marqueta<br>(Muestras analíticas) | MEDIO | PRUEBAS BIOQUÍMICAS: |          |         |        |                                    |
|--------------------------------------|-------|----------------------|----------|---------|--------|------------------------------------|
|                                      | TCBS  | TINI                 | Tryptona | Oxidasa | String | Antisuero<br><i>V. cholerae</i> O1 |
| 1 (A-B-C)                            | -     |                      |          |         |        |                                    |
| 2 (A-B-C)                            | 4     | 4                    | 4        | 4       | 2      | -                                  |
| 3 (A-B-C)                            | 3     | 3                    | 3        | 3       | 3      | -                                  |
| 4 (A-B-C)                            | 11    | 11                   | 11       | -       |        |                                    |
| 5 (A-B-C)                            | 4     | 4                    | 4        | 4       | 4      | -                                  |
| TOTAL                                | 22    | 22                   | 22       | 11      | 9      | 0                                  |

( - ) resultado negativo

Cuadro 2.1

Aislamiento de *Samonella sp.* en camarón crudo, congelado, proveniente de Mazatlán,  
Sinaloa, México.

| <u>CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO:</u> |          |         |    |          |         |    |
|-----------------------------------|----------|---------|----|----------|---------|----|
| Nº Marqueta                       | Kauffman |         |    | Selenito |         |    |
| <u>MEDIOS SELECTIVOS:</u>         |          |         |    |          |         |    |
| (Muestras analíticas)             | XLD      | HEKTOEN | SB | XLD      | HEKTOEN | SB |
| 1 (A-B-C)                         | -        | -       | -  | -        | -       | -  |
| 2 (A-B-C)                         | -        | -       | -  | -        | 1       | -  |
| 3 (A-B-C)                         | -        | 1       | -  | -        | 1       | -  |
| 4 (A-B-C)                         | 1        | 2       | -  | -        | 1       | -  |
| 5 (A-B-C)                         | -        | -       | -  | -        | -       | -  |
| TOTAL                             | 1        | 3       | 0  | 0        | 3       | 0  |

( - ) resultado negativo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2.2

Pruebas Bioquímicas, para la Identificación de *Samonella sp* en camarón crudo, congelado, proveniente de Mazatlán, Sinaloa, México.

| N° Marquetas<br>(Muestras analíticas) | <u>PRUEBAS BIOQUÍMICAS:</u> |     |     |     |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
|                                       | LIA                         | TSI | LIA | TSI |
| 2 (A-B-C)                             | -                           | -   | -   | -   |
| 3 (A-B-C)                             | -                           | -   | -   | -   |
| 4 (A-B-C)                             | +                           | +   | +   | +   |
| (-) resultado negativo                |                             |     |     |     |

Cuadro 2.3

Aislamiento e Identificación de *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo, congelado, proveniente de Mazatlán, Sinaloa, México.

| N° Marqueta<br>(Muestras analíticas) | <u>MEDIO</u> | <u>PRUEBAS BIOQUÍMICAS:</u> |          |         |        |                                    |
|--------------------------------------|--------------|-----------------------------|----------|---------|--------|------------------------------------|
|                                      | TCBS         | TINI                        | Triptona | Oxidasa | String | Antisuero<br><i>V. cholerae</i> O1 |
| 1 (A-B-C)                            | 3            | 3                           | 3        | 3       | 3      | -                                  |
| 2 (A-B-C)                            | 5            | 5                           | 4        | 2       | 2      | -                                  |
| 3 (A-B-C)                            | 4            | 4                           | 4        | 4       | 4      | -                                  |
| 4 (A-B-C)                            | 6            | 6                           | 5        | 5       | 5      | -                                  |
| 5 (A-B-C)                            | 6            | 6                           | 5        | 5       | 5      | -                                  |
| TOTAL                                | 24           | 24                          | 21       | 19      | 19     | 0                                  |
| (-) resultado negativo               |              |                             |          |         |        |                                    |

