



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

T E S I S

Diseño de un método de detección  
y tipificación por PCR de *Salmonella enterica* en leche

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R I A EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

IBQ. SILVIA CRISTINA MELÉNDEZ CEJA

Directora de tesis:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

Co-director de tesis:

D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO



Morelia, Michoacán, agosto 2013

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR MICROBIANA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ” DE LA UMSNH BAJO LA DIRECCIÓN DE LA D. EN C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS Y LA CO-DIRECCIÓN DEL D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO. SE CONTÓ CON EL APOYO DEL FONDO SECTORIAL EN SALUD-2009 AL PROYECTO “MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE AISLADOS DE *Salmonella enterica* OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS”, CLAVE SALUD-2009-01-115172. LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUE TAMBIÉN POSIBLE GRACIAS A LA BECA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO OTORGADA POR CONACYT

## **Agradecimientos**

A mi asesor de tesis D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, mi coasesor D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo porque a parte de haber sido mis asesores fueron mi segunda familia, por brindarme su apoyo incondicional, por motivarme y dedicarme parte de su tiempo.

A mis sinodales por su ayuda, su asesoría y apoyo.

A mi esposo Ricardo Baltazar y mi hermano Carlos Meléndez porque gracias a ellos estoy el día de hoy aquí, por su apoyo, motivación y paciencia en mis momentos de stress.

A mis grandes amigas Araceli Inocencio, Cesar Gómez, Ana Guillén, Gaby Vázquez, Saila Cázares por tenerme paciencia, apoyarme académicamente, por convertirse en amigas incondicionales.

A mis papás, mi abuelito, mis suegros, demás familiares, amigos y compañeros por su apoyo incondicional en todo momento.

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de todo este proceso formativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el sustento económico, sin el cual no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

---

## **Dedicatoria**

A mi esposo Ricardo Baltazar por convertirse en una de las personas más importantes en mi vida, por apoyarme, motivarme a superarme y salir adelante día con día.

A mi magnífica familia, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por la oportunidad, la confianza, el apoyo que me han brindado, en especial a mi padre Carlos A. Meléndez Montez, mi madre Audelia Gutiérrez Acosta, a mi hermano Carlos Alejandro Meléndez Ceja

A mi abuelo Antonio Ceja Torres por siempre creer en mi, por apoyarme en todos los sentidos, por motivarme a ser alguien en esta vida

A mi mamá Silvia Ceja Toribio (+) porque sé que desde donde está se siente feliz por todo lo que he logrado, porque ella ha sido mi motivación.

A mi abuelita María Toribio Aldaz (+), a mi tío Alejandro Ceja Toribio por animarme, apoyarme siempre.

---



## INDICE

<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS EMPLEADAS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRAC .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Salmonella .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1 Clasificación.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2 Epidemiología.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3 Métodos de identificación y detección de Salmonella .....</b>	<b>10</b>
a) Método microbiológico .....	10
b) Métodos genético-moleculares .....	11
c) Comparación del método microbiológico y el método por PCR .....	12
a) Estudios basados en PCR punto final .....	12
b) Estudios basados en PCR punto final en leche .....	15
c) Kits de detección de Salmonella en alimentos .....	16
d) Estudios basados en PCR Multiplex .....	16
<b>2.2.4. Diseño de iniciadores específicos para detección de Salmonella.....</b>	<b>17</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>4. HIPOTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Objetivo General.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Objetivos Particulares .....</b>	<b>20</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>

<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
7.1	Material Biológico .....	22
7.1.1	Microorganismos empleados y condiciones de crecimiento.....	22
7.1.2	Muestras de leche.....	22
7.2	Extracción de ADN de las cepas de referencia.....	22
7.3	Diseño del Método mediante PCR simple .....	23
7.4	Sensibilidad del método .....	24
7.4.1	Preparación del inóculo de trabajo.....	24
7.4.2	Inoculación de las muestras de leche.....	24
7.4.3	Enriquecimiento.....	24
7.4.4	Extracción de ADN de muestras de leche.....	25
7.4.5	Diseño del método mediante PCR Multiplex .....	25
7.5	Reproducibilidad de los ensayos diseñados .....	26
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
8.1	Estandarización de condiciones de amplificación utilizando PCR punto final, ADN de la cepa de referencia e iniciadores específicos de género <i>Salmonella</i> , subespecie I y serotipo Typhimurium.....	27
8.2	Determinación de la sensibilidad del método .....	29
8.2.1	Conteo en placa de las UFC presentes en las diluciones seriadas .....	29
8.2.2	Extracción de ADN de leche inoculada artificialmente.....	29
8.2.3	Ensayos de PCR con ADN de leche inoculada artificialmente. ....	31
8.3	Reproducibilidad del ensayo diseñado .....	34
8.4	Ensayo PCR Multiplex con ADN de la cepa de referencia .....	36
8.5	Detección de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium mediante PCR Multiplex en leche bronca.....	38
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>

**12. BIBLIOGRAFÍA ..... 48**

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Título</b>	<b>Página</b>
1. Estandarización de condiciones de PCR con los iniciadores STM4057, STM3098, STM 4497 y ADN de la cepa de referencia	<b>30</b>
2. Gradiente de temperatura de 55-65 °C para la estandarización con iniciadores específicos de serotipo Thyphimurium	<b>31</b>
3. Conteo en placa de las UFC presentes en las diluciones seriadas	<b>32</b>
4. ADN extraído de muestras de leche inoculadas y enriquecidas	<b>33</b>
5. Amplicones obtenidos con el programa de amplificación establecido y ADN de leche inoculada con 10 <sup>8</sup> UFC/mL	<b>35</b>
6. PCR simple con ADN de leche inoculada con 10 <sup>4</sup> UFC/mL	<b>36</b>
7. PCR simple con ADN de leche inoculada con 10 <sup>3</sup> UFC/mL	<b>36</b>
8. PCR simple con ADN de leche inoculada con 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>2</sup> y 1UFC/mL enriquecida por 12 h	<b>37</b>
9. PCR simple con ADN de leche inoculada de 10 <sup>3</sup> UFC/ml, enriquecida por 2 h, empleando dos marcas de leche (b y c).	<b>38</b>
10. ADN de muestras de leche bronca enriquecidas por 2 h	<b>39</b>
11. Detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium mediante PCR simple en leche bronca	<b>39</b>
12. PCR simple con ADN de la cepa de referencia a una Temperatura de alineamiento de 59°C.	<b>41</b>
13. Detección de <i>S. Typhimurium</i> mediante PCR Multiplex en leche inoculada artificialmente con la cepa ATCC 14028	<b>41</b>

14. PCR multiplex con ADN de leche bronca de 3 comunidades y de la cepa de referencia	<b>42</b>
---	-----------

## INDICE DE TABLAS

<b>Título</b>	
1. Iniciadores utilizados para las reacciones de PCR	<b>25</b>
2. Iniciadores utilizados para las reacciones de PCR Multiplex (control positivo)	<b>28</b>
3. Comparación de diversos ensayos PCR para detección de <i>Salmonella</i> en alimentos	<b>42</b>
4. Comparación entre ensayos PCR Multiplex para detección de <i>Salmonella</i> en alimentos	<b>43</b>

**ABREVIATURAS EMPLEADAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
ATCC	American Type Culture Collection
UFC	Unidades formadoras de colonia
ADN	Acido Desoxirribonucleico
h	Hora
ETAs	Enfermedades Transmitidas por los Alimentos
FSIS	Food Safety and Inspection Service
FDA	Food and Drug Administration
EFSA	Autoridades de Seguridad Alimentaria en Europa
SIRVETA	Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FSMS	Sistema de gestión y seguridad alimentaria
NOM	Norma Oficial Mexicana
mL	Mililitro
BPW	Buffer de agua peptonada
MKTT	caldo de Müller-Kauffmann tetratationate
°C	Grados Celsius
LESP	Laboratorio Estatal de Salud Pública
g	Gramo
LBA	Agar Luria Bertani
CLB	Caldo Luria Bertani
HCl	Ácido clorhídrico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
mM	Milimolar
µl:	Microlitro
%	Porcentaje
ARN	Ácido ribonucleico
ng	Nanogramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
U	Unidades
EPEC	Enterotoxigénico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
pb	Pares de bases

## RESUMEN

*Salmonella* serotipo Typhimurium afecta con mayor frecuencia al ser humano provocando enfermedades gastrointestinales por la frecuente ingesta de alimentos contaminados. El método microbiológico estándar para identificación de *Salmonella* spp. en alimentos requiere de 4 a 7 días. Se han desarrollado otros métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que han demostrado ser rápidos, reproducibles y con un alto grado de sensibilidad pero cuya especificidad llega solo a nivel de subespecie. En un estudio de comparación de genomas de *S. Typhimurium* LT2, se diseñaron iniciadores específicos de género (STM3098) subespecie I (STM4057) y serotipo Typhimurium (STM4497), los cuales fueron probados en cultivos puros de cepas de referencia, sugiriendo que pueden ser empleados para la identificación de *Salmonella*, evitando realizar pruebas serológicas. El objetivo del presente estudio fue diseñar ensayos de PCR simple y multiplex que sean rápidos, con alta sensibilidad y reproducibles para la detección de *Salmonella* Typhimurium en leche. El estudio incluye el diseño de ensayos PCR a partir de ADN extraído de muestras de leche pasteurizada inoculadas con la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC 14028 y enriquecidas por 2, 4, 6, 8, 12 y 24h a 37°C, empleando los iniciadores mencionados anteriormente; La sensibilidad se determinó mediante la inoculación artificial con diferentes UFC (Unidades formadoras de colonias) y la reproducibilidad se evaluó probando el método diseñado, en leche pasteurizada de diferentes marcas. El ADN extraído fue de alto peso molecular y en cantidad directamente proporcional a las UFC inoculadas. Se establecieron las condiciones de amplificación con los iniciadores mencionados y el ADN de la cepa de referencia, condiciones que fueron probadas con el ADN de muestras de leche, obteniéndose dos métodos uno que requería de 2 h de enriquecimiento con una sensibilidad de 1000 UFC y otro con 12 h de enriquecimiento con una sensibilidad de 1UFC, ambos altamente reproducibles. También se diseñó un ensayo multiplex obteniéndose los amplicones esperados.

## ABSTRAC

Salmonella Typhimurium is one of the serotypes that most frequently affects the human gastrointestinal diseases causing the frequent ingestion of contaminated food. The standard microbiological method for identification of Salmonella spp. in foods requires 4 to 7 days. Other methods have been developed based on Chain Reaction (PCR) that have proven to be fast, reproducible and with a high degree of sensitivity but a specificity comes only at the subspecies level. In a study comparing the genomes of S. Typhimurium LT2, specific primers were designed genus (STM3098) subspecies I (STM4057) and serotype Typhimurium (STM4497), which were tested in pure cultures of reference strains, suggesting that may be employed for the identification of Salmonella, avoiding testing serology. The aim of this study was to design PCR simple and rapid multiplex, with high sensitivity and reproducible for the detection of *Salmonella* Typhimurium in milk. The study includes the design of PCR assays from DNA extracted from samples of pasteurized milk inoculated with the reference strain S. Typhimurium ATCC 14028 and enriched by 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h at 37 ° C, using the primers mentioned above, the sensitivity was assessed by artificial inoculation with different CFU (colony forming units) and the reproducibility was evaluated testing the method designed in pasteurized milk of different brands. The extracted DNA was high molecular weight and amount directly proportional to the CFU inoculated. Conditions were established with primers amplifying mentioned and DNA of reference strain, conditions were tested with DNA from milk samples, obtaining one two methods, one method requiring enrichment for 2 h with a sensitivity of 1000 CFU and other 12 h of enrichment with a sensitivity of 1 CFU, both highly reproducible. Also designed a multiplex assay yielding the expected amplicons.

## 1. INTRODUCCION

Distintos serotipos de *Salmonella enterica* subs. *enterica* son patógenos zoonóticos de distribución mundial, causantes de diversas enfermedades como diarrea, gastritis, fiebre tifoidea, bacteremias y septicemias, entre otras (OMS, 2007). Las personas portadoras de este patógeno y que no tienen buenas prácticas de higiene, pueden contaminar alimentos, así como el material para la elaboración de los mismos. Esta bacteria tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud (FDA, 2009). Debido a la amplia distribución de éste patógeno y a su capacidad para infectar es necesario contar con estrategias de vigilancia sanitaria para evitar brotes e implementar acciones para disminuir la incidencia de éste patógeno (Lim y col., 2005). En este sentido, las técnicas de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido muy útiles para la detección de este patógeno en alimentos, proporcionando ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad, especificidad y disminución del tiempo de detección (Malorny y col., 2004). Estudios en el que han empleado la técnica mencionada, como el realizado en el presente trabajo permiten detectar el patógeno hasta nivel serotipo en menos de 24 h, brindando información valiosa previniendo la aparición de enfermedades infecto-contagiosas, mediante la detección rápida y específica de posibles fuentes de contaminación.

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son una causa importante de morbilidad y mortalidad tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, la incidencia mundial de ETAs es difícil de estimar, afecta gravemente a lactantes, niños pequeños, ancianos y el enfermo, pero se ha reportado que en 2009, 1.8 millones de personas murieron a causa de enfermedades diarreicas; una gran proporción de estos casos se puede atribuir a la contaminación de alimentos y agua potable. En Estados Unidos (EU) y la Unión Europea continúa siendo un problema importante la incidencia de infecciones transmitidas por alimentos. En los países industrializados, el porcentaje de la población que sufre de enfermedades transmitidas por alimentos cada año se ha elevado hasta en un 30% (OMS, 2007).

Los patógenos bacterianos que clásicamente están implicados en las ETAs son *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia coli* patógena, entre otros (Gonzalez y Rojas, 2005). La infección por *Salmonella* es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos, representando un problema importante de salud pública a nivel internacional (Leader y col., 2009).

### 2.2 *Salmonella*

#### 2.2.1 Clasificación.

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos, son anaerobios facultativos y no esporulados. De acuerdo a sus características bioquímicas no fermentan la lactosa, fermentan glucosa con producción de gas, son catalasa positivos y oxidasa negativos; móviles excepto *S. Gallinarium* (Parra, 2002).

Estudios de ADN mediante técnicas de hibridación demostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies (Guibourdenche y col., 2010): *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie *S. enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I), *Salmonella enterica* subesp. *salamae* (II), *Salmonella enterica* subesp. *arizonae* (IIIa), *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb), *Salmonella enterica* subesp. *houtenae* (IV), *Salmonella enterica* subespecie *indica* (VI). La especie *S. bongori* sólo posee la subespecie V (Leader, 2009). A su vez las subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori* están constituidas por más de 2500 serovariedades en base al esquema de Kauffmann-White (Caffer, Terragno, & Binztein, 2008), las cuales están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O, flagelares H y en algunos casos Vi (Kim y Park, 2006). Los serotipos como Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow y Typhi de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* son causantes de diversas enfermedades como diarrea, gastritis, fiebre tifoidea, entre otras (FDA, 2009).

### 2.2.2 Epidemiología

En una infección debida a *Salmonella*, los síntomas sólo aparecen cuando el patógeno se multiplica en el intestino y su período de incubación es variable según la especie, una vez ingerido el alimento (Hernández y Rodríguez, 2009).

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa, una de las más frecuentes en humanos producida por Enterobacterias del género *Salmonella* siendo los serotipos Typhi, Paratyphi, Typhimurium y Enteritidis los principales agentes etiológicos (Vesna, 2008). Sus síntomas se caracterizan por presentar cuadros febriles y gastroenteritis aguda.

La fiebre tifoidea es otra de las enfermedades que pueden ser ocasionadas por el género *Salmonella*. Habitualmente esta enfermedad es provocada por el serotipo *S. Typhi*. Se adquiere procedente de otro enfermo o de un portador asintomático mediante alimentos o agua contaminados (Gonzalez y col., 2009).

Algunas de las serovariedades patógenas afectan al ser humano provocando diversas enfermedades debido a la ingesta de alimentos que han sido contaminados (Parra y col., 2002). Tanto la frecuencia como los serotipos difieren en diversas partes del mundo.

Las Autoridades de Seguridad Alimentaria en Europa (EFSA, 2008) reportaron en el 2008 a la salmonelosis como la segunda enfermedad zoonótica más frecuente en humanos, causando aproximadamente 131 468 casos confirmados. La principal causa de esta enfermedad fue por contaminación de alimentos de origen animal, siendo *Salmonella* después de *Campylobacter* el patógeno que con mayor frecuencia se ha relacionado con ETAs (McCaber y col., 2011). De la Unión Europea, España reporta los mayores porcentajes de incidencia por *S. enterica* en alimentos, con valores en carne de cerdo del 12.7 %, en carne de res de 5% y en quesos de 3.1 %; siendo los serotipos más frecuentes *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, presentándose en el 79.9% de los casos.

Se tiene documentado que *Salmonella enterica* es la principal causa de ETAs (FDA, 2011) en EU. La FDA reporta que los casos por salmonelosis van de 2 a 4 millones por año, encontrando como serotipos más frecuentes en alimentos a Kentucky, Enteritidis, Typhimurium y Heilderbeg entre otros (FSIS, 2010). En la actualidad EUA (2011) presenta un brote de *Salmonella* Agona, el cual ha causado 97 casos reportados de la enfermedad en todo el país (FDA, 2011).

En América Latina, principalmente en los países sudamericanos se han reportado a Enteritidis, Typhimurium y Anatum como los serotipos detectados en la mayoría de los aislados en bovinos, cerdos y aves domésticas (Yañez y col., 2008).

Datos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), reportaron que en el periodo 1993-2002 se registraron 2409 personas enfermas por salmonelosis en México a consecuencia de infección alimentaria, de las cuales hubo 2 muertes. En el 2005 se reportaron 139,742 casos de infecciones por *Salmonella* en los sistemas de Salud Pública, la cual debe de ser considerada como una cifra baja, ya que la mayor parte de los casos no fueron reportados debido a que no se

realizaban los estudios clínico-microbiológicos correspondientes y por tanto los datos estadísticos obtenidos poseen valores subestimados (Zaidi y col., 2006). En junio del 2012 en México se reportaron 65 893 casos de salmonelosis (SIRVETA, 2012). Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, médicos, microbiólogos, veterinarios y sectores de agricultura y pesca, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las serovariedades de *Salmonella* en distintos puntos de riesgo para la salud de los seres humanos. Esta información es necesaria para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*, así como los costos que estas representan en distintos sectores socioeconómicos (Zaidi y col., 2006a).

### **2.2.3 Métodos de identificación y detección de *Salmonella***

Debido a la morbilidad que se presenta por éste patógeno es que en varios países incluidos México se han establecido tanto programas de vigilancia como monitoreos epidemiológicos con la finalidad de garantizar la calidad y seguridad de los alimentos, siendo el método microbiológico estándar el método de referencia para control oficial de este patógeno.

#### **a) Método microbiológico.**

El método de detección que se utiliza específicamente para *Salmonella* está sujeto a programas de vigilancia y pruebas de verificación y validación del Sistema de gestión y seguridad alimentaria (FSMS), y se basa en las técnicas de enriquecimiento en placa (Jasson y col., 2010). Este método de detección es el más utilizado tanto a nivel internacional (método ISO 6579-2005) como nacional (método NOM-114-SSA1-1994); ambos métodos son muy similares, las pequeñas diferencias que existen se reflejan en las temperaturas que emplean, por ejemplo la norma ISO-6579 emplea temperatura de enriquecimiento de  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  por un

tiempo de incubación de 18h y la NOM 114 en nuestro país maneja una temperatura de 35°C con un tiempo de incubación de 24h. Ambos constan de una serie de etapas sucesivas:

I. Un pre-enriquecimiento, paso que dura aproximadamente 24 h en incubación en un medio selectivo que permite la recuperación y crecimiento limitado del microorganismo ( $10^2$  - $10^4$  UFC/ml), en esta etapa se utiliza un buffer de agua peptonada (BPW) y la muestra a analizar.

II. Un período de enriquecimiento en un medio selectivo para suprimir la flora competitiva y la multiplicación de los microorganismos objetivo hasta alcanzar altos niveles (alrededor de  $10^4$ -  $10^6$  UFC/ml) para el posterior aislamiento o detección a través de otras técnicas. En esta etapa se emplea el caldo Rappaport Vassiliadis con soya al que se le añade una determinada cantidad de BPW para su posterior incubación a 42°C por 24 h y el caldo de Müller-Kauffmann tetrionate-novobiocina (MKTTn) agregándole una determinada cantidad de BPW e incubándose a 35°C por 24 h.

La siguiente etapa es el aislamiento en medio selectivo (agar xilosa, lisina desoxicolato en placa) incubándose a 35°C por 24 h, la aplicación de esta etapa depende de la observación de crecimiento en alguno de las muestras inoculadas en caldo. La última etapa es la purificación de colonias presuntivas inoculando en agar nutritivo, para finalmente llevar a cabo la confirmación, la cual se realiza por medio de pruebas bioquímicas y pruebas serológicas. Este método es laborioso y sobre todo requiere tiempo, debido a que los resultados confirmatorios hasta nivel serogrupo tardan de 4 a 7 días (Jasson, 2010).

### **b) Métodos genético-moleculares**

En la actualidad el avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos para la detección de *S. enterica* en alimentos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad, especificidad y disminución del tiempo de detección (Wolffs y col., 2006). Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hernández, 2009) ensayo

que se fundamenta en la amplificación de fragmentos específicos de ADN. Tiene la utilidad de que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad las bacterias causantes de una enfermedad (Jasson y col., 2010), además ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos, incluyendo *Salmonella* en diferentes tipos de alimentos, se obtienen resultados en menos de 48h en comparación con el método microbiológico, además que es mucho más sencillo de llevarse a cabo (Malorny y col., 2009).

El método PCR presenta un gran número de variantes, siendo objeto de estudio 2 de ellas empleadas para la detección de *S. enterica*: PCR punto final y PCR Multiplex.

### **c) Comparación del método microbiológico y el método por PCR**

El método microbiológico para detección de *Salmonella* es un método con un nivel de especificidad media con respecto al método por PCR el cual tiene un nivel alto de especificidad; en cuanto a nivel de sensibilidad el método convencional presenta un límite de detección de 100 UFC/mL, el cual al compararse con el método molecular es inferior, debido que el método por PCR es capaz de detectar 1 UFC/ml (Ziemer y Steadham, 2003); en lo que respecta el tiempo de detección el método microbiológico requiere de 4 a 7 días para obtener resultados confirmatorios hasta nivel serogrupo, en cambio el método genético-molecular detecta el patógeno incluyendo el serotipo en menos de 48h, además que éste es mucho más sencillo de llevarse a cabo con respecto al método de referencia (Chacón, 2010).

## **2.2.4. Detección de *Salmonella* en alimentos**

### **a) Estudios basados en PCR punto final**

Existen varios reportes acerca de la detección de *Salmonella* en alimentos utilizando PCR punto final y los tiempos de detección y la sensibilidad varían de acuerdo al tipo de muestra y los iniciadores utilizados.

Ferreti y colaboradores (2001) realizaron un ensayo para detección de *Salmonella* por la variante PCR punto final analizando muestras de salami contaminadas artificialmente con *S. Typhimurium* con un enriquecimiento previo de 6h, para las amplificaciones se utilizaron iniciadores específicos Salm3 (59-GCTGCGCGCGAACGGCGAAG-39) y Salm4 (59-TCCCGGCAGAGTTCCCATT-39), que amplifican 389 pb para el gen *invA*. Los resultados mostraron un nivel de detección de 1 UFC/100ml de muestra, en un tiempo total de 12h (Ferreti y col., 2001).

Croci (2004) reportaron la detección en menos de 24 h de  $10^3$  UFC de *Salmonella* en 25 g de carne de cerdo, pollo y res, empleando los iniciadores ST11 Y ST15 dirigidos a fragmentos aleatorios del genoma de *Salmonella* spp.

Kumar y colaboradores (2008) realizaron un protocolo utilizando la técnica PCR punto final para análisis de *Salmonella* de distintos serotipos en diferentes muestras de mariscos, estas fueron inoculadas artificialmente y enriquecidas por 8h, al final del proyecto reportaron la detección de 2 UFC/25g de muestra, en un tiempo menor a 24h, empleando como iniciadores 139-141 que amplifican un producto de 284pb para el gen *invA*.

Se reportó en el 2009 un trabajo en el que se diseñó un método por PCR punto final para detectar *Salmonella* Typhimurium en muestras de carne de res y lo compararon con el método convencional, obteniendo un nivel de especificidad de género empleando como iniciadores 139-141 que amplifican para el gen *invA*; evaluaron la reproducibilidad del método analizando 50 muestras de carne y 25 muestras de melón contaminadas naturalmente, de las cuales se obtuvieron 4 muestras positivas de carne y 4 muestras positivas de melón, a su vez este método lo compararon con el método convencional, coincidiendo los resultados (Gallegos y col., 2009).

En un estudio se establecieron las condiciones para un protocolo de detección de *S. Enteritidis* en 10 muestras de alimentos (pollo, ensalada y huevos) por el método por PCR punto final, para este protocolo se diseñaron un par de iniciadores Sef.B127L (5'- GATTGGGCACTACACGTGT-3') and SefB661R (5'-

TGTA CTCCACCAGGTAATTG-3') que amplificaran para el gen *sefb* de *Salmonella* Enteritidis, las muestras de pollo, ensaladas y huevos se contaminaron artificialmente con el patógeno de estudio y fueron enriquecidas por 8h, obteniendo un límite de detección de 10 a 10<sup>3</sup>UFC /g, después fue evaluada la reproducibilidad del método diseñado analizando un total de 285 muestras de carne de pollo contaminadas naturalmente, obteniendo de esta 3 muestras positivas con alrededor de 5x10<sup>6</sup> UFC/g (Wang y col., 2009).

También se han utilizado los iniciadores Salm3 5'GCTGCGGCGCAACGGCGAAG-3' y Salm4 5'- TCCCGGCAGAGTTCCCATT-3' para detectar el gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga, en un protocolo que incluyó como principales modificaciones: temperatura de hibridación de los iniciadores y los tiempos en el termociclador (PCR touchdown) con el fin de estandarizar un método capaz de detectar de forma directa genes de virulencia de *Salmonella*. A su vez se analizaron las muestras con el método microbiológico. La extracción de ADN se llevó a cabo por choque térmico. Los resultados obtenidos después de las modificaciones mencionadas mostraron, gran especificidad y una sensibilidad capaz de detectar 10<sup>2</sup> UFC por 25 g de muestra. La comparación cualitativa del método de PCR con el cultivo convencional, mostró una mayor eficiencia del PCR en cuanto a tiempo de procesamiento de muestra y obtención de resultados (Chacón, 2010).

También se ha comparado la detección de *Salmonella* por PCR con el método microbiológico en alimentos, tal es el caso de un estudio en el que se analizaron muestras de granos de trigo, soya y harina, de los cuales unas muestras fueron inoculados artificialmente, con un previo enriquecimiento de 18h, para la amplificación utilizaron iniciadores que amplificaban para el gen *invA*, obteniendo como resultados un nivel de detección de 100 UFC/mL, con especificidad a nivel de género. Se evaluó la reproducibilidad del estudio empleando el mismo tipo de muestras pero contaminadas de manera natural, concluyendo que el método de PCR tenía gran especificidad y precisión (Koyuncu y col., 2010).

Se reportó en el 2010 un estudio en el que se analizó el protocolo de PCR punto final para detección de *Salmonella* en muestreos de canales de pollos, con un previo enriquecimiento y posterior incubación, para verificar si podía ser usado en programas de control de calidad. Se realizó el análisis microbiológico y la detección por PCR. La extracción del ADN se realizó con la técnica fenol:cloroformo. Los iniciadores empleados son 139 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' y 141 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3' para amplificar 284 pares bp del gen *invA*. Los resultados mostraron que no hubo diferencia estadística al usar el método convencional y el de PCR siendo el límite de detección de éste último de  $3.3 \times 10^7$  UFC/mL (Matias y col., 2010).

Por otro lado en un protocolo para detección de *Salmonella* por el método de PCR se analizaron muestras de camarones contaminados artificialmente por diferentes serotipos (Typhi, Typhimurium, Enteritidis, y Weltevreden), el ensayo PCR se llevó a cabo utilizando iniciadores que amplificaban los genes *invA* (F- TAT CGC CAC GTT CGG GCA A y R- TCG CAC CGT CAA AGG AAC C), *himA* (F-CGT GCT CTG GAA AAC GGT GAG y R-CGT GCT GTA ATA GGA ATA TCT TCA), *hto* (F-ACT GGC GTT ATC CCT TTC TCT GGT TG y R- ATG TTG TCC TGC CCC TGG TAA GAG A), *fimA* (F- CCT TTC TCC ATC GTC CTG AA y R- TGG TGT TAT CCG CCT GAC CA), y *hns* (F-TAC CAA AGC TAA ACG CGC AGC T y R- TGA TCA GGA AAT CTT CCA GTT GC), además se montó una PCR Multiplex con los 5 pares de iniciadores; obteniendo un límite de detección  $10^2$  UFC/g con un periodo de enriquecimiento de 8h (Jeyasekaran y Thirumalai, 2011).

### **b) Estudios basados en PCR punto final en leche**

Villareal y colaboradores (2008), lograron detectar en 12 h, 2 UFC/mL de *Salmonella* spp. en leche en polvo inoculada artificialmente, utilizando los iniciadores 139 y 141 dirigidos al gen *invA*.

Se han utilizado los iniciadores ttr6 y ttr4 para detectar el gen *ttr* de *Salmonella* spp. en leche, en un protocolo en el cual los resultados mostraron gran especificidad y una sensibilidad capaz de 40 UFC/ml en un tiempo aproximado de 24h. A su vez se analizaron las muestras con el método microbiológico. La comparación cualitativa del método de PCR con el cultivo convencional, mostró una mayor eficiencia del PCR en cuanto a tiempo de procesamiento de muestra y obtención de resultados (Malorny y col., 2009).

En resumen, de todos estos reportes se puede concluir que los iniciadores que se han utilizado con mayor frecuencia para detección de *Salmonella* son los que amplifican el gen *invA*, además el tiempo que requieren para llevar a cabo el proceso de detección se reduce en comparación al requerido por el método microbiológico.

### **c) Kits de detección de *Salmonella* en alimentos**

Existen a la venta Kits comerciales para la detección de *Salmonella* en alimentos, estos utilizan la técnica de PCR principalmente las variantes punto final y en tiempo real. De la variante PCR punto final está el kit de la marca CORPOGEN cuyo nivel de especificidad llega a nivel de género utilizando iniciadores que amplifican el gen *invA*. La gran mayoría de los kits comerciales están basados en la variante PCR en tiempo real, por ejemplo está el kit BACTOPLEX de Bioser, el IQCHEK de Biorad, el MERICON DETECTION OF *Salmonella* de Qiagen, y Salmofast (Microbial, 2012) el nivel de especificidad de algunos de ellos llega hasta subespecie con un límite de detección de 5 UFC/25g de muestra; Uno de los inconvenientes es el alto precio tanto del kit como del termociclador en tiempo real.

### **d) Estudios basados en PCR Multiplex**

McCarthy y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio en el cual analizaron por PCR Multiplex muestras de carne de pavo inoculadas artificialmente con distintos serotipos de *Salmonella* (Typhimurium, Heidelberg,

Dublin, Agona, Enteritidis) previamente enriquecidas por 18h, utilizaron iniciadores que amplificaban a la región STM2745 (5-CGGTCTGACCAATATCTCCA-3 y 5-GCCACCAGTCAGGTAGTGG-3), STM4492 (5-ACAGCTTGGCCTACGCGAG-3 y 5-GCAACCGTTCGGCCTGAC-3), al gen *OriC* (5-GCGGTGGATTCTACTCAAC-3 y 5-AGAAGCGGAACTGAAAGGC-3), los resultados mostraron un límite de detección de 6 UFC en un tiempo aproximado menor a 36h (McCarthy y col., 2009).

En un ensayo diseñado para detección de *Salmonella* por PCR se analizaron muestras de camarones contaminadas artificialmente por diferentes serotipos del patógeno, se emplearon iniciadores que amplificaban para los genes *himA*, *hto*, *fimA*, *invA* y *hns*; así como se realizó una PCR Multiplex con los 5 pares de iniciadores; obteniendo como límite de detección  $10^2$  UFC/g y un nivel de especificidad altamente significativo con un periodo de enriquecimiento de 8h (Jeyasekaran G, 2011).

Se reportó en el 2011 un estudio en el cual se analizaron por el método de PCR Multiplex muestras de camarones contaminadas artificialmente con *S. Typhimurium* previamente enriquecidas por 4h, utilizaron dos pares de iniciadores que amplifican para los genes *himA* e ITS. Los resultados mostraron un nivel de detección de  $10^2$  UFC/ml en un tiempo total de detección menor a 24h (Thirumalai y col., 2011).

#### **2.2.4. Diseño de iniciadores específicos para detección de *Salmonella***

En la actualidad el diseño de iniciadores se ha continuado haciendo con la finalidad de contar con iniciadores cada vez más específicos y que no den falsos positivos. Kim y colaboradores (2006) trabajaron en un proyecto en el que compararon el genoma de una cepa de referencia de *Salmonella Typhimurium* con otras enterobacterias, de ahí se seleccionaron 152 genes específicos del patógeno de estudio y posteriormente se definieron genes específicos de subespecie I y varios serotipos. Con base en lo anterior se diseñaron 38 pares de

iniciadores que se probaron con cultivos de cepas de colección. En este trabajo se propone el uso de estos iniciadores como un método de detección e identificación de *Salmonella* sin la necesidad de realizar pruebas serológicas.

Los iniciadores diseñados incluyen entre otros unos que son específicos para el género *Salmonella* (STM3098), otros para *S. enterica* subesp. I (STM4057) y otros específicos para el serotipo Typhimurium (STM4497). Estos iniciadores han sido utilizados exclusivamente para la identificación del patógeno ya aislado y no para su detección en muestras de alimentos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México se han hecho estudios en melón Cantaloupe, en donde se detectó que la fuente de contaminación por *Salmonella* fue el agua y las heces de iguanas, donde los serotipos aislados fueron Poona, Infantis y Anatum (Gallegos, y col., 2008).

Gutiérrez y colaboradores (2000) reportaron el aislamiento de *Salmonella* spp. en México, donde el 51% fue en muestras de comida rápida, 23% en productos cárnicos procesados, 22% en muestras de alimentos de tierra (pescado, pollo, carne de res), 3% en productos lácteos y 1% en huevos. Los resultados mostraron en aislados de humanos a Typhimurium, Enteritidis y Typhi como los serotipos más frecuentes (Gutiérrez y col., 2000).

En el estado de Michoacán Regalado (2011), en colaboración con el laboratorio estatal de salud pública (LESP), reportaron estudios realizados en distintas muestras de alimentos (carne de res y puerco tanto cruda como cocida, carne de pollo cocida, mariscos cocidos, ostión cocido, quesos, cremas y embutidos), las cuales fueron obtenidas en el periodo 2008-2009, a través del sistema de muestreo por la red de jurisdicciones sanitarias usado por el LESP. Las muestras se tomaron de manera aleatoria de tiendas, establecimientos comerciales, carnicerías, fondas, cocinas económicas y restaurantes. Para el análisis de las muestras se siguió la metodología de la NOM-114-SSA1-1994. Obteniendo al final del análisis el aislamiento de 130 cepas de *Salmonella*, de las cuales 19 de estas se aislaron de quesos, encontrando como serotipos frecuentes a Typhimurium, Anatum y Agona.

El procedimiento oficial para la detección de *Salmonella* spp. utilizado actualmente en México tanto por los servicios de salud pública como por los laboratorios de análisis de alimentos, emplea los métodos tradicionales basados en la NOM-114-SSA1-1994, sin embargo estos métodos presentan desventaja en cuanto al tiempo y la detección eficaz de dicha contaminación (Regalado, 2011).

Debido a que las técnicas de Biología Molecular basadas en PCR ya han sido incorporadas en países desarrollados en programas de vigilancia epidemiológica, es de esperar que en México se incorporen en un futuro cercano.

La incorporación del método PCR a un costo razonable en las dependencias de Salud Pública y empresas relacionadas con productos de alimentos contribuirán a disminuir significativamente la morbilidad ocasionada por *Salmonella* en el país

## 4. HIPOTESIS

Es posible detectar a *Salmonella enterica* en leche por PCR simple y multiplex utilizando iniciadores específicos de género, subespecie y serotipo, validados previamente en cultivos puros.

## 5. OBJETIVOS

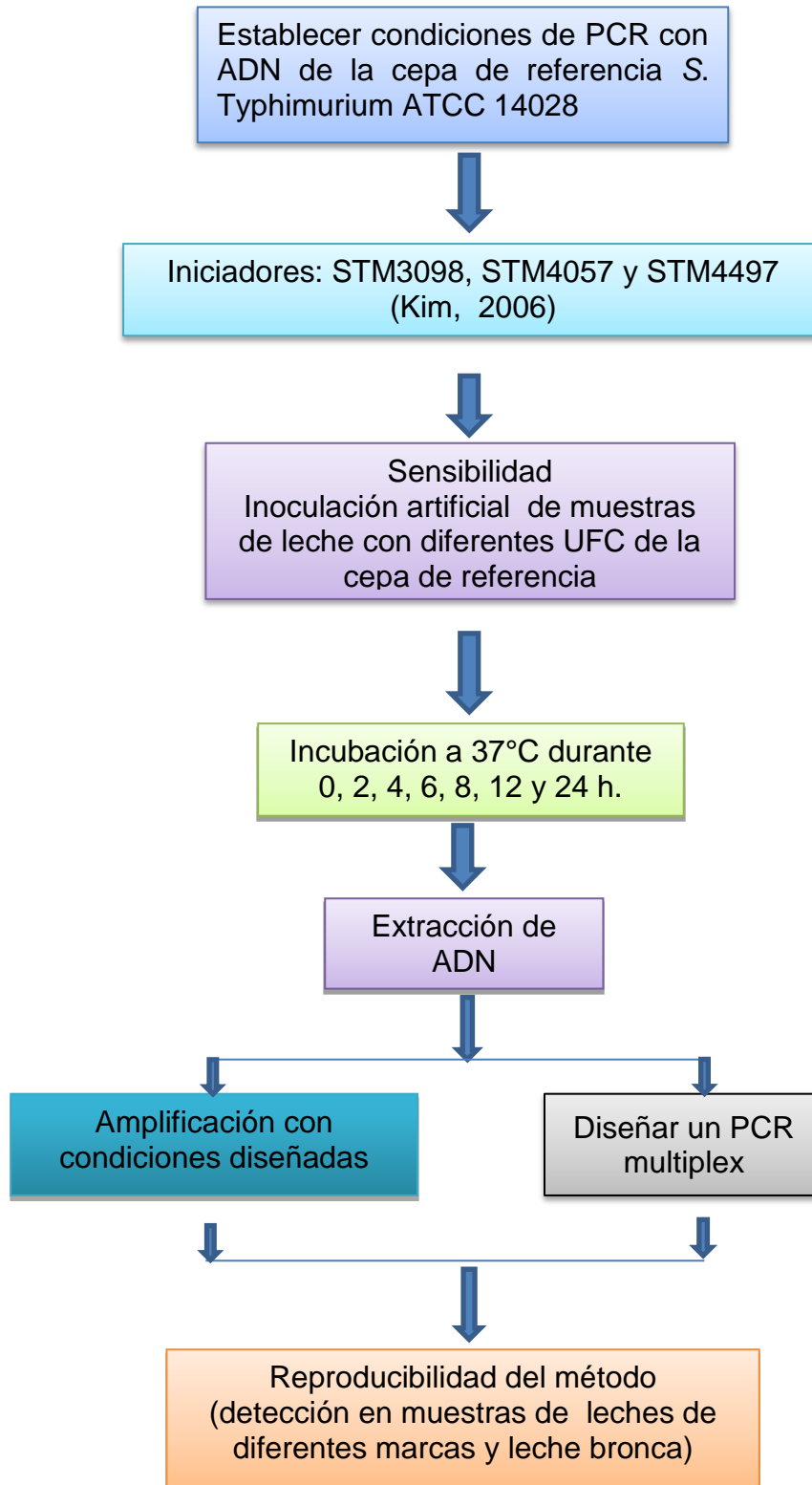
### 5.1 Objetivo General

Diseñar ensayos rápidos, de alta sensibilidad y reproducibles de PCR para la detección de *Salmonella enterica* en leche.

### 5.2 Objetivos Particulares

1. Diseñar un ensayo de detección en leche de *Salmonella enterica* mediante PCR simple y múltiplex.
2. Evaluar la sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos diseñados.
3. Desarrollar un ensayo multiplex para la identificación de *S. enterica*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material Biológico

#### 7.1.1 Microorganismos empleados y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *E. coli* ETEC. Las cepas conservadas en agar francés, se resembraron en tubos de ensayo con caldo Luria Bertani (LB), y posteriormente se incubaron 24 h a 35°C; después con ayuda de un asa bacteriológica se inocularon en placas con agar Luria Bertani (LBA) mediante la técnica de estriado en placa y se incubaron 24 h a 35°C (Hee, y otros, 2008), (Löfstrom, Knutsson, Axelsson, & Radström, 2004).

#### 7.1.2 Muestras de leche

Se utilizaron muestras pasteurizadas de leche entera de tres marcas distintas (A, B y C), las cuales fueron adquiridas en un supermercado. También se emplearon muestras de leche bronca obtenidas de 3 comunidades colindantes a la ciudad de Morelia: Álvaro Obregón, La Posta Veterinaria (UMSNH) y Téjaro.

### 7.2 Extracción de ADN de las cepas de referencia

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo como se describe a continuación. Se cosecharon aproximadamente 10 colonias de cultivos crecidos en Agar Luria Bertani por 24 h a 35 °C. Las colonias cosechadas se colocaron en un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 400 µl de regulador de lisis (Tris-HCl 100mM a pH=8.0, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%, NaCl 100mM y EDTA 50mM) y se agitaron en vórtex por 5 min. Posteriormente se añadieron 400 µl de fenol – cloroformo (1:1 v/v) y se homogenizó durante 5 min. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 9300 xg y se rescató la fase acuosa. El ADN se precipitó añadiendo a la fase acuosa recuperada el mismo volumen de isopropanol frío e incubando por 10 min a -20 °C. Nuevamente se centrifugó a 9300 xg por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla recuperada se lavó con 250 µl de

etanol al 70 %. Finalmente la pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada esterilizada. El ARN presente en las muestras se digirió con RNAsa incubando las muestras a 37 °C por 30min. La calidad de ADN se visualizó en geles de agarosa al 1 % teñidos con Bromuro de Etidio mediante técnicas convencionales (Sambrook & Russell, 2001). Las imágenes de los geles se adquirieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD, USA). Se obtuvo una única banda de alto peso molecular libre de ARN. El ADN obtenido se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

### 7.3 Diseño del Método mediante PCR simple

Para las diferentes reacciones de PCR punto final se utilizaron los iniciadores que se muestran en la Tabla 1

**Tabla 1. Iniciadores utilizados para las reacciones de PCR**

Especificidad	Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto amplificado
<b>Género Salmonella</b>	STM4057f	5' GGTGGCCTCGATGATTCCCG 3'	137 pb
	STM4057r	5' CCCACTTGTAGCGAGCGCCG3'	
<b>S. enterica subesp. I</b>	STM3098-f2	5TTTGGCGGCGCAGGCGATT3'	423 pb
	STM3098-r2	5GCCTCCGCCTCATCAATCCG3'	
<b>S. Typhimurium</b>	STM4497f	5'AACAACGGCTCCGGTAATGA3'	310 pb
	STM4497r	5'TGACAAACTCTTGATTCTGA 3'	

Con el propósito de encontrar las mejores condiciones para amplificar las diversas regiones específicas de *Salmonella* (STM4057, STM3098, STM4497), se probaron las siguientes condiciones: reacciones de 25 µL con Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.50mM, 0.4 µM de cada iniciador, 0.2mM de cada dNTP, 50ng de ADN de la cepa

de referencia y 0.5 U de Taq DNA polimerasa; el programa de amplificación siguiente: una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, seguido del alineamiento de 30 s a 65°C, continuando con 30 s a una temperatura de 72°C y finalmente un paso de 3 min a 72°C (Kim, 2006) y el ADN de la cepa de referencia. *S. Typhimurium* ATCC14028 y *E. coli* ETEC.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio (Luque & Herraes, 2008), posteriormente se observaron y se fotografiaron en un fotodocumentador *CHEMI-DOC Molecular viewer* (BIO-RAD, USA).

## 7.4 Sensibilidad del método

### 7.4.1 Preparación del inóculo de trabajo.

Las colonias bacterianas de la cepa de referencia pre-crecida en LBA, se resuspendieron en solución salina (0.85%), ajustando a una densidad óptica de 0.66 ( $\lambda = 600\text{nm}$ ) equivalente a  $10^8$  UFC/m. Después se realizaron diluciones seriadas de la suspensión para tener concentraciones finales de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 y 1 UFC/mL. El número de UFC/mL de cada dilución se corroboró sembrando 0.1 mL de cada una de las diluciones en placas de Petri con Agar Muller Hilton, y se hizo el conteo de colonias en placa.

### 7.4.2 Inoculación de las muestras de leche

Se depositaron 25 mL de leche entera pasteurizada en bolsas plásticas estériles y se inocularon con 1 mL de cada dilución ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 y 1 UFC/mL), incluyendo una muestra sin diluir y se procedió con el periodo de enriquecimiento (Day, Bassavanna, & Sharma, 2009).

### 7.4.3 Enriquecimiento

En una bolsa estéril de polipapel se mezclaron 225 mL de agua peptonada y 25 mL de leche entera pasteurizada inoculada artificialmente. Las muestras se

homogenizaron agitando vigorosamente unas 60 veces las bolsas cerradas (Hee et al., 2008). Cada una de las muestras ya inoculadas se incubó a 35°C durante 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24h; concluido el tiempo de incubación se procedió con la extracción de ADN de cada una de las muestras (NOM-114-SSA1-1994, 1994).

#### **7.4.4 Extracción de ADN de muestras de leche**

El proceso de extracción de ADN para todas las muestras de leche *enriquecidas y sin enriquecer se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo y fue el siguiente: se tomaron 500 µL de la muestra de leche ya procesada y se le adicionaron 500 µl de regulador de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100 mM y EDTA 50 mM) y se agitó vigorosamente por 10 min. Enseguida se añadieron 500 µl de fenol – cloroformo (1:1 v/v) y se homogenizó durante 5 min en el vórtex. Los tubos se centrifugaron por 10 min a 9300 x g y se rescató la fase acuosa a la que se agregó el mismo volumen de isopropanol frío y se incubó por 10 min a -20 °C para precipitar el ADN. Después se centrifugó a 9300 x g por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla recuperada se lavó con 250 µl de etanol al 70%, dejando secar a temperatura ambiente y resuspendiendo en 20 µl de agua desionizada esterilizada. Para visualizar la calidad de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio (Sambrook y Russell, 2001). Las imágenes de los geles se adquirieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC *Molecular viewer (BIO-RAD, USA)*. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta que fue requerido para realizar las reacciones de PCR (Oliveira, Rodenbusch, & Rocha, 2003).*

#### **7.4.5 Diseño del método mediante PCR Multiplex**

El diseño del ensayo PCR Multiplex se inició realizando una reacción de PCR simple con cada par de iniciadores mencionados en la tabla 1, probando las condiciones de amplificación establecidas, pero empleando la temperatura de alineamiento de 59°C y el ADN de la cepa de referencia con la finalidad de encontrar las condiciones que amplificaran con los tres pares de iniciadores (Tabla

1). Posteriormente ya establecidas las condiciones de amplificación, se realizó una prueba PCR Multiplex para comprobar que se obtuvieran los resultados esperados. Una vez establecidas las condiciones se realizó un ensayo de PCR múltiplex pero ahora con ADN de leche bronca enriquecida por el tiempo establecido en los ensayos de sensibilidad del método de PCR simple, se incluyó además un control positivo de amplificación con los iniciadores EUBAC dirigidos al gen 16S de RNAr (Tabla 2).

**Tabla 2. Iniciadores utilizados para las reacciones de PCR Multiplex (control positivo)**

Especificidad	Iniciador	Secuencia
<b>gen16S de RNAr</b>	EUBAC 27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
	EUBAC 1252r	5'AAGGAGGTGWTCCARCCGCA-3'

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador *CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD, USA)*.

### 7.5 Reproducibilidad de los ensayos diseñados

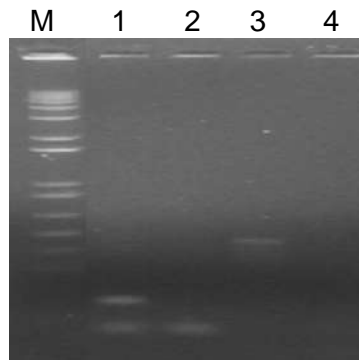
Una vez establecidas las condiciones de amplificación para cada par de iniciadores, la reproducibilidad del método se realizó utilizando leche entera pasteurizada de dos marcas distintas y tres muestras de leche bronca. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio, posteriormente se observaron y se fotografiaron en un fotodocumentador *CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD, USA)*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Estandarización de condiciones de amplificación utilizando PCR punto final, ADN de la cepa de referencia e iniciadores específicos de género *Salmonella*, subespecie I y serotipo Typhimurium

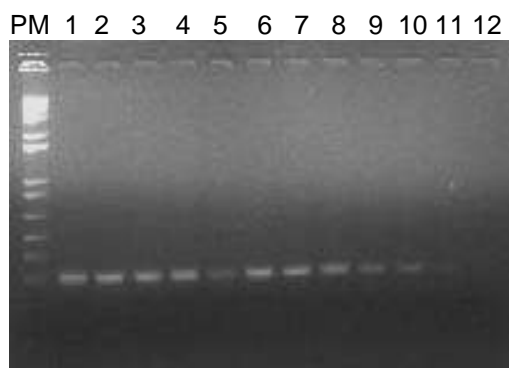
Para encontrar las condiciones óptimas de amplificación con los iniciadores específicos de género (STM 4057), subespecie I (STM 3098) y serotipo Typhimurium (STM 4497), se utilizó el ADN de la cepa de referencia. Se incluyó para cada reacción un control negativo (ADN de *E. coli*) y se utilizaron las mismas condiciones reportadas por Kim y colaboradores (año?): una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, alineamiento de 30 s a 65°C, y 30 s a 72°C con una extensión final de 3 min a 72°C (Kim et al., 2006) y reacciones de 25 µL con Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.50mM, 0.4 µM de cada iniciador (STM4057 y STM3098), 0.2mM de cada dNTP, 50ng de ADN de la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC y 0.5 U de Taq DNA polimerasa.

Se obtuvieron los amplicones esperados de 423pb con el par de iniciadores específicos de género, STM3098 (Fig. 1, carril 3) y de 137pb con el par de iniciadores específicos de subespecie I, STM 4057 (Fig. 1 carril 1); No se obtuvo amplicón con el control negativo (Fig. 1, carril 2), ni con los iniciadores STM4497 específicos de serotipo (Fig. 1 carril 4)



**Fig 1. Estandarización del ensayo de PCR con los iniciadores STM4057, STM3098, STM 4497 y ADN de la cepa de referencia.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: Carriles: PM, marcador de peso molecular; 1, PCR con iniciadores STM4057; 2, control negativo; 3, PCR con iniciadores STM3098); 4, PCR con iniciadores STM 4497.

Para obtener el amplicón esperado con los STM 4497 se decidió comenzar a cambiar las condiciones de la reacción; en primer lugar se cambió la temperatura de alineamiento, realizando un gradiente de 55 a 65°C, con las mismas concentraciones de reactivos (Fig. 2).



**Fig 2. Gradiente de temperatura de 55-65 °C para la estandarización con iniciadores específicos de serotipo Thyphimurium.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-11, amplificación con iniciadores STM4497 y temperaturas de alineamiento de 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 y 65°C respectivamente; 12, control negativo.

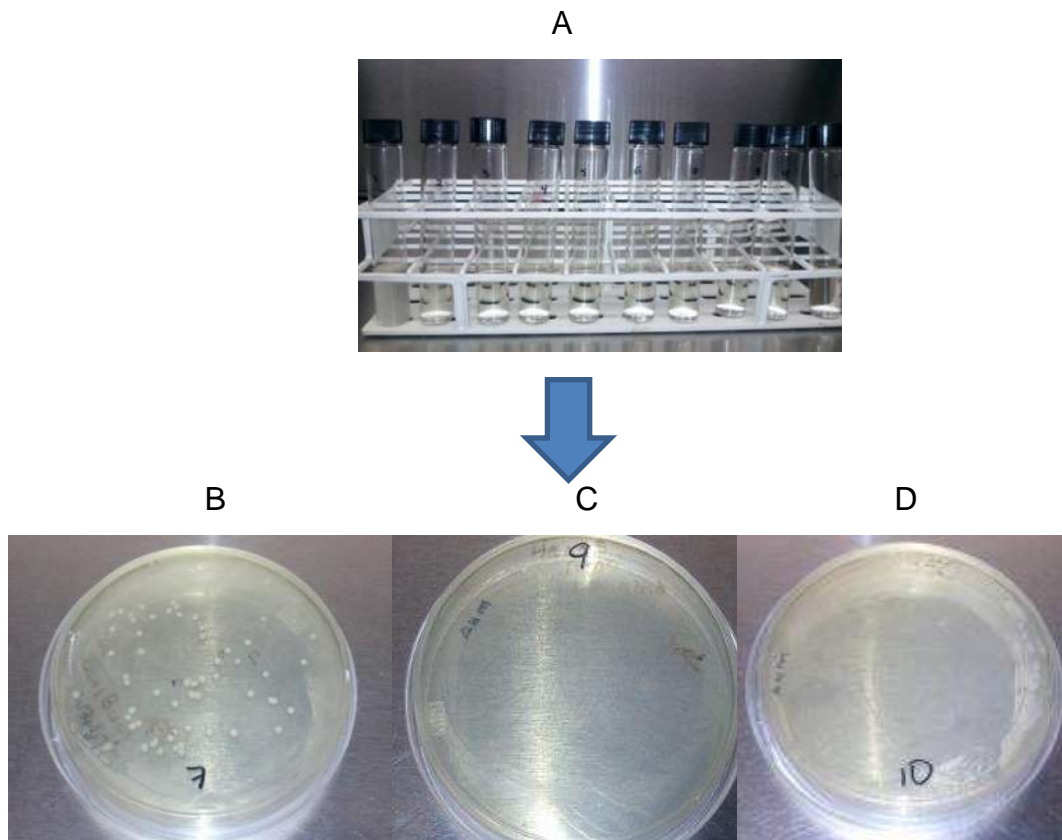
Se obtuvo el amplicón esperado de 310 pb en todos los casos excepto a la temperatura de 65°C. Se escogió la temperatura de alineamiento de 59°C, debido a que se observó una banda intensa y sin inespecificidades.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las condiciones de amplificación establecidas para las amplificaciones mediante PCR simple fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, seguido del alineamiento de 30 s a 65°C (iniciadores STM3098 y STM4057) y 59°C (iniciadores STM4497), continuando con 30 s a una temperatura de 72°C y finalmente un paso de 3 min a 72°C (Kim et al., 2006) y reacciones de 25 µL con Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.50mM, 0.4 µM de cada iniciador (STM4057 y STM3098), utilizando en todos los casos las siguientes condiciones de reacción: 0.2mM de cada dNTP, 50ng de ADN y 0.5 U de Taq DNA polimerasa.

## 8.2 Determinación de la sensibilidad del método

### 8.2.1 Conteo en placa de las UFC presentes en las diluciones seriadas

Las diluciones seriadas de la cepa de referencia y posterior resiembra en placas con Agar Muller Hinton, permitieron corroborar que las UFC/mL que había en cada dilución efectivamente fueron  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 y 1 UFC/ml (Fig.4), para que posteriormente se llevara a cabo la inoculación artificial de las muestras de leche con cada una de las diluciones.

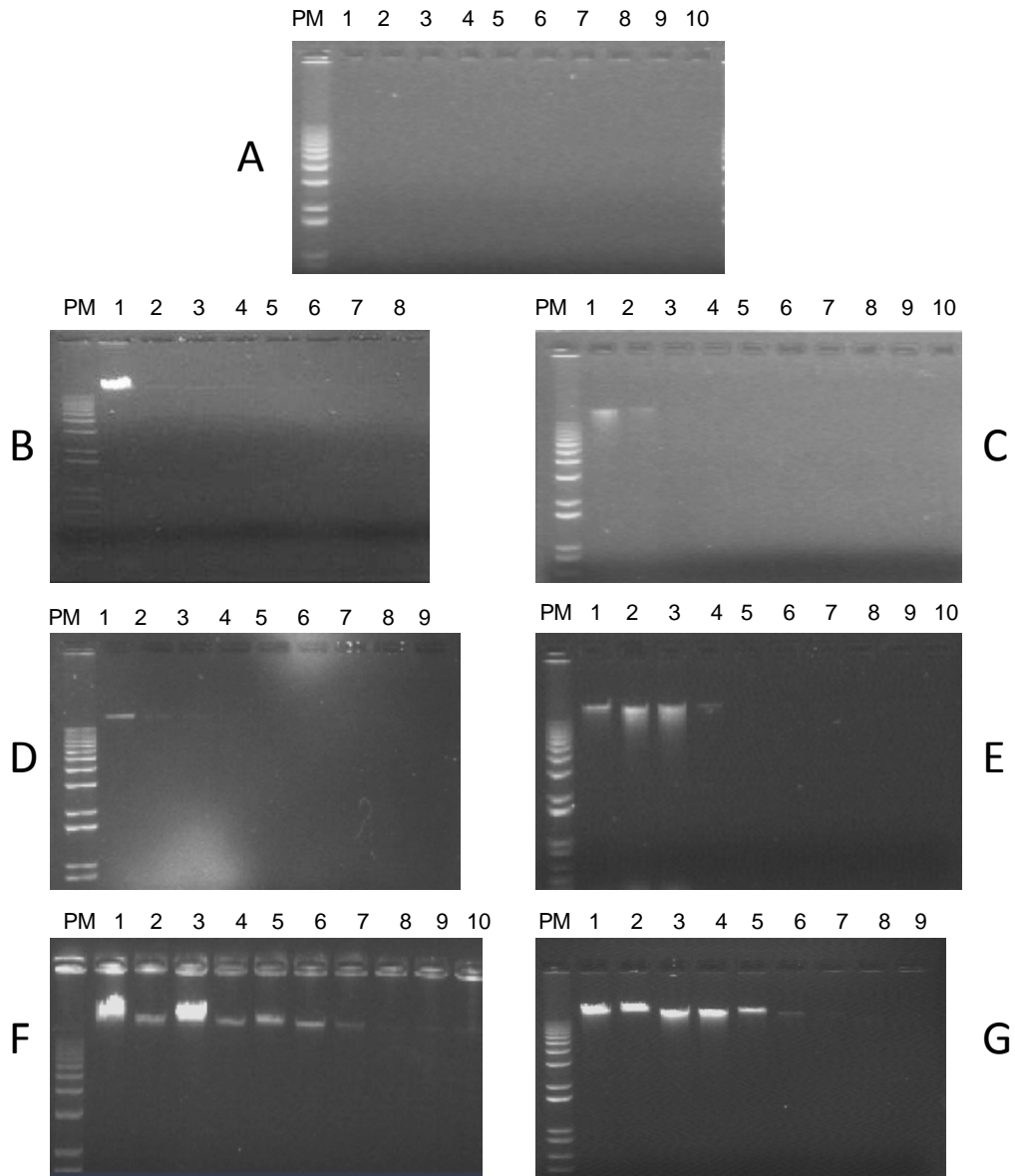


**Fig. 3 Conteo en placa de las UFC presentes en las diluciones seriadas.** A) Diluciones seriadas de la cepa de referencia. Cajas de Petri con Agar Mueller Hinton que contenían: (B) 100, (C) 10 y (D) 1 UFC respectivamente de *S. Typhimurium*. Se inocularon un total de 9 muestras de leche

### 8.2.2 Extracción de ADN de leche inoculada artificialmente

Se extrajo el ADN de las muestras de leche inoculadas con  $10^8$  a 1 UFC, más el control negativo sin inocular e incubadas por 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24h. La cantidad

de ADN obtenido fue proporcional a la cantidad de UFC inoculadas y al tiempo de enriquecimiento, obteniéndose mayor cantidad en las muestras inoculadas con  $10^8$  UFC y enriquecidas por 24 h (Fig. 4).

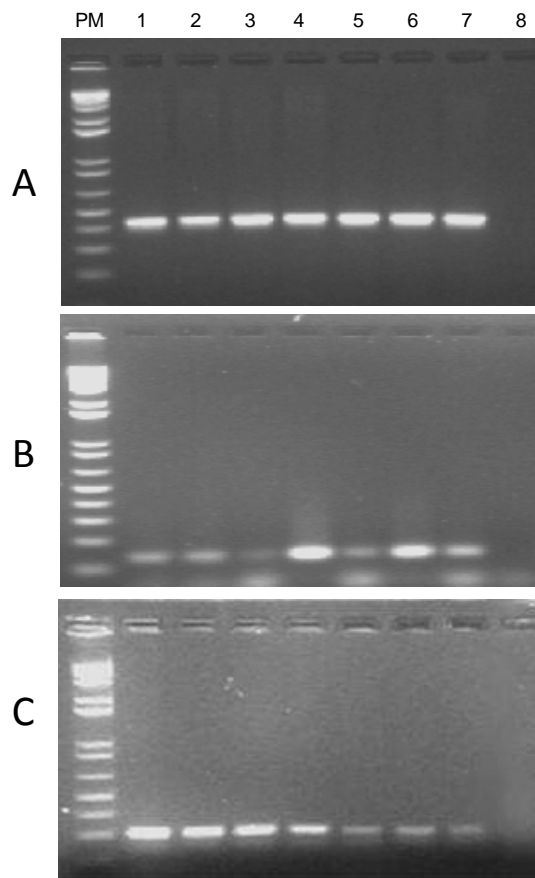


**Fig. 4 ADN extraído de muestras de leche inoculadas y enriquecidas.** Gel de agarosa al 1.5 % que muestra Carriles: M, marcador de peso molecular; 1 al 10, ADN extraído de muestras inoculadas con  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 1 y 0 UFC, enriquecidas por A) 0, B) 2, C) 4, D) 6, E) 8, F) 12 y G) 24h.

A continuación se cuantificó el ADN presente en todas las muestras, independientemente de que la banda se visualizara o no y así realizar las reacciones de PCR.

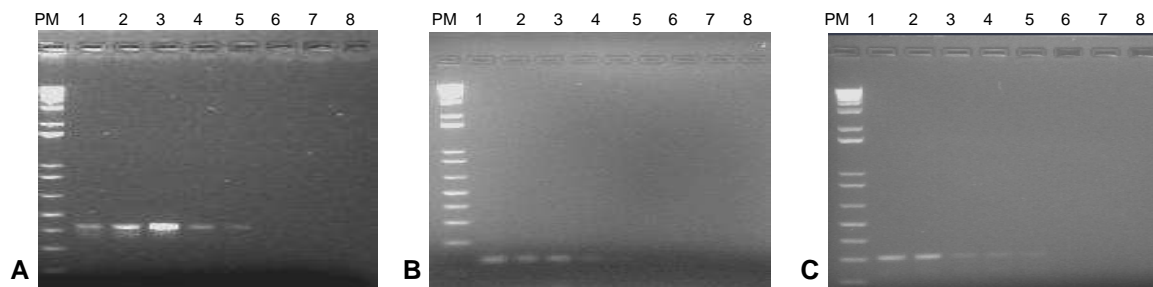
### 8.2.3 Ensayos de PCR con ADN de leche inoculada artificialmente.

Para asegurarnos de obtener un amplicón en las reacciones de PCR simple, se utilizaron las condiciones de amplificación establecidas, empleando ADN de muestras de leche inoculadas con la mayor cantidad de UFC ( $10^8$ ) y enriquecidas por 24, 12, 8, 6, 4, 2 y 0h. Se obtuvieron en todas las reacciones los amplicones esperados, el de 423pb con los iniciadores STM 3098 (Fig. 5A), de 137 pb con los iniciadores STM 4057 (Fig. 5B) y 310pb con los iniciadores STM 4497 (Fig. 5C)



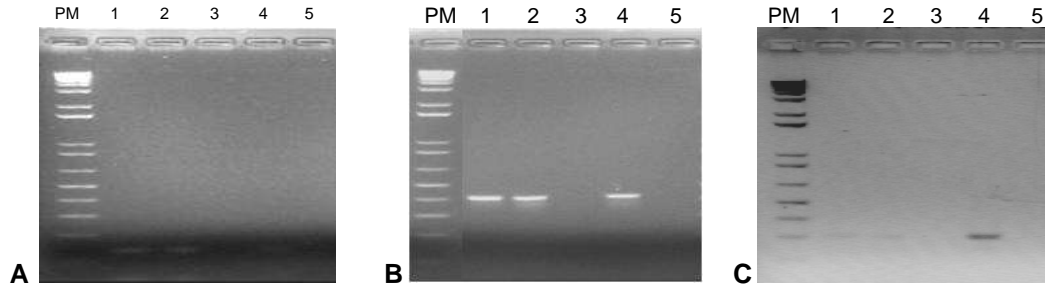
**Fig. 5 Amplicones obtenidos con el programa de amplificación establecido y ADN de leche inoculada con  $10^8$  UFC/mL.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra: Carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-7 PCR con 50 ng de ADN de muestras inoculadas con  $10^8$  UFC/mL y enriquecidas por 24, 12, 8, 6, 4, 2 y 0h; 8, control negativo (*E. coli*) con iniciadores (A) STM 3098, (B) STM 4057 y (C) STM4497.

Ya que dos de las características deseables del método diseñado son la rapidez y la alta sensibilidad, se decidió reducir el tiempo de enriquecimiento y probar si el ensayo era capaz de detectar la mínima cantidad de UFC inoculadas, se optó por realizar las amplificaciones con el ADN de muestras de leche inoculadas con  $10^4$  UFC/mL y enriquecidas por 24, 12, 8, 6, 4, 2 y 0h. Solo se obtuvieron los amplicones esperados con todos los 3 pares de iniciadores probados, en las reacciones con ADN de leche enriquecida por 24, 12, 8, 6 y 4h (Fig.6).



**Fig. 6 PCR simple con ADN de leche inoculada con  $10^4$  UFC/mL.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: Carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-7 amplicones obtenidos con 50 ng ADN de leche inoculada con  $10^4$  UFC utilizando los iniciadores A) STM 3098; B) STM 4057 y C) STM4497, enriquecidos por 24, 12, 8, 6, 4, 2 y 0h respectivamente; 8 control negativo (*E. coli*).

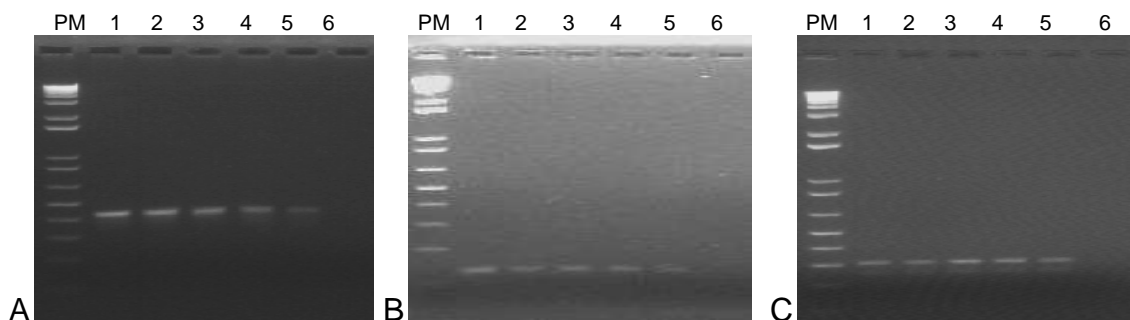
Con la finalidad de continuar con la determinación de la sensibilidad del ensayo, se realizaron amplificaciones empleando ahora ADN de leche inoculada con  $10^3$  UFC/mL y enriquecidas con el menor tiempo con el cual se obtuvieron los amplicones deseados en la amplificación con ADN de muestras inoculadas con  $10^4$  UFC/mL, es decir 4, 2 y 0h. Se obtuvieron los amplicones esperados en las 3 reacciones (Fig.7).



**Fig. 7 PCR simple con ADN de leche inoculada con  $10^3$  UFC/mL.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM marcador de peso molecular; 1-4 amplicones obtenidos con 50 ng de ADN de muestras enriquecidas por 4, 2 y 0h, utilizando los iniciadores (A) STM 3098, (B) STM 4057 y (C) STM4497; 5, control negativo (ADN de *E. coli*)

Para buscar si el ensayo tenía una sensibilidad mayor, se realizaron otras reacciones PCR utilizando ADN de leche inoculada con  $10^2$  UFC/mL y enriquecidas por 4, 2 y 0h, pero no se obtuvieron los amplicones esperados (datos no mostrados).

Para saber si nuestro método era capaz de detectar una menor cantidad de UFC, se decide realizar una serie de reacciones PCR punto final empleando ADN de leche inoculada con  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , y 1UFC/mL pero enriquecidas por 12h, tiempo menor a las 24h que marca la NOM-114-SSA1-1994 para la detección de *Salmonella* en alimentos. Al final de las reacciones se obtuvieron los amplicones esperados con el ADN de todas la muestras de leche inoculadas que se utilizaron (Fig. 8).

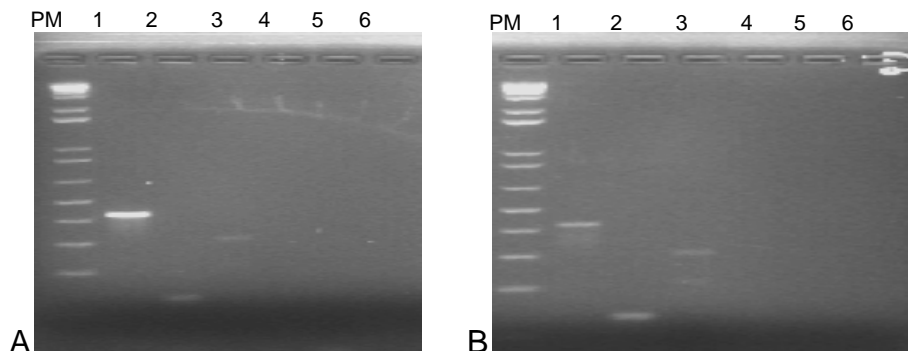


**Fig. 8 PCR simple con ADN de leche inoculada con  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y 1UFC/mL enriquecida por 12 h.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-5 PCR con ADN de leche inoculada con  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , y 1 UFC/mL respectivamente y utilizando los iniciadores (A) STM 3098, (B) STM 4057 y (C) STM4497; 6, control negativo (ADN de *E. coli*)

Con todos los resultados obtenidos podemos afirmar que se diseñaron dos métodos para detectar *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en leche. El primero con una sensibilidad de  $10^3$ UFC/ mL con un tiempo de enriquecimiento de 2h y el segundo con una sensibilidad de 1 UFC/mL con un enriquecimiento de 12h. Las condiciones de los ensayos diseñados se utilizaron para la evaluación de la reproducibilidad del método.

### 8.3 Reproducibilidad del ensayo diseñado

Primeramente se llevó a cabo la inoculación artificial de muestras de leche de 2 marcas distintas (marca b y marca c) con  $10^3$  UFC/mL, estas se mezclaron con 225mL de agua peptonada y se enriquecieron durante 2h, concluido este tiempo se extrajo el ADN mediante la técnica antes descrita para realizar posteriormente las reacciones de PCR con las condiciones de amplificación establecidas en el apartado 6.3 para cada par de iniciadores y el ADN extraído en esta etapa incluyendo además un control negativo (ADN de *E. coli*). Al final de las reacciones se obtuvieron los 3 productos de amplificación esperados con el ADN de ambas muestras de leche (Fig. 9).

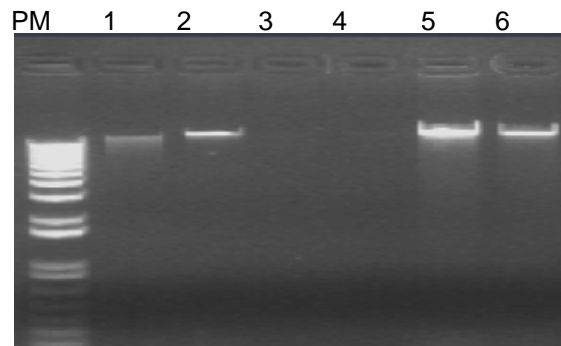


**Fig.9 PCR simple con ADN de leche inoculada de  $10^3$  UFC/ml, enriquecida por 2 h, empleando dos marcas de leche (b y c).** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra: los carriles: PM marcador de peso molecular; 1-3 PCR con iniciadores STM 3098, STM 4057 y STM4497 respectivamente; 4-6 control negativo con cada par de iniciadores mencionado y el ADN de *E. coli*. A) muestra de leche b; B) muestra de leche c.

Al término de esta prueba se pudo comprobar que el ensayo PCR punto final fue reproducible ya que fue capaz de detectar 40 UFC con un tiempo de detección total de 10 h.

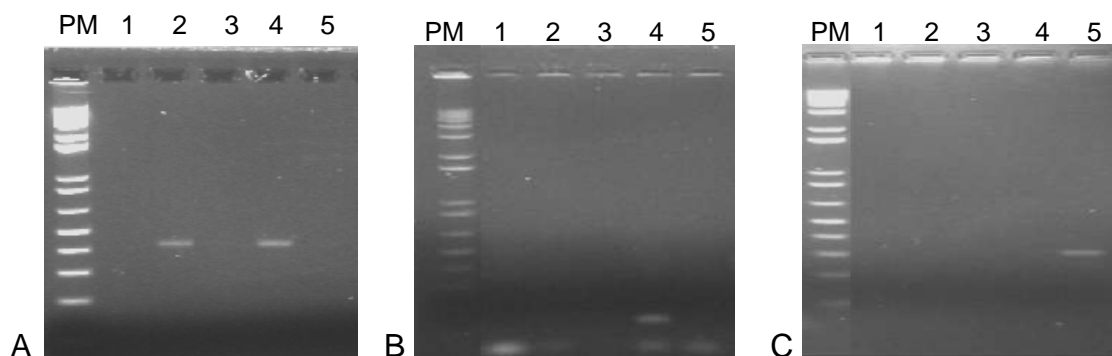
Una vez evaluadas la sensibilidad y reproducibilidad del método, se probó en tres muestras de leche bronca con sospecha de contaminación con el patógeno de estudio; estas fueron obtenidas de distintas comunidades de la ciudad de Morelia; las muestras fueron adicionadas con agua peptonada, se enriquecieron durante 2h y se le extrajo el ADN al concluir dicho periodo (Fig. 10).

El ADN obtenido en todos los casos fue de buena calidad y con distintos rendimientos.



**Fig. 10 ADN de muestras de leche bronca enriquecidas por 2 h.** Gel de Agarosa al 1 % teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, peso molecular; 1 y 2 ADN de leche bronca de Tégjaro; 3 y 4 ADN de leche de La Posta; 5 y 6 ADN de leche de Álvaro Obregón.

Posteriormente se realizaron las reacciones PCR con las condiciones de amplificación ya diseñadas y el ADN de las 3 muestras de leche bronca (Tégjaro, La Posta y Álvaro Obregón). Al termino del proceso, no se obtuvieron los amplicones con el ADN de la leche de las comunidades de Tégjaro y Álvaro Obregón, únicamente se obtuvo en la PCR con el ADN de la leche de la Posta y el par de iniciadores específico de género STM 3098 mas no se obtuvieron productos de amplificación con los otros pares de iniciadores para el caso de este ADN (Fig. 11).



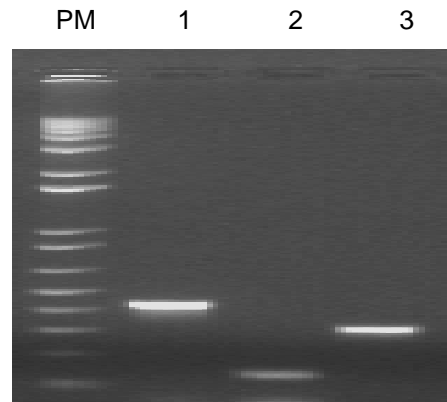
**Fig. 11 Detección de *Salmonella Typhimurium* mediante PCR simple en leche bronca.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1, PCR con ADN de leche de Tájaro; 2, PCR con ADN de leche de La Posta; 3, PCR con ADN de leche de Álvaro Obregón; 4, Control positivo con ADN de la cepa ATCC y 5, control negativo con ADN de *E. coli*.utilizando los iniciadores (A) STM 3098, (B) STM 4057 y (C) STM 4497

Como se puede observar en la Fig.11 A, se obtuvo un amplicón con el ADN de la leche de la Posta y el par de iniciadores específico de Género, lo cual nos indica que podría tratarse de cualquier otra subespecie de este patógeno.

Al igual que en las pruebas anteriores en donde se emplearon leche de dos marcas diferentes, se pudo evaluar y comprobar la reproducibilidad del ensayo diseñado.

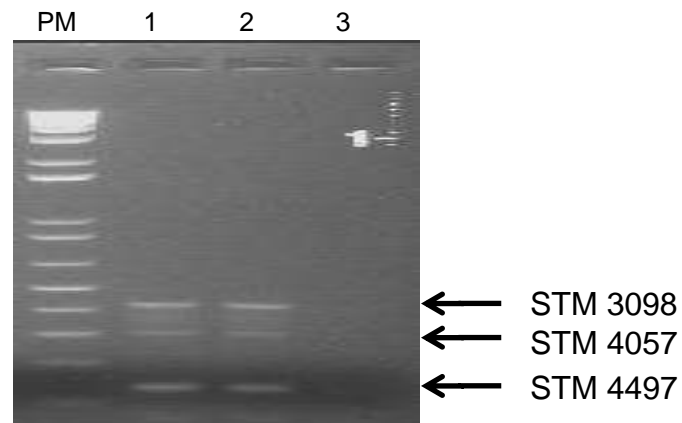
#### 8.4 Ensayo PCR Multiplex con ADN de la cepa de referencia

Para encontrar las condiciones comunes de amplificación con los tres pares de iniciadores (Tabla 1) se probaron las concentraciones ya establecidas en el método de PCR simple, reacciones de 25  $\mu$ L con Buffer 1X,  $MgCl_2$  1.50mM, 0.4  $\mu$ M de cada iniciador (STM4057, STM3098 y STM4497 ), 0.2mM de cada dNTP, 50ng de ADN de la cepa de referencia y 0.5 U de Taq DNA polimerasa con el siguiente programa de amplificación: una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, seguido del alineamiento de 30 s a 59°C, continuando con 30 s a una temperatura de 72°C y finalmente un paso de 3 min a 72°C (Kim et al., 2006). Primero se realizaron las reacciones con la variante de PCR simple obteniendo los productos de amplificación esperados con cada uno de los tres pares de iniciadores (Fig.12).



**Fig. 12 PCR simple con ADN de la cepa de referencia a una Temperatura de alineamiento de 59°C.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-3 PCR con 50 ng de ADN de la cepa de referencia y con los iniciadores STM 3098, STM 4057 y STM 4497, respectivamente.

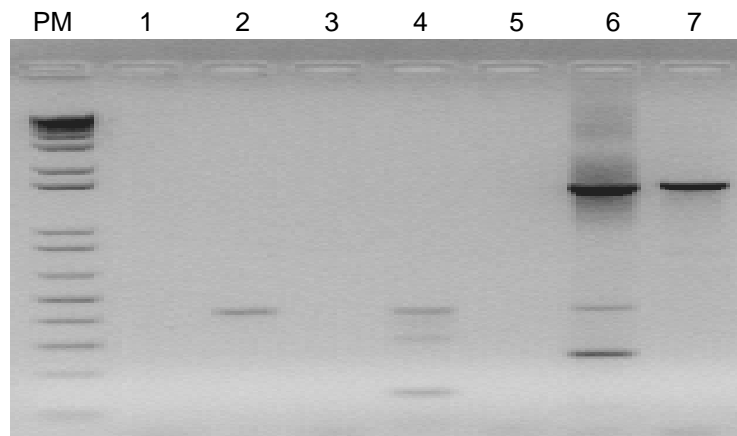
Posteriormente se realizó un PCR Multiplex con las mismas condiciones establecidas y mencionadas anteriormente, utilizando ADN de la cepa de referencia. Los resultados fueron favorables ya que en una misma reacción se obtuvieron los 3 productos de amplificación esperados (Fig.13).



**Fig.13 Detección de *S. Typhimurium* mediante PCR Multiplex en leche inoculada artificialmente con la cepa ATCC 14028.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1-2 PCR multiplex con iniciadores STM 3098 STM 4057 y STM 4497; 3, control negativo (*E. coli*).

### 8.5 Detección de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium mediante PCR Multiplex en leche bronca

Una vez establecidas las condiciones para la amplificación mediante PCR multiplex, se decidió hacer la detección del patógeno en leche bronca de las tres comunidades ya mencionadas. En esta prueba se incluyó un control positivo de amplificación utilizando el ADN de cada una de las muestras de leche y los iniciadores EUBAC 25f y EUBAC 1525 específicos para el gen 16S de RNAr, obteniendo el amplicón esperado de 423 pb con el ADN de la leche bronca de la comunidad de La Posta (Fig. 14, carril 2).



**Fig.14 PCR multiplex con ADN de leche bronca de 3 comunidades y de la cepa de referencia.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra los carriles: PM, marcador de peso molecular; 1 PCR Multiplex con ADN de leche de Téjaro; 2, PCR Multiplex con ADN de leche de La Posta; 3, PCR Multiplex con ADN de leche de Álvaro Obregón; 4, Control positivo (ADN ATCC 14028); 5, control negativo (ADN *E. coli* ETEC); 6, Control positivo con iniciadores EUBAC y ADN leche bronca de Téjaro; 7, Control positivo con iniciadores EUBAC y ADN de la cepa ATCC 14028).

## 9. DISCUSIÓN

El presente estudio representa el primer trabajo en que la selectividad de los oligonucleótidos STM3098, STM4057 y SM4497 específicos del género *Salmonella*, subespecie I y serotipo Typhimurium respectivamente, se utilizan para la detección de *Salmonella* en leche, tanto en un ensayo de PCR simple como múltiple. Estos iniciadores fueron diseñados en un proyecto en el cual se probaron con 137 cepas distintas de colección pero que no habían sido probados en alimentos.

Los iniciadores específicos de subespecie I (STM 4057) ya habían sido probados en conjunto con otros cuatro pares de iniciadores en un ensayo de PCR Multiplex, con la finalidad de identificar en cultivo a distintas subespecies de *Salmonella* (Lee, y otros, 2009). En un estudio similar se utilizaron los tres pares de iniciadores empleados en el presente trabajo (STM3098, STM4057 y SM4497) en conjunto con otros dos pares de iniciadores (IE y STY 1599) específicos de *S. Enteritidis* y *S. Typhi* respectivamente, probándolos con 80 cepas de colección de *Salmonella* de distintas serovariedades y 25 cepas diferentes a *Salmonella*, tanto con PCR punto final como con PCR multiplex (Park, Kim, Cho, Kim, & Hwa, 2009).

En nuestro estudio se empleó la inoculación artificial de leche con una cepa de referencia de *Salmonella* Typhimurium como control positivo y una cepa de *E. coli* como control negativo.

Para optimizar el ensayo de PCR simple se realizó una modificación al protocolo original de PCR simple (Kim, 2006), que consistió en la disminución de la temperatura de alineamiento a 59°C con los iniciadores STM4497. Las temperaturas de alineamiento utilizadas con los otros iniciadores fue la misma que el protocolo original, con ello se obtuvieron los productos esperados de 423pb, 137pb y 310pb con los iniciadores STM3098, STM4057 y STM4497 respectivamente. Corroborando con esto la necesidad de establecer las condiciones de amplificación en cada laboratorio y para cada matriz utilizada. Establecidas las condiciones para cada par de iniciadores, se diseñó un método

reproducibile que comprendía un enriquecimiento inicial de 2h, con una sensibilidad de 1 UFC mL.

En el caso de la variante de PCR Multiplex, para obtener los productos de amplificación esperados se utilizó temperatura de alineamiento de 59°C establecida para los iniciadores STM4497, que fue la más baja de las tres temperaturas. Con esto se logró la amplificación simultánea de las 3 secuencias de estudio en una misma reacción.

Comparando el método de PCR diseñado con el método de cultivo convencional, podemos observar una ventaja en cuanto a tiempo de procesamiento de la muestra y obtención de resultados, nuestro método se lleva aproximadamente 10h, comparado con la técnica de cultivo que se lleva de 4 a 6 días. El nivel de detección obtenido fue de  $10^3$  UFC/25mL de leche y presentando un grado de especificidad hasta nivel de serotipo. Cabe destacar que la detección por PCR se realizó a partir del caldo de enriquecimiento, lo cual es recomendado por la literatura y la norma NOM-114-SSA1-1994, para aumentar la posibilidad de detectar microorganismos viables en el alimento (Lauri & Mariani, 2009), logrando obtener los amplicones esperados después de 2h de enriquecimiento, con el incremento del periodo de enriquecimiento a 12h se está aumentando la eficiencia de la detección; no obstante al emplear el tiempo de incubación más corto, obtenemos los resultados esperados; este ensayo comparado con otros estudios muestra un mayor ahorro en cuanto al tiempo de procesamiento de la muestra y por consecuencia la obtención de resultados en un menor lapso de tiempo.

El ensayo diseñado con la variante PCR simple se repitió utilizando las condiciones ya optimizadas y empleando otras dos marcas diferentes de leche entera pasteurizada y 3 muestras de leche bronca obtenida de distintas comunidades; obteniendo resultados negativos para el caso en el que se emplearon las muestras de leche entera pasteurizada y detectando la presencia de *Salmonella* solo a nivel de género, pero no de la subespecie 1 ni del serotipo Typhimurium, en la muestra de leche bronca obtenida de La Posta. Con estos resultados pudimos además comprobar la reproducibilidad del método.

Estableciendo una comparación con otros estudios (Tabla 3) por ejemplo el realizado por Villarreal (2008) en donde el objetivo del trabajo era similar al nuestro, la detección de *Salmonella* en alimentos utilizando leche en polvo; el ensayo realizado fue capaz de detectar 2 UFC/mL de muestra, empleando un tiempo de enriquecimiento de 6 h, presentó un nivel de especificidad de género, es decir solo detectaba si era *Salmonella* o no, esto debido al empleo de iniciadores específicos de género 139-141 que amplifican al gen *Inv A*, además estos han sido objeto de estudio en otras investigaciones restándole originalidad al ensayo. En el estudio lograron la detección del patógeno mediante la técnica PCR punto final en un tiempo total de 12 h, el cual es mayor comparado con el tiempo requerido en nuestro ensayo (Villareal, 2008).

En un trabajo en el que se realizó una estandarización de la técnica de PCR punto final para análisis de *Salmonella* de distintos serotipos en diferentes muestras de mariscos (camarón, pescado) inoculadas artificialmente y posterior enriquecimiento por 8h, ya que con este tiempo era suficiente para obtener en la mayoría de las muestras inoculadas resultados positivos, obteniendo un límite de detección de 2 UFC/25g de muestra, en este estudio el nivel de especificidad fue de género, empleando los iniciadores 139-141 que amplifican un producto de 284pb para el gen *invA*; al hacer una comparación con el ensayo diseñado en el presente trabajo, presentó desventajas en cuanto al tiempo en que se obtienen los resultados y al grado de especificidad; además que no se comprobó la reproducibilidad del método con muestras que estén contaminadas de manera natural (Kumar R, 2008).

En el 2009 Gallegos y colaboradores establecieron las condiciones para detectar *Salmonella* Typhimurium en muestras de carne de res mediante PCR punto final y lo compararon con el método convencional, donde ambos mostraron un nivel de sensibilidad igual, teniendo un límite de detección de 1 UFC/25 g de muestra, siempre y cuando la muestra fuera enriquecida por 24h, no obstante se reitera la obtención de resultados en un periodo de tiempo menor en el método por PCR; además evaluaron la reproducibilidad del método no solo analizando 50 muestras

de carne de las cuales 4 resultaron positivas con el ensayo PCR y con el método convencional; también evaluaron el método de detección en 25 muestras de melón, obteniendo 4 resultados positivos con ambos métodos (Gallegos, 2009).

En un estudio se diseñaron un par de iniciadores Sef.B127L (5'-GATTGGGCACTACACGTGT-3') y SefB661R (5'-TGTA CTCCACCAGGTAATTG-3') que amplificaran para el gen *sefb* de *Salmonella* Enteritidis, se emplearon en un ensayo en el que se analizaron 10 muestras de pollo, ensaladas y huevos, las cuales se contaminaron artificialmente con el patógeno de estudio, estas fueron enriquecidas por 8h, obteniendo un límite de detección de 10 a  $10^3$  UFC /g y un nivel de especificidad de serotipo, posteriormente evaluaron el método diseñado en 285 muestras de carne de pollo, obteniendo de esta 3 muestras positivas con alrededor de  $5 \times 10^6$  UFC/g (Wang S.. et al, 2009).

Matías y colaboradores (2010) diseñaron un proyecto en el que evaluaron la técnica de PCR punto final para detección de especie de *Salmonella*, analizando un total de 120 muestras de canales de pollo con un enriquecimiento previo de 24h como lo marca la norma ISO 6579:2005, amplificando con iniciadores para el gen *invA*; los resultados obtenidos los compararon con el método microbiológico, concluyendo que su ensayo era capaz de detectar  $3.3 \times 10^7$  UFC/ml, al comparar su método con el microbiológico se corroboraron las ventajas que presenta la técnica por PCR respecto al convencional (Matías et al, 2010).

**Tabla 3. Comparación de diversos ensayos PCR para detección de *Salmonella* en alimentos**

Características Método	Muestra	Nivel de sensibilidad	Especificidad	Tiempo de enriquecimiento	Tiempo de detección
Villareal et al, 2008	Leche entera en polvo	2UFC	Género	8h	12h
Kumar et al, 2008	Mariscos	2 UFC	Género	8h	24h
Gallegos et al, 2009	Carne de res	1 UFC	Serotipo	24h	36h
Wang S. et al, 2009	Diversas muestras de alimento	10 UFC	Serotipo	8h	24h
Meléndez et al, 2013	Leche entera pasteurizada	40 UFC	Serotipo	2h	10h

Por otro lado los resultados obtenidos en el presente trabajo con la variante PCR Multiplex y muestras de leche bronca, fueron una manera de comprobar que efectivamente está presente el patógeno a nivel género, además de verificar la reproducibilidad del método, el cual presenta una gran ventaja respecto al ensayo con PCR punto final, en cuanto al tiempo de detección y ahorro de reactivos, ya que en este caso es menor porque en una sola reacción obtenemos los resultados esperados.

McCarthy y colaboradores (2009) (Tabla 4) desarrollaron un proyecto en el que analizaron por PCR Multiplex muestras de carne de pavo inoculadas artificialmente con diferentes serotipos de *Salmonella* (Typhimurium, Heidelberg, Dublin, Agona, Enteritidis) enriquecidas por 18h, empleando iniciadores que

amplificaban a la región STM4492, al gen *OriC*, cuyo nivel de especificidad era hasta serotipo, el nivel de sensibilidad del método fue de 6.1 UFC, lo que hay que resaltar es que estos iniciadores con anterioridad han sido empleados para detección del patógeno en alimentos, caso contrario a nuestro método (McCarthy y col., 2009).

En un análisis por PCR de *Salmonella* en muestras de camarones contaminados artificialmente por diferentes serotipos del patógeno, se llevó a cabo utilizando iniciadores que amplificaban para los genes *himA*, *hto*, *fimA*, *invA* y *hns*, además se montó una PCR Multiplex con los 5 pares de iniciadores; obteniendo en el proyecto como límite de detección  $10^2$  UFC/g y un nivel de especificidad altamente significativo con un periodo de enriquecimiento de 8h tanto con la variante PCR simple como con la variante PCR Multiplex (Jeyasekaran y col., 2011).

**Tabla 4. Comparación de ensayos PCR Multiplex para detección de *Salmonella* en alimentos**

Características Método	Muestra	Nivel de sensibilidad	Especificidad	Tiempo de enriquecimiento	Tiempo de detección
McCarthy et al, 2009	Carne de pavo	6.1 UFC	Serotipo	18h	24h
Jeyasekaran G. et al, 2011	Mariscos	100UFC	Subespecie	8h	24h
Meléndez et al, 2013	Leche entera pasteurizada	40 UFC	Serotipo	2h	10h

El método optimizado en el presente trabajo basado en detectar *S. Typhimurium* por PCR en leche, no presentó dificultades a la hora de la inoculación bacteriana, ni en la extracción de ADN en donde los resultados obtenidos de la extracción fue satisfactoria y suficiente para las reacciones PCR, en cuanto al nivel de sensibilidad y especificidad del método fue muy alto ya que se detectaron 40

UFC a un nivel de serotipo con una duración total aproximada de 10 a 11h que comparado con otros estudios es menor.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten inferir en la importancia de utilizar técnicas seguras para obtener resultados confiables. La ausencia de *Salmonella* en las muestras de leche sin contaminar puede evidenciar el adecuado manejo de esta por parte de los trabajadores de este sector productivo. El resultado positivo de la leche obtenida de la comunidad de La Posta es un hallazgo que pone de manifiesto la necesidad e importancia de implementar normas de seguridad, higiene y manejo por parte de los trabajadores, así como se tiene la necesidad de hervir adecuadamente y por el tiempo que se requiere a la leche a altas temperaturas con el fin de eliminar este microorganismo.

La utilidad de la prueba de PCR para detección de diversas regiones, está basada en la posibilidad de utilizarla para detectar contaminación por este patógeno desde un nivel género hasta serotipo en leche y otras muestras de alimentos (Pérez y col., 2008). La PCR Multiplex confirma los resultados obtenidos por la variante PCR punto final, confiando que el resultado es verdadero.

Por otro lado los costos para la detección molecular de *Salmonella* son un poco mayores en comparación con los métodos tradicionales, pero la alta sensibilidad y especificidad que ofrece la PCR, los beneficios al sector salud al lograr un diagnóstico rápido y preciso, la relación costo-beneficio que otorgaría al sector productivo permitiendo la liberación de producto alimenticios al mercado con mayor rapidez y el ahorro de costos, justificarían la implementación de esta técnica. Este trabajo presenta potencial diagnóstico y epidemiológico para la detección del patógeno, además que se convierte en el punto de partida para realizar más investigaciones para profundizar en el tema.

## 10. CONCLUSIONES

- i. Se diseñaron dos protocolos, uno de PCR simple y otro multiplex para la detección de *Salmonella enterica* en leche entera que utiliza iniciadores específicos de género, subespecie y serotipo.
- ii. Fue necesario un paso de enriquecimiento de 2h para amplificar las regiones STM3098, STM4057 y STM4497 directamente de leche.
- iii. Al emplear 59°C como temperatura de alineamiento para la región STM4497, se establecieron las condiciones óptimas para amplificar esta región y también para realizar las reacciones PCR Multiplex.
- iv. La mayor contribución de este estudio fue el desarrollo de un ensayo capaz de detectar 40 UFC de *Salmonella* con un tiempo total de detección de 10h.
- v. El método fue reproducible y rápido, agilizando marcadamente el tiempo de detección de un microorganismo de importancia en salud pública y en el sector productivo.
  
- vi. Existe la posibilidad de emplear la misma metodología para detección de este patógeno en otros alimentos y aplicar los resultados de este estudio para implementar controles sanitarios epidemiológicos.

## 11.PERSPECTIVAS

- Es importante probar la metodología diseñada en muestras de leche con distinto contenido nutricional, es decir leche descremada, light, deslactosada, con fibra, etc., con la finalidad de ver qué efecto tienen estas muestras sobre el ensayo.
- Sería importante complementar este estudio, utilizando la metodología establecida, pero ahora analizando otras muestras de alimentos distintas a los lácteos, para así corroborar la reproducibilidad del método diseñado.
- Es importante dar a conocer los datos obtenidos en el presente trabajo a las diferentes dependencias de salud y a los laboratorios de análisis de alimentos, proponiéndolos como una alternativa segura y rápida para detección de *Salmonella*, ya que se contribuiría a agilizar la obtención de resultados y con esto prevenir infecciones.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

(s.f.).

Caffer, M., Terragno, R., & Binztein, N. (2008). *Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de Salmonella*.

Chacón L, B. K. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30, 18-23.

Croci L, D. E. (2004). Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture Method for Detecting *Salmonella* in Meat Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1393-1396.

Day, J., Bassavanna, U., & Sharma, S. (2009). Development of a Cell Culture Method To Isolate and Enrich *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from Shell Eggs for Subsequent Detection by Real-Time PCR. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 79(16), 5321–5327.

EFSA, A. d. (2008). Obtenido de <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>

FDA, F. a. (2011). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Salmonella spp.* Obtenido de <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>

Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, N., & Clementi, F. (2001). Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food. *Applied and environmental Microbiology*, 67(2), 977–978.

FSIS, F. S. (2010). *Salmonella Annual Report*. Obtenido de [http://www.fsis.usda.gov/science/progress\\_report\\_salmonella\\_testing/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/science/progress_report_salmonella_testing/index.asp)

Gallegos, M., Morales, A., Alvarez, G., Osuna, J., Martínez, I., Morales, L., & Fratamico, P. (2008). PCR Detection and Microbiological Isolation of

- Salmonella spp. from Fresh Beef and Cantaloupes. *Journal of Food Science*, 74, M37-M40.
- Gonzalez, N., Hammack, T., Russel, M., Jacobson, A., De Jesus, A., Brown, E., & Lampel, K. (2009). Detection of Live Salmonella sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting invA mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 314-3720.
- Gonzalez, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR. Prevención y diagnóstico. *Revista de Salud Publica México*, 47, 388-90.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P., Bockemuhl, J., Grimont, D., & Weill, F. (2010). Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le. *Research in Microbiology*, 161, 26-29.
- Gutiérrez, C. L., Montiel, V. E., Aguilera, P. P., & González, A. M. (2000). Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*, 42, 490-495.
- Hee, P., Joong, H., Hong, S., Gyeong, E., Hwan, J., & Yeong, H. (2008). Direct and Quantitative Analysis of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Using Real-Time PCR from Artificially Contaminated Chicken Meat. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 1453–1458.
- Hernández, F., & Rodríguez, M. H. (2009). Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Salud pública de México*, 71, 424-438.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27, 710-730.
- Jeyasekaran, G., & Thirumalai, K. (2011). Detection of Salmonella enterica serovars in shrimps in eight hours by multiplex PCR assay. *Ann Microbiol.*

- Kim, H., & Park, S. (2006). Comparison of Salmonella enterica Serovar Typhimurium LT2 and. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72(9), 6142–6151.
- Koyuncu, S., Andersson, M., & Haˆggblom, P. (2010). Accuracy and Sensitivity of Commercial PCR-Based Methods for Detection of Salmonella enterica in Feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 2815–2822.
- Kumar, R., Surendran, P., & Thampuran, Z. (2008). An eight-hour PCR-based technique for detection of Salmonella serovars in seafood. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 627–631.
- Lauri, A., & Mariani, P. (2009). Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr*, 4, 1-12.
- Leader, B., Frye, J. G., Fedorka, P. C., & Boyle, D. (2009). High-Throughput Molecular Determination of Salmonella enterica Serovars by Use of Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1290–1299.
- Lee, K., Iwata, T., Shimizu, M. T., Nakadai, A., Hirota, Y., & Hayashidani, H. (2009). A novel multiplex PCR assay for Salmonella subspecies identification. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 805–811.
- Lim, H., Lee, K., Hong, C., Bahk, G., & Choi, W. (2005). Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of Salmonella spp. *Int J Food Microbiol*, 105, 411 – 418.
- Löfstrom, C., Knutsson, R., Axelsson, C., & Radström, P. (2004). Rapid and Specific Detection of Salmonella spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 69-75.
- Luque, J., & Herraiz, A. (2008). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. España: Elsevier.
- Malorny, B., Huehn, S., Dieckmann, R., Krämer, N., & Helmuth, R. (2009). Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of Salmonella in Food and Feeding Stuff. *Food Anal. Methods*, 2, 81–95.

- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7046–7052.
- Matias, B., Pinto, P., Cossi, M., Silva A., V. C., & L, N. (2010). Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection of Salmonella species directly from superficial samples of chicken carcasses and preenrichment broth. *Poultry Science*, 89, 1524–1529.
- McCaber, E., Burgess, C., O’regan, E., McGuinness, E., Barry, T., Fanning, S., & Duffy, G. (2011). Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the hliA gene of Salmonella enterica subspecies enterica. *Food Microbiology*, 28, 447- 456.
- McCarthy, N., Reen, F., Buckley, J., & Boyd, E. (2009). Sensitive and Rapid Molecular Detection Assays for Salmonella enterica Serovars Typhimurium and Heidelberg3. *Journal of Food Protection*, 72(11), 2350–2357.
- Microbial. (2012). Obtenido de <http://www.microbial-systems.com>
- NOM-114-SSA1-1994. (1994). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.* Obtenido de <http://www.bidihmujer.salud.gob.mx/documentos/leyes/NOM-114-SSA1-1994%20determinacion%20salmonella%20en%20alimentos.pdf>
- Oliveira, S., Rodenbusch, S., & Rocha, C. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for Salmonella detection. *Lett. Appl Microbiol*, 26, 217–221.
- OMS. (2007). *Organización Mundial de la Salud.* Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>.
- Park, H., Hyun-Joong, K., P, S.-H., Eun, G. S., Jae, K., & Hae, Y. (s.f.).
- Park, S., Kim, H., Cho, H., Kim, J., & Hwa, M. (2009). Identification of Salmonella enterica subspecies I, Salmonella enterica serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 301, 137–146.

- Parra M., D. J. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, Clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, Clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.
- Pérez, C., Sánchez, M., Henaoa, S., & Cardona, S. (2008). Standardization of two Polymerase Chain Reaction tests for the diagnosis of Salmonella enterica subespecie enterica in eggs. *Arch Med Vet*, 40, 235-242.
- Regalado, P., Vazquez, M., & Vazquez, G. (2011). 2011. Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Genética de Salmonella enterica Subsp. enterica en productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual.
- SIRVETA, N. S. (2012). Obtenido de [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/NOT\\_SEMANAL/2012/6Reporte\\_junio\\_N.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/NOT_SEMANAL/2012/6Reporte_junio_N.pdf)
- Thirumalai, K., Jeyasekaran, J., Shakila, L., & Thangaran, L. (2011). Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of Salmonella enterica serovars in shrimps in 4 h. *Journal of Bacteriology Research*, 3(3), 56-62.
- Vesna, B. (2008). Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Avances en Latinoamérica. *Biofarbo*, 16, 91-97.
- Villareal, C., Soto, V., Pereira, S., Varela, P., Jaramillo, L., Villanueva, T., & Mendoza, T. (2008). Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Salmonella sp. en leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte, Barranquilla, Colombia*, 24(2), 216-225.
- Wang, S., Yeh, D., & Wei, C. (2009). Specific PCR Primers for the Identification of Salmonella enterica Serovar Enteritidis in Chicken-Related Samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(3), 183-189.

- Wolffs, P., Glencross, K., Thibaudeau, R., & Griffiths, R. (2006). Direct Quantitation and Detection of Salmonellae in Biological Samples without Enrichment, Using Two-Step Filtration and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3896–3900.
- Yañez, E., Mattar, S., & Durango, A. (2008). 2008. Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Asociación colombiana de infectología*, 12, 246-254.
- Zaidi, M., López, M., & Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella : epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Lat Mic*, 48(2), 121-125.
- Ziemer, C., & Steadham, S. (2003). Evaluation of the specificity of Salmonella PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 463–469.

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>

<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>

[http://www.fsis.usda.gov/science/progress\\_report\\_salmonella\\_testing/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/science/progress_report_salmonella_testing/index.asp)

<http://www.bidihmujer.salud.gob.mx/documentos/leyes/NOM-114-SSA1-1994%20determinacion%20salmonella%20en%20alimentos.pdf>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>.

[http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/NOT\\_SEMANAL/2012/6Reporte\\_junio\\_N.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/NOT_SEMANAL/2012/6Reporte_junio_N.pdf)