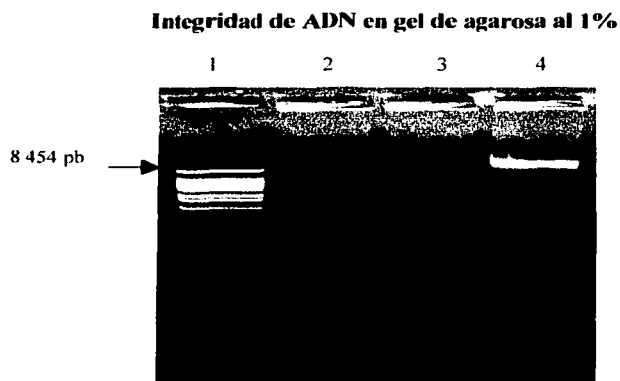
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ANEXO 1**  
**DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE CAMARÓN CRUDO DESCABEZADO**  
**CONGELADO PARA EXPORTACIÓN PROVENIENTE DE ALTAMAR Y BAHÍA EN**  
**SINALOA, MÉXICO.**



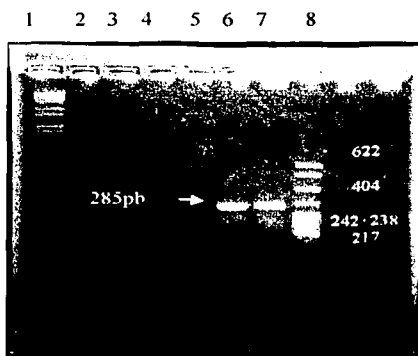
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## FIGURAS



**Figura 1.** Integridad de ADN en un gel de agarosa al 1%, donde se observa una banda única, nítida y de peso molecular alto. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2 y 3 ADN de *Vibrio cholerae* O1. Carril 4, ADN de *Salmonella* sp.

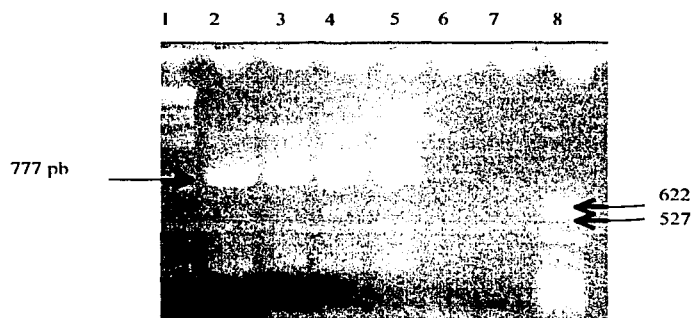
## Especificidad de *Salmonella* sp 25 ng/μl a 55°C



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

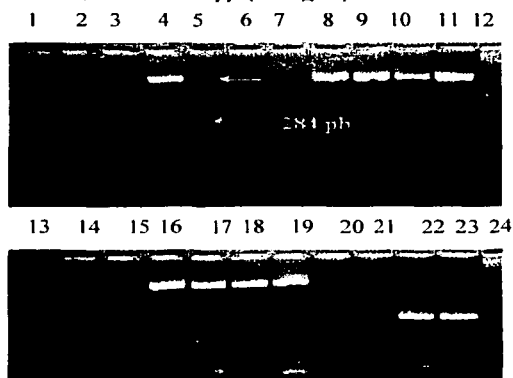
**Figura 2.** Resultados negativos con el ADN proveniente de distintos microorganismos. Carril 1 y 8 marcador de peso molecular. Carril 2 ADN de *E coli*. Carril 3 ADN de *Vibrio cholerae* O1. Carril 4 ADN de *Yersinia* sp. Carril 5 ADN de *Shigella* sp. Carril 6 y 7 ADN de *Salmonella* sp amplificado

**Especificidad de *Vibrio cholerae* O1 25 ng/μl a 58°C**



**Figura 3.** Resultados negativos con el ADN proveniente de distintos microorganismos. Carril 1 y 8 marcador de peso molecular. Carril 2, 3, 4, 5 ADN de *Vibrio cholerae* O1 amplificado. Carril 6 ADN de *Yersinia* sp. Carril 7 ADN de *Salmonella* sp.

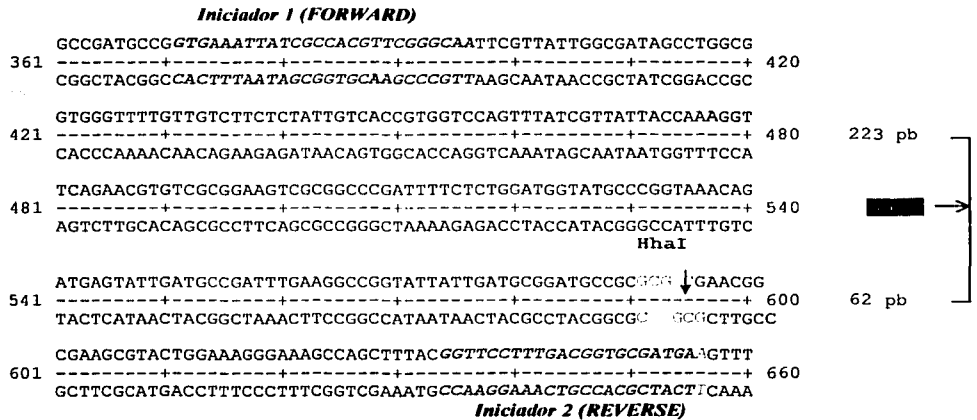
**Amplificación simultánea de *Vibrio cholerae* O1 (25 ng/ul) y *Salmonella* spp (25 ng/ul) a 55°C**



**Figura 4.** Amplificación simultánea de ADN. Carril 1, 12, 13 y 24 marcador de peso molecular. Carril 4, 16, 17, 18 y 19 amplificación simultánea de ADN de *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* O1 . Carril 2, 3 ADN de *E. coli*. Carril 5 y 14, control negativo. Carril 6 y 7 ADN de *Yersinia* sp. Carril 15 y 20 ADN de *Shigella* sp. Carril 8, 9 10 y 11 ADN de *Vibrio cholerae* O1. Carril 22 y 23 ADN de *Salmonella* sp.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Secuencia genómica del gen *Inv A* de *Salmonella* sp.



**Figura 5.** Secuencia genómica del gen *inv A*, revisado en el paquete GCG de la Universidad de Wisconsin, E.U.A.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# **Secuencia genómica del gen *ctx AB* de *Vibrio cholerae* O1**

**Iniciador 1 (FORWARD)**

```

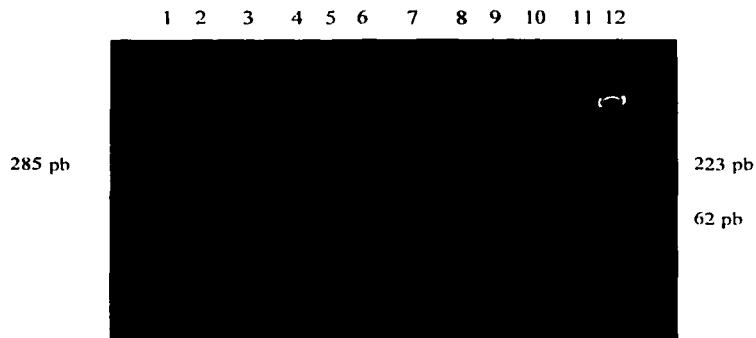
201  ATATCGGGCAGATTCTAGACCTCCTGATGAAATAAAGCAGTCAGGTGGTCTTATGCCAAG
241  TATAGCCCGCTAAGATCTGGAGGACTACTTTATTTTCGTCAGTCCACCAAGAATACGGTTC
    AGGACAGAATGAGTACTTTTGACCGAGGTACTCAAATGAATATCAACCTTTATGATCATGC
301  TCCTGTCTTACTCATGAAACTGGCTCCATGAGTTTACTTATAGTTGGAATACTAGTACG
    AAGAGAACTCAGACGGGATTGTTAGGCACGATGATGGATATGTTTCCACCTCAATTAG
361  TTCTCCTTGAGTCTGCCCTAAACAATCCGTGCTACTACCTATACAAGTGGAGTTAATC
    TTTGAGAAGTGCCCACTTAGTGGGTCAAACCTATATTGCTCTGGTCATTCTACTTATTATAT
421  AAACCTCTTCACGGGTGAATCACCAGTTTGATATAACAGACCAGTAAGATGAATAATATA
    ATATGTTATAGCCACTGCACCCAACATGTTTAACGTTAATGATGTATTAGGGGCATACAG
481  TATACAAATATCGGTGACGTGGGTTGTACAAATTGCAATTACTACATAATCCCCGTATGTC
    TCCTCATCCAGATGAACAAGAAGTTTCTGCTTTAGTGGGATTCCTACTCCCAATATA
541  AGGAGTAGGTCTACTTTGTTCTTCAAAGACGAAATCCACCCTAAGGTATGAGGGTTTATAT
    TGGATGGTATCGAGTTTCATTTGGGGTGCTTGATGAACAATTACATCGTAATAGGGGCTA
601  ACCTACCATAGCTCAAGTAAAACCCACGAACCTACTTGTTAATGTAGCATTATCCCCGAT
    CAGAGATAGATATTACAGTAACTTAGATATTGCTCCAGCAGCAGATGGTTATGGATTGGC
661  GTCTCTATCTATAATGTCATTGAATCTATAACGAGGTCGTCTACCAATACCTAACCG
    AGGTTTCCCTCCGGAGCATAGAGCTTGGAGGGAAGAGCCGTGGATTTCATGTCACCGCC
721  TCCAAAGGGAGGCCTCGTATCTCGAACCTCCCTTCTCGGCACCTAAGTAGTACGTGGCGG
    C1a1
    GGGTTGTGGGAATGCTCCAAGATCAATGATGAGTAATACTTGCGATGAAAAAACCCAAAG
781  CCCAACACCCCTTACGAGGTTCTAGTATCTACTCATTATGAACGCTACTTTTGTGGTTTC
    TCTAGGTGTAATAATCCTTGACGAATACCAATCTAAAGTTAAAGACAAATATTTTCAGG
841  AGATCCACATTTTAAAGGAAGTCTTATGGTTAGATTCAATTTTCTGTTTATAAAGTCC
    CTATCAATCTGATATTGATACACATAATAGAATTAAGGATGAATTATGATTAAATTAATA
901  GATAGTTAGACTATAACTATGTGATTATCTTAATTCCTACTTAATACTAATTTAATTTT
    TTTGGTGTTTTTTTTACAGTTTACTATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAAAT
961  AAACCACAAAAAATGTCAAATGATAGAAGTCGATACGTGTACCTTGTGGAGTTTFA
    ATTACTGATTATTTTAAATAATCAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATA
1020 TAATGACTAAACACACTTATATGTTGTGTGTTATGTATGCGATTACTATTCTAT
  
```

**Iniciador 2 (REVERSE)**

**Figura 6.** Secuencia genómica del gen *ctx AB*, revisado en el paquete GCG de la Universidad de Wisconsin, E.U.A.

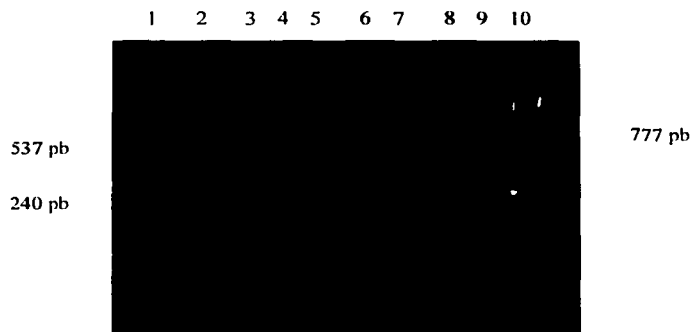
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PCR a 58°C del gen *inv A* y RFLP con la enzima *HhaI* de *Salmonella sp***



**Figura 7.** Carril 1, 2 y 3 ADN de *Salmonella sp.* Carril 4,5, 6, 8, 9, 10 y 11 RFLP de *Salmonella sp* con la enzima *HhaI*. Carril 7 blanco. Carril 12 marcador de peso molecular de 50 pb.

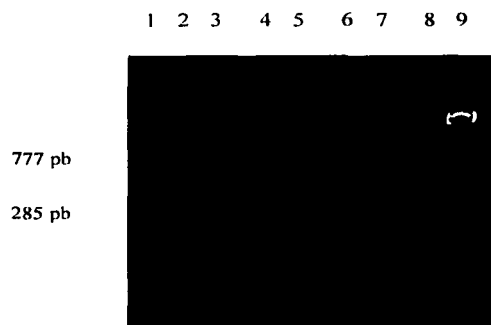
**PCR a 55°C del gen *ctx AB* y RFLP con *ClaI* de *Vibrio cholerae O1***



**Figura 8.** Carril 1, 3 y 4 RFLP de *Vibrio cholerae O1* con la enzima *ClaI*. Carril 6,7, 8, 9, ADN de *Vibrio cholerae O1*. Carril 2 y 5 blanco. Carril 10 marcador de peso molecular de 50 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Amplificación simultánea de *Vibrio cholerae* O1  
y *Salmonella* sp a 55°C.**



**Figura 9.** Carril 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 Amplificación simultánea de *Vibrio cholerae* O1 y *Salmonella* sp. Carril 4 blanco. Carril 9 marcador de peso molecular de 50 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN