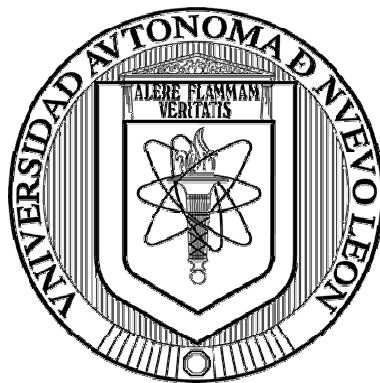


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* AISLADOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS, MELÓN Y CHILE TIPO BELL

Por

MIGUEL ANGEL GALLEGOS ROBLES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON especialidad en BIOTECNOLOGÍA

Agosto, 2008

**DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp.,
Escherichia coli O157:H7 y *Listeria monocytogenes* AISLADOS DE PRODUCTOS
CÁRNICOS, MELÓN Y CHILE TIPO BELL**

Comité de tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos (Director de tesis)

Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado (Secretario)

Dra. Licet Villarreal Treviño (Vocal 1)

Dr. José Ma. Viader Salvado (Vocal 2)

Dr. Alberto Morales Loredo (Vocal 3, Director externo)

Dra. Ma. Genoveva Alvarez Ojeda (Director externo)

APROBACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL POR COMITÉ ACADÉMICO

**DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp.,
Escherichia coli O157:H7 y *Listeria monocytogenes* AISLADOS DE PRODUCTOS
CÁRNICOS, MELÓN Y CHILE TIPO BELL**

Comité académico de Doctorado

Dra. Diana Rezéndez Pérez

Subdirectora de estudios de posgrado

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Importancia.....	4
2. HIPÓTESIS.....	5
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos particulares.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Generalidades de las bacterias transmitidas por alimentos.....	8
4.1.1 <i>Salmonella</i> spp.....	8
4.1.1.1 Especies y serotipos de <i>Salmonella</i>	10
4.1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	11

4.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
4.2	Las herramientas moleculares en la inocuidad.....	16
4.3	Técnicas de tipificación molecular para identificar patógenos.....	18
4.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
4.3.2	PCR múltiplex.....	22
4.3.3	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	24
4.3.4	Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).....	27
5.	MÉTODOS.....	30
5.1	Localización del sitio experimental.....	30
5.2	Controles positivos.....	30
5.3	Muestras cárnicas.....	31
5.3.1	Muestras a partir de canales de res y cerdo.....	31
5.4	Muestras de los sistemas productivos de melón y chile tipo Bell.....	32
5.4.1	Muestras a partir de frutos.....	33
5.4.2	Muestras a partir de manos de cosechadores y/o trabajadores en bodega.....	34
5.4.3	Muestras a partir de carretillas y vehículo de transporte.....	34
5.4.4	Muestras a partir de agua de riego.....	34
5.4.5	Muestras de suelo.....	35
5.5	Análisis microbiológico de las muestras.....	35
5.5.1	Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	35
5.5.1.1	Sistema bioquímico y antisueros.....	37
5.5.2	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	37
5.5.2.1	Aislamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 por el Método Reveal.....	38
5.5.2.1.1	Método rápido Test Reveal.....	38
5.5.2.1.2	Aislamiento selectivo.....	38
5.5.2.1.3	Aislamiento y sistema bioquímico.....	39
5.5.3	Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
5.6	Extracción del ADN.....	40
5.7	Búsqueda de iniciadores y secuencias reportadas en bancos de genes para cada uno de los patógenos en estudio.....	41
5.8	Simulaciones de PCR mediante el programa Amplify 1.2.....	42
5.9	Reacciones de PCR.....	42
5.9.1	Reacciones de PCR para <i>Salmonella</i> spp.....	42
5.9.2	Reacciones de PCR para <i>E. coli</i> O157:H7.....	44
5.9.3	Reacciones de PCR para <i>Listeria monocytogenes</i>	45
5.10	Electroforesis.....	45
5.11	Caracterización molecular.....	46
5.11.1	Simulación de restricción con DNA Strider.....	46
5.11.2	Condiciones del análisis de PCR-RFLP.....	46
5.11.3	Condiciones para la electroforesis de campo pulsado.....	47
5.11.3.1	Suspensión de bacterias.....	47

5.11.3.2	Formación de los moldes de agarosa.....	48
5.11.3.3	Lisis celular en los moldes de agarosa.....	48
5.11.3.4	Lavado de bloques de agarosa después de la lisis celular.....	49
5.11.3.5	Restricción enzimática del ADN en los bloques de agarosa con <i>Xba</i> I.....	49
5.11.3.6	Carga de las muestras en el gel de agarosa.....	50
5.11.3.7	Electroforesis.....	50
5.11.3.8	Tinción del gel.....	51
5.12	Análisis de resultados.....	51
6.	RESULTADOS.....	53
6.1	Extracción del ADN con el método CTAB.....	53
6.2	Simulaciones de PCR con Amplify 1.2.....	53
6.3	Estandarización de la PCR.....	58
6.4	Identificación y caracterización molecular de <i>Salmonella</i> spp.....	58
6.4.1	Detección de <i>Salmonella</i> spp mediante PCR del gen <i>invA</i> en muestras de campo.....	62
6.4.2	Caracterización mediante PCR-RFLP.....	65
6.4.3	Caracterización mediante PFGE.....	69
6.5	Identificación y caracterización molecular de <i>E. coli</i> O157:H7.....	73
6.6	Identificación y caracterización molecular de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	80
7.	DISCUSIÓN.....	85
7.1	Discusión sobre <i>Salmonella</i> spp.....	86
7.2	Discusión sobre <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	96
7.3	Discusión sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	101
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	103
	LITERATURA CITADA.....	107
	APÉNDICES.....	119
APÉNDICE A.	Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>Salmonella</i> spp.....	119
APÉNDICE B.	Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>E. coli</i> O157:H7.....	120
APÉNDICE C.	Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>Listeria monocytogenes</i>	121

APÉNDICE D. Relación de aislados utilizados para los análisis de PCR-RFLP y PFGE.....	122
APÉNDICE E. Relación de aislados analizados por PCR-RFLP.....	123
APÉNDICE F. Relación de aislados analizados por PFGE.....	125

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos los favores que me ha concedido, porque con su ayuda pude concluir mis estudios de Doctorado y el presente trabajo de tesis. “Todo lo puedo en Cristo que me fortalece (Filipenses 4:13).”

A la Universidad Juárez del Estado de Durango y la Facultad de Agricultura y Zootecnia por el permiso otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por la oportunidad que me brindó para realizar en su seno académico mis estudios de doctorado.

Al Laboratorio Central Regional del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León por las facilidades que me brindó para la realización de mi tesis, en especial al Ing. José G. Muraira Gutiérrez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgó para concluir satisfactoriamente mis estudios de doctorado y por el recurso económico para la realización del proyecto.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en las personas del Dr. Alberto Morales Loredo y Dra. Genoveva Álvarez, Directores Externos, quienes me dirigieron atinadamente en la parte de la caracterización molecular y microbiológica. Al Dr. Adrián Vega Piña, M.C. Yasmin Chew Madinaveitia, Dr. Jorge Ozuna, M.C. Sixto Velarde, Sr. Guadalupe Enríquez Gastelum, Ing. Arturo Castañeda, Ing. Arnulfo Sifuentes, por el apoyo para la realización de los muestreos y obtención de aislados.

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos por haber aceptado ser mi director de tesis y las facilidades que me otorgó para concluir satisfactoriamente mis estudios de doctorado y el trabajo de tesis.

A los doctores Licet Villareal Treviño y Carlos Fco. Sandoval Coronado, integrantes del comité tutorial, por las atinadas observaciones que hicieron para mejorar el avance del trabajo de tesis.

A los maestros que contribuyeron con sus pertinentes conocimientos a la formación de mi persona en el área de la biotecnología.

A la Dra. Pina M. Fratamico del USDA-ARS por el apoyo técnico en la tesis y revisión de artículos.

Al Dr. Jesús Vázquez Arroyo por el apoyo para la obtención de los aislados de *E. coli* O157:H7.

Al Ing. Luis Gerardo Mendoza Dávila y su equipo de trabajo: Belem, Chely, Cesar, Pepe, Chago, y Wendy por el apoyo y asesoría que me brindaron en la caracterización molecular.

A la maestra Miriam Montante y su equipo de trabajo por las facilidades que me brindaron para los análisis microbiológicos.

Al Dr. Edmundo Calva y M.C. Marcos Fernández del IBT-UNAM por la donación de algunos serotipos de *Salmonella*.

A la maestra Lourdes Froto y Luis Makonetzin Isidro Requejo de la Escuela de Ciencias Biológicas de la UA de C por aislados proporcionados.

A Abigail García Cárdenas y Marcelino Aguirre Garza por su ayuda para la realización de los muestreos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Fermín y Susana.

A amigos del CFPPNL Ing. Melchor, Ing. Juan Fco, MVZ Ricardo, MVZ Jaime y Alejandro por hacer agradable mi estancia en el comité.

A mis amigos: Diana Elisa, Dulce, Juan José, Ernesto, Lupita, Diana, Gerardo y Víctor E.

A todos los que de una forma u otra contribuyeron para la realización de mi trabajo de tesis

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme este momento y por darme la oportunidad de hacer lo que me toca en esta vida.

A mis padres, a mi esposa, a mis hijos, a mis hermanos, a mis sobrinos, a mis suegros, a mis cuñados, por su cariño y apoyo.

A mis compañeros, maestros y amigos.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Resultados del análisis de PCR para <i>Salmonella</i> spp., en muestras de melón y chile tipo Bell.....	63
II. Relación de muestras de carnes, canales y otras fuentes animales y resultados del análisis de PCR para <i>Salmonella</i> spp.....	64
III. Resumen de la caracterización molecular de los aislados de <i>E. coli</i> obtenidos de canales de cerdo y bovino.....	79
IV. Proporción de aislados portadores de cada uno de los genes <i>rfbE</i> , <i>fliC</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eaeA</i> , y de los cinco genes por tipo de canal.....	80
V. Resultados del análisis de PCR para <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras de melón y chile tipo Bell.....	81
VI. Resultados del análisis de PCR para <i>L. monocytogenes</i> en muestras de melón y chile tipo Bell.....	83
VII. Relación de muestras de carnes, canales y otras fuentes animales y resultados del análisis de PCR para <i>L. monocytogenes</i>	83
VIII. Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>Salmonella</i> spp.....	119
IX. Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>E. coli</i> O157:H7.....	120
X. Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de <i>Listeria monocytogenes</i>	121
XI. Relación de aislados utilizados para los análisis de PCR-RFLP y PFGE.....	122

XII. Relación de aislados analizados por PCR-RFLP.....	123
XIII. Relación de aislados analizados por PFGE.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Extracción de ADN con el método CTAB.....	53
2. Simulación de PCR del gen <i>invA</i> de <i>S. Typhimurium</i> LT2 (Genbank accession NC_003197).....	54
3. Simulación de PCR del gen <i>fliC</i> de <i>S. Enteritidis</i> (Genbank accession AY649709).....	54
4. Simulación de PCR del gen <i>sdfI</i> de <i>S. Enteritidis</i> (Genbank accession AF370716).....	55
5. Simulación de PCR del gen <i>fliC</i> de <i>E. coli</i> O157:H7 (Genbank accession AE005174.2).....	55
6. Simulación de PCR del gen <i>rfbE</i> de <i>E. coli</i> O157:H7 (Genbank accesión S83460).....	56
7. Simulación de PCR del gen <i>stx1</i> de <i>E. coli</i> O157:H7 (Genbank accesión AE005174.2).....	56
8. Simulación de PCR del gen <i>stx2</i> de <i>E. coli</i> O157:H7 (Genbank accesión AY143337).....	57
9. Simulación de PCR del gen <i>eaeA</i> de <i>E. coli</i> (Genbank accesión AE005174.2).....	57
10. Simulación de PCR del gen <i>hlyA</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> (Genbank accession M24199).....	58
11. Productos de PCR para el gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp después de estandarizada la técnica.....	59
12. Productos de PCR para el gen <i>fliC</i> de <i>S. Typhimurium</i> (ATCC	

13311) probando varias temperaturas de alineamiento (T _m) en °C.....	60
13. PCR del gen <i>sdhI</i> de <i>S. Enteritidis</i> , después de estandarizada la técnica.....	61
14. Productos de PCR amplificados con los iniciadores ABMS1 y ABMS2.....	65
15. Perfiles de restricción del gen <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i> obtenidos con la endonucleasa <i>Sau3A I</i> en aislados de serotipo conocido.....	66
16. Perfiles de restricción del gen <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i> obtenidos con la endonucleasa <i>Sau3A I</i> en muestras de campo.....	67
17. Dendrograma PCR-RFLP.....	68
18. Dendrograma PFGE.....	72
19. Productos de PCR de los genes <i>rfbE</i> y <i>fliC</i> de <i>E. coli</i> O157:H7 probando diferentes T _m	74
20. Productos de PCR de los genes <i>rfbE</i> y <i>fliC</i> en aislados obtenidos de canales de cerdo y bovino.....	74
21. Productos de PCR del gen <i>stx1</i> en los aislados que dieron positivos para los genes <i>rfbE</i> y <i>fliC</i>	75
22. Productos de PCR del gen <i>stx2</i> en los aislados que dieron positivo para los genes <i>rfbE</i> , <i>fliC</i> y <i>stx1</i>	76
23. Productos de PCR del gen <i>eaeA</i> en los aislados que dieron positivo para los genes <i>rfbE</i> , <i>fliC</i> , <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	77
24. PCR- RFLP del <i>stx2</i> con <i>Hae III</i> en los aislados que fueron positivos para los genes <i>rfbE</i> , <i>fliC</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eaeA</i> de <i>E. coli</i> O157:H7.....	78
25. Producto de PCR para el gen <i>hlyA</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> después de estandarizada la técnica.....	82
26. Productos de PCR para el gen <i>hlyA</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> de muestras enviadas al LCRM.....	84
27. PCR- RFLP del gen <i>hly</i> con la enzima de restricción <i>Mbo I</i>	84

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
Agua miliQ	Agua ultrapura
APB	Agua Peptonada Tamponada
API	Analytical Profile Index
ARS	Agricultural Research Service
AST	Agar Soya Trypticasa
ATCC	American Type Culture Collection
BGS	Agar Verde Brillante con Sulfadiazina
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
CBS	buffer para suspensión celular
CENAPA	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
CFPPNL	Comité para el Fomento y Protección Pecuaria de Nuevo León
CHEF	Clamped Homogenous Electric Fields
cm	Centímetros
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DMLIA	Agar Lisina Doblemente Modificado
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>et al.</i> ,	y colaboradores

E.U.A	Estados Unidos de America
GenBank	Banco de genes
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
K/A	base sobre ácido
KCl	Cloruro de potasio
Kb	kilobases
K/K	base sobre base
LCRM	Laboratorio Central Regional de Monterrey
LIA	Agar Hierro-Lisina
M	molar
MCS+CT	Agar MacConkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio
Mg	miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
MIO	Motilidad-Indol-Ornitina
mM	mili molar
mm	Milímetros
ml	Mililitros
MOX	Agar Oxford modificado
mRV	Rappaport Vassiliadis modificado

NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramos
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis de Campo Pulsado
pH	Potencial de hidrógeno
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
<i>Sau3A I</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borato-EDTA
TIF	Tipo Inspección Federal
TSI	Agar Tres Azucres y Hierro
TT	Tetrationato
U	Unidad
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UPGMA	Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos
USDA	United States Department of Agriculture

UV	Luz ultravioleta
UVM	Caldo Modificado Universidad de Vermont
V	voltios
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>
μl	microlitros
μM	Micro molar
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje

RESUMEN

Salmonella spp, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* son patógenos, frecuentemente encontrados en los sistemas productivos de alimentos, que presentan una gran diversidad genética y ecológica. En este estudio se determinó por PCR y microbiología la presencia de estos tres patógenos en muestras cárnicas y en muestras obtenidas de los sistemas productivos de melón y chile Bell y posterior caracterización molecular de los aislados recuperados mediante PCR, PCR-múltiplex, PCR-RFLP y PFGE. Por PCR se determinó la presencia de *Salmonella* en un 23.8% (71/298) de las muestras provenientes de los sistemas productivos agrícolas de melón (19.12%) y chile (4.69%), y en un 37.28 % (22/59) de las muestras cárnicas. Se determinó, por PCR-RFLP del gen *fliC* y con la endonucleasa *Sau3A* I, que *S. Typhimurium* fue el principal serotipo aislado en las muestras cárnicas y en las muestras de ambos sistemas productivos agrícolas, y *S. Enteritidis* en aislados provenientes de aves y del sistema productivo de chile Bell. El mayor número de muestras positivas a *Salmonella* eran muestras de agua. Mediante PFGE se encontraron diferencias adicionales dentro de un mismo serotipo, con lo que se determinó que un mismo serotipo puede tener diferentes pulsotipos y estar presente en diferentes tipos de muestras. En relación con *E. coli* O157:H7, ésta se aisló únicamente a partir de canales de res y cerdo. Los aislados recuperados fueron caracterizados por PCR y PCR-múltiplex con base a la presencia de los genes *rfbE* y *fliC*, *stx1*, *stx2* y *eaeA* los cuales determinan que una cepa sea considerada enterohemorrágica. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el número de canales positivas de res y cerdo a éste patógeno, lo que sugiere la posibilidad de encontrar a *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica indistintamente en ambos tipos de canal. Respecto a *Listeria monocytogenes*, se encontró solamente en un 1.64% (3/182) de las muestras obtenidas del sistema productivo de melón, siendo dos de muestras lavados de frutos de melón en la huerta y una de agua del canal de riego de la huerta de melón. En las muestras cárnicas, se encontró en un 35.71% (5/14) de los casos.

ABSTRACT

Salmonella spp, *Escherichia coli* O157H:7 and *Listeria monocytogenes* are pathogens commonly found in the productive food systems and present a great genetic and ecologic diversity. In this study was determined by PCR and microbiologic methods the presence of these three pathogens in meat samples and in samples obtained from the cantaloupe and chile Bell systems and later molecular characterization of the isolates recovered by PCR, PCR-multiplex, PCR-RFLP and PFGE. By PCR was determined the presence of *Salmonella* in a 23.8% (71/298) of the samples from the agricultural productive system of cantaloupe (19.12%) and chile (4.69%), and in a 37.28% (22/59) of the meat samples. Was determined by PCR-RFLP of the *fliC* gene and with *Sau3A* I endonuclease, that *S. Typhimurium* was the main serotype isolated in the meat samples and in the samples of both agricultural productive systems, and *S. Enteritidis* in samples from poultry and from chile Bell productive system. The higher number of positive samples to *Salmonella* were from water samples. By PFGE additional differences were found into a same serotype, which determined that a same serotype could have different pulsotypes and be present in different type of samples. In relation with *E. coli* O157:H7 this was isolated only from bovine and pig carcasses. The isolates were characterized by PCR and PCR-multiplex based on the presence of the *rfbE* and *fliC*, *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes which determine that a strain is considered enterohemorrhagic. No significant differences were found ($P>0.05$) in the number of positive carcasses of bovine and pig, which suggests the possibility of find enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 indistinctly in both types of carcasses. Respect to *L. monocytogenes* it was found only in a 1.64% (3/182) of the samples obtained from the cantaloupe productive system, being two of the samples rinses of cantaloupes fruits in the farm and one of water from the irrigation channel of cantaloupe farm. In the meat samples was found in a 35.71% (5/14) of the cases.

1. INTRODUCCIÓN

Las organizaciones mundiales relacionadas con los alimentos como es el caso de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), estiman que aun cuando la inocuidad de los alimentos siempre había sido un tema importante, actualmente ocupa un lugar preponderante en el programa político de muchos países, esto debido al mayor conocimiento de los consumidores sobre el tema, así como a los riesgos y desafíos emergentes en el ámbito de la inocuidad de los alimentos, uno de los cuales son los peligros microbiológicos que presentan los alimentos (FAO, 2000).

Un factor importante para que un alimento no sea apto para el consumo humano, es la presencia de peligros biológicos, causantes de enfermedades al consumidor y representados principalmente por bacterias de la familia Enterobacteriaceae (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *shiguella*), además de otras como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibro cholerae*, *Brucella* spp., *Staphylococcus*, *Bacillus*, etc., (Beuchat, 1998).

Existen estudios que indican una gran diversidad genética y ecológica, así como una alta recombinación e intercambio genético en los microorganismos. Estos fenómenos

permiten generar gran cantidad de genotipos a pesar de no suceder en cada generación. No sólo se mueven genes, sino que recombinan plásmidos y fragmentos de genes. Algunas de estas combinaciones resultan exitosas e invaden nuevos nichos ambientales o nuevos hospederos y así continuamente están surgiendo nuevas variantes como las de *E. coli* que pueden llegar a ser muy competitivas, como el serotipo O157:H7. Lo anterior genera una estructura poblacional con ecotipos y al mismo tiempo cepas que pueden vivir en gran cantidad de ambientes que antes se creían secundarios o atípicos para la especie (Souza *et al.*, 2001).

Fratamico P. (comunicación personal, 2003), señala que tanto en México como en E.U.A., los científicos realizan esfuerzos para identificar patógenos, así como para solucionar los problemas de seguridad alimenticia en dos amplias categorías: seguridad alimenticia en pre-cosecha y seguridad alimenticia en post-cosecha, pero no obstante estos esfuerzos, poco se conoce de la fuente primaria de los organismos patógenos en el medio ambiente de la granja (establo o campo agrícola). Por lo tanto, estos esfuerzos deben llevar a seguir el rastro de la fuente de los patógenos en forma más precisa, así como a su detección con técnicas moleculares más sensitivas y específicas. Un resultado de los anteriores esfuerzos debe ser el identificar las relaciones entre los organismos que se presentan en el medio ambiente de la granja y aquellos que se presentan en el medio ambiente del procesamiento de los productos alimenticios para identificar la fuente de contaminación.

1.1. Justificación

La detección rápida de patógenos en alimentos es un aspecto crítico, principalmente en aquellos que entran en transformación, maduración y descomposición muy pronto, como los productos cárnicos y hortofrutícolas. La búsqueda de métodos rápidos y seguros para la detección de grupos específicos de organismos en alimentos se ha vuelto una necesidad urgente en la adopción de programas para el aseguramiento de la calidad y la inocuidad de los alimentos. Estos métodos rápidos son herramientas necesarias para identificar y monitorear puntos críticos susceptibles de contaminación microbiológica en los sistemas primarios de la producción de alimentos como lo son los sistemas productivos agrícolas. El detectar la presencia de organismos patógenos de forma rápida a lo largo de la cadena de producción, ayudaría a que se llevaran a cabo acciones encaminadas a la solución de los problemas de contaminación, y al productor a tener mayor facilidad de acceso a la distribución de sus productos a nivel nacional e internacional, pero, ¿es el mismo patógeno especie, serotipo, el que está presente en todas las etapas del sistema productivo?, En caso afirmativo, cuál es la fuente de contaminación común, y en caso negativo, cuál es la fuente específica de contaminación. De las anteriores preguntas surge la importancia de caracterizar y/o tipificar genotípicamente a los patógenos en los diferentes ambientes (etapas) del sistema productivo para tratar de asociarlos a una fuente común o diferente de contaminación, y así poder estar en posibilidad de tomar medidas preventivas y/o correctivas.

1.2. Importancia

La mayoría de los estudios en México sobre patógenos en alimentos solamente tienden a corroborar la presencia o ausencia de los mismos y sólo en algunos se ha determinado el serotipo mediante la serología tradicional, la cual tiene sus inconvenientes. En nuestro país el diagnóstico microbiológico es la técnica oficial, sin embargo puede tomar hasta 7 días, lo cual se constituye en una desventaja en productos que deben ser comercializados en el menor tiempo posible. Teniendo México como principal socio comercial a Estados Unidos y con la apertura del TLCAN en materia agrícola, las exigencias en materia de inocuidad son totales, dentro de lo cual, el diagnóstico oportuno y la tipificación molecular permitirán crear una base de datos de los serotipos y cepas presentes en un ambiente determinado, la cual sirva como referencia en la búsqueda del origen de brotes epidemiológicos, como el reciente de *S. Saintpaul* asociado a chiles jalapeños de origen mexicano. Lo anterior plantea la necesidad de adoptar otras tecnologías para el diagnóstico y tipificación de patógenos, que sean rápidas y sensibles, como la PCR, la PCR-múltiple, PCR-RFLP y la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Las primeras dos utilizadas en la identificación de patógenos en forma aislada o en grupos con base en la presencia o ausencia de genes que codifican para factores de virulencia. Las dos últimas son técnicas empleadas en la caracterización molecular. PCR-RFLP tiene el potencial de identificar bacterias a nivel de serotipo y PFGE tiene un poder de discriminación mayor a nivel de cepa dentro de un mismo serotipo. Estas dos últimas técnicas son de particular importancia cuando se trata de asociar brotes epidemiológicos a posibles fuentes de contaminación. Por lo anterior, el presente trabajo se propuso establecer metodologías moleculares apropiadas para la caracterización de patógenos asociados con productos cárnicos y hortofrutícolas e identificar las variantes genotípicas presentes de los patógenos que permita establecer medidas más adecuadas de control al identificar las fuentes de infección.

2. HIPÓTESIS

Mediante técnicas moleculares se puede determinar la variabilidad genética de aislados de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente aislados de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* obtenidos de los procesos de producción de carne de res, melón y chile tipo Bell.

3.2 Objetivos particulares

1. Aislar e identificar bacterias del tipo *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, a partir de productos cárnicos, melón y chile tipo Bell.
2. Caracterizar genótipicamente las variantes de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* mediante las técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR-múltiplex, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) y electroforesis de campo pulsado (PFGE).

4. ANTECEDENTES

Las enfermedades, producidas por alimentos contaminados, son problemas de salud ampliamente distribuidos a nivel mundial, declaración hecha en 1983 por la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Las diferentes formas de producir, transportar, procesar y preparar los alimentos, hacen que esta conclusión siga siendo aún verdad. La carne y los productos cárnicos son susceptibles a contaminación de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), haciendo a estos alimentos peligrosos. Los dos últimos microorganismos han sido reportados como de los más importantes patógenos transmitidos por alimentos (WHO, 2000).

Existen dos categorías de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): las intoxicaciones alimentarias, causadas por las toxinas que producen los microorganismos; y las infecciones alimentarias, causadas por el crecimiento de los microorganismos en el cuerpo humano, después de haber ingerido alimentos contaminados.

Según la FDA (2001a) los siguientes son los 10 patógenos menos apreciados ya que el Servicio de Salud Pública de los E.U.A los ha identificado como los mayores

microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la severidad de la enfermedad o por el número de casos que ella produce.

Campylobacter jejuni, que es la causa más común de diarrea, teniendo como posibles fuentes las carnes y pollos crudos o mal cocinados, leche cruda y agua sin tratamiento. *Clostridium botulinum*, este organismo produce la toxina que causa el botulismo, una enfermedad caracterizada por parálisis muscular. Posibles fuentes son alimentos preparados en el hogar y aceite de hierbas. *E. coli* O157: H7, es una bacteria que puede producir una toxina mortal. Se puede encontrar en carnes mal cocidas, especialmente hamburguesas, leche cruda y productos agrícolas. *Listeria monocytogenes*, causa listeriosis, una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil. Fuentes: suelo y agua y también se ha encontrado en productos lácteos incluyendo quesos blandos así como también en carne cruda y mal cocida, en pollos y productos del mar frescos o en conserva. *Salmonella* spp., es considerada la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos. Es responsable de millones de casos al año de enfermedades transmitidas por alimentos. Fuentes: huevos crudos y mal cocidos, pollos y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales. *Staphylococcus aureus*, esta bacteria produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida. Fuentes: alimentos cocinados con alto contenido en proteínas (ejemplos: jamón cocido, ensaladas, productos de pastelería, productos lácteos). *Shigella*, produce aproximadamente 300,000 casos de enfermedades diarreicas. La falta de higiene hace que *Shigella* sea fácilmente transmitida de persona en persona. Fuentes: ensaladas, leche, productos lácteos y agua sucia. *Toxoplasma gondii*, es un parásito que

causa toxoplasmosis, una enfermedad muy severa que puede producir desordenes del sistema nervioso central, particularmente retardo mental y deterioro visual en niños. Fuentes: carnes, principalmente de cerdo. *Vibrio vulnificus*, causa gastroenteritis o un síndrome conocido como septicemia primaria. Las personas con enfermedades del hígado son especialmente de alto riesgo. Fuentes: mariscos crudos o mal cocidos. *Yersinia enterocolitica*, causa yersiniosis, una enfermedad caracterizada por diarrea y/o vómitos. Fuentes: cerdo, productos lácteos y agrícolas.

4.1. Generalidades de las Bacterias Transmitidas por Alimentos

Las bacterias patógenas transmitidas al hombre por alimentos son un aspecto importante en la seguridad alimenticia a nivel mundial y la identificación rápida y adecuada de éstas en los alimentos es importante tanto para asegurar la calidad alimenticia como para la rastreabilidad de brotes en el proceso de distribución de alimentos. Entre las más comunes se pueden encontrar a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (Odumeru *et al.*, 1999; FDA, 2001a).

4.1.1. *Salmonella* spp.

Es una bacteria móvil en forma de bacilo y excepciones no móviles son *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, no forman esporas y son Gram negativas. Se encuentran

ampliamente distribuidas en animales, especialmente en aves de corral y cerdos. También se le encuentra en el agua, suelo, insectos, superficies de cocinas, excremento animal, carnes crudas de res, aves y alimentos del mar, por nombrar algunos pocos. *S. Typhi* y la bacteria paratifoidea normalmente causan septicemias y producen fiebre tifoidea en los humanos. Los síntomas agudos incluyen náusea, vómito, calambres abdominales, diarrea mínima, fiebre y dolor de cabeza. Consecuencias crónicas como síntomas artríticos pueden aparecer después de 3 o 4 semanas que ocurrieron los síntomas agudos. La dosis infecciosa se ha estimado de 15 a 20 células, dependiendo de la edad y salud del hospedero, y diferencias genéticas entre los miembros del género. La duración de los síntomas agudos es 1 a 2 días o pueden prolongarse, dependiendo de las condiciones del hospedero, dosis ingerida, y características genéticas. La causa de la enfermedad se debe a la penetración y paso del organismo *Salmonella* del intestino hacia el interior del epitelio del intestino delgado donde ocurre la inflamación; la identificación serológica del microorganismo es el método de diagnóstico de la enfermedad en humanos. *Salmonella* se ha asociado a alimentos como carnes crudas, de aves de corral, huevos, leche y productos del diario, pescado, camarón ancas de rana, levaduras, coco, salsas y aderezos, postres con crema, gelatinas secas, cacahuates mantequilla, cocoa, y chocolate. Se estima que de 2 a 4 millones de casos de salmonelosis ocurren anualmente en E.U.A. La incidencia de salmonelosis parece ser que se está incrementando tanto en E.U.A como en otros países industrializados. Todos los grupos son susceptibles, pero los síntomas son más severos en los ancianos e infantes. Pacientes con SIDA sufren salmonelosis más frecuentemente (aproximadamente 20 veces más que la población en general). Para el análisis de alimentos se han desarrollado métodos para la detección de la contaminación

por *Salmonella*, entre los cuales los métodos de cultivo tradicionales requieren de 5 días para obtener resultados presuntivos, mientras que otros métodos rápidos que requieren solo 2 días (FDA, 2003a).

4.1.1.1 Especies y Serotipos de *Salmonella*

Una gran polémica se ha vertido sobre el número de especies existentes en el género *Salmonella* lo cual ha creado una gran confusión entre los microbiólogos sobre la nomenclatura de *Salmonella* (Ezaki *et al.*, 2000). De acuerdo al Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Atlanta, GA, E.U.A y al sistema de nomenclatura usado por recomendación del centro colaborador de la Organización Mundial de Salud con el Instituto Pasteur, Paris, Francia, existen solamente dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *S. bongori*) y 2541 serotipos (serovariedades) en base al esquema de serotipificación propuesto por Kauffman-White (CDC, 2004a; Brenner *et al.*, 2000), mientras que el FDA (2001b) menciona la existencia de mas de 2700 serotipos.

El Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud en México, en el período comprendido entre 1990 y 1997, identificó 861 cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos donde los serotipos más frecuentes fueron *S. Newport*, *S. Agona* y *S. Enteritidis*. Para 1999 el mismo laboratorio de Salud Pública reportó que de 9518 muestras analizadas, 284 resultaron positivas a *Salmonella*, encontrando al serotipo Enteritidis en un 9.5 % y al serotipo Typhimurium en un 8.8%, siendo el serotipo

Enteritidis aislado con mayor frecuencia en aves mientras que Typhimurium en aves, moluscos y productos cárnicos (SSA, 2000). Según la OMS los serotipos que afectan con mayor frecuencia a nivel mundial son Typhimurium y Enteritidis, los cuales cada vez se hacen más resistente a los antibióticos comunes (WHO, 2000).

4.1.2. *Escherichia coli* O157:H7

Actualmente hay cuatro clases de *E. coli* enterovirulentas (colectivamente referidas como el grupo EEC) que causan gastroenteritis en humanos. Entre éstas, está la enterohemorrágica (EHEC) designada *E. coli* O157: H7. *E. coli* es un organismo normal de los intestinos de todos los animales, incluyendo el humano. Normalmente *E. coli* tiene una función útil en el cuerpo suprimiendo el crecimiento de especies de bacterias dañinas y sintetizando cantidades apreciables de vitaminas. Una minoría de cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedades en el humano por diferentes mecanismos. El serotipo *E. coli* O157: H7 es una variedad rara de *E. coli* que produce grandes cantidades de una o más potentes toxinas que causan severos daños al intestino. Estas toxinas, llamadas verotoxinas (VT) o shiga-like toxinas, están estrechamente relacionadas con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. La naturaleza aguda de la enfermedad se llama colitis hemorrágica por *E. coli* O157: H7. La enfermedad es caracterizada por severos calambres (dolor abdominal) y diarrea, la cual inicialmente es acuosa pero luego se torna a sangre. Ocasionalmente ocurren vómitos. Puede presentarse algo de fiebre o no. La enfermedad es usualmente auto-limitada y dura un promedio de 8 días. Algunos individuos presentan diarrea acuosa solamente. La dosis infecciosa se desconoce, pero

por la habilidad que tiene de pasar de persona a persona, la dosis puede ser muy similar a aquella de *Shigella* spp., (aproximadamente 10 organismos). El diagnóstico de la enfermedad en humanos es por aislamiento del serotipo *E. coli* O157: H7 u otra verotoxina producida por *E. coli* a partir de muestras con diarrea. La confirmación puede ser obtenida por el aislamiento de *E. coli* del mismo serotipo a partir del alimento incriminado. *E. coli* O157:H7 se ha asociado a alimentos como hamburguesas mal cocidas, sin embargo, brotes de *E. coli* O157: H7 también han sido implicados en germinados de alfalfa, jugos de frutas no pasteurizados, salami curados en seco, lechugas, y cuajadas de queso. En relación al curso de la enfermedad y complicaciones, algunas víctimas particularmente las más jóvenes, han desarrollado el síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por la falla renal y anemia hemolítica. Hasta un 15% de las víctimas con colitis hemorrágica pueden desarrollar SUH. La enfermedad puede conducir a una pérdida permanente de la función del riñón. En los ancianos, SUH, más fiebre y síntomas neurológicos constituye la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Esta enfermedad tiene una tasa de mortalidad en los ancianos del 50%. Se cree que toda población es susceptible a la colitis hemorrágica, pero los niños y los ancianos parecen ser los más afectados. El análisis de alimentos incluye varios métodos microbiológicos que pueden ser usados para aislar *E. coli* O157: H7. A diferencia de la *E. coli* típica, los aislados de *E. coli* O157: H7 no fermentan sorbitol y son negativos con el ensayo MUG; por lo tanto, estos criterios son comúnmente usados para el aislamiento selectivo. El agar Sorbitol-MacConkey ha sido extensivamente usado para aislar este organismo de especímenes clínicos. Otro procedimiento usa un medio Sorbitol-MacConkey conteniendo telurito de potasio y cefixima. Este incluye un paso de enriquecimiento y es

un nuevo método desarrollado como resultado de brotes recientes a partir de alimentos. Se han desarrollado métodos rápidos usando una variedad de tecnologías, que incluyen métodos recombinantes de ADN (FDA, 2003b).

Viñas *et al.*, (2000) mencionan que si bien en general *E. coli* no causa enfermedades, en algunas ocasiones actúa como una bacteria patógena de mucha importancia en bacteriología médica y veterinaria. Un caso importante de esta situación es *E. coli* verotoxigénica (VTEC, acrónimo de Vero Toxigenic *Escherichia coli*). Las VTEC pertenecen a un amplio abanico de serotipos O: K: H, habiéndose detectado la producción de verocitotoxinas en cepas pertenecientes a unos 50 serogrupos O y más de 150 serotipos H diferentes. No obstante, los brotes o casos esporádicos de SUH solamente han involucrado a algunos de ellos, como O157:H7, O111:H-, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O145:H-, OX3:H21.

La diseminación de bacterias contaminantes durante el sacrificio de animales es considerada como la ruta iniciadora por la cual VTEC se incorpora a los alimentos. La colitis hemorrágica ha sido transmitida además por embutidos fermentados, leche cruda, yogures artesanales, sidra de manzana y mayonesa. Estos microorganismos también han sido aislados de productos vegetales, la contaminación de vegetales puede ser consecuencia del uso de abonos orgánicos de origen bovino. También el agua ha sido considerada vehículo de transmisión, habiéndose informado de brotes asociados a la ingestión de agua de bebida no clorada, o del contacto con piletas de natación y también de un lago contaminado. Entre los animales que actúan como reservorios, además del

bovino, se ha mencionado a los ovino y porcino. Otros animales que comparten su hábitat con el del hombre, tales como el perro y el gato, han sido descritos por varios autores como reservorios de VTEC (Hutchison *et al.*, 2000; Heuvelink *et al.*, 1998; Nataro y Kapper, 1998).

4.1.3. *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria Gram positiva, móvil por medio de flagelos. Del 1-10% de los humanos pueden portar *L. monocytogenes* en el intestino. Se ha encontrado en al menos 37 especies de mamíferos domésticos y salvajes, así como en al menos 17 especies de aves y posiblemente algunas especies de peces y crustáceos. Puede ser aislada del suelo, ensilajes y otras fuentes ambientales. Resiste bien los efectos deletéreos del congelamiento, secado y calor para ser una bacteria que no forma esporas. La enfermedad aguda recibe el nombre de listeriosis y es clínicamente definida cuando el organismo es aislado de la sangre, fluido cerebroespinal, o de otro sitio normalmente estéril (por ejemplo la placenta, el feto). Las manifestaciones de la listeriosis incluyen septicemia, meningitis (o meningoencefalitis), encefalitis, infecciones intrauterino o cervicales en mujeres embarazadas, lo cual puede resultar en abortos espontáneos (segundo y tercer trimestres) o bebés que nacen muertos. El inicio de los desórdenes ya mencionados se precede generalmente de síntomas tipo influenza incluyendo fiebre persistente. A sido reportado que síntomas gastrointestinales como náuseas, vomito y diarrea pueden preceder las formas más serias de listeriosis o ser los únicos síntomas expresados. El tiempo del inicio a las formas serias de listeriosis es desconocido pero puede extenderse a

partir de algunos días a tres semanas, así como el tiempo de inicio de los síntomas gastrointestinales ser mayor de 12 horas. La dosis infectiva es desconocida pero se cree varía con la cepa y la susceptibilidad de la víctima. *L. monocytogenes* puede invadir el epitelio gastrointestinal. Una vez que la bacteria entra a los monocitos del huésped, los macrófagos, o los leucocitos polimorfos nucleares, puede crecer en el torrente sanguíneo (septicemia). Su presencia intracelular en células fagocitarias también permite el acceso al cerebro y la migración probablemente transplacental al feto en mujeres embarazadas. La patogénesis se centra en su capacidad de sobrevivir y de multiplicarse en células fagocíticas del hospedero. La enfermedad en humanos sólo puede ser positivamente diagnosticada por cultivo del organismo a partir de la sangre y fluido cerebroespinal. *L. monocytogenes* se ha asociado a alimentos tales como la leche cruda, fluidos lácteos supuestamente pasteurizados, los quesos (particularmente variedades suave-maduras), helado, vegetales crudos, salsas fermentadas para carne cruda, aves de corral crudas y cocinadas, carnes crudas (todos los tipos), y pescados crudos y ahumados. Su capacidad de crecer en temperaturas tan bajas como 3 °C permite la multiplicación en alimentos refrigerados. Las principales poblaciones blanco para listeriosis son: mujeres embarazadas, personas inmunocomprometidas, pacientes con cáncer (particularmente leucemia), con menor frecuencia diabéticos, con cirrosis, asmáticos y pacientes con colitis ulcerativa; ancianos y gente normalmente sana consumiendo antiácidos o cimetidina.

Según información publicada por el CDC de 2,423 brotes causados por alimentos en el período 1988-1992, el 36 % fue debido a malas prácticas de higiene en la manipulación de los alimentos y el resto a la temperatura de conservación (WHO, 2000).

En México, en el año de 1993, se estimó una incidencia de 2.2 niños menores de 5 años con casos de enfermedades diarreicas agudas en el hogar, así como 694,316 consultas por enfermedades diarreicas agudas para niños menores de 5 años y 24'007,000 casos de enfermedades diarreicas agudas por año de niños menores de 5 años (Hernández *et al.*, 2000), mientras que el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática reporta la ocurrencia de 9,585 muertes por enfermedades infecciosas intestinales por cada 100,000 habitantes durante el año 1995 (Cisneros, 1999).

4.2. Las Herramientas Moleculares en la Inocuidad

El no tener éxito en el cultivo microbiológico de algunas bacterias no es sinónimo de garantía de la no presencia de bacterias, ya que lo anterior puede deberse a un estado de sobrevivencia programada o a daño subletal lo cual proporciona información engañosa sobre el estatus de viabilidad de bacterias estresadas (Lahtinen *et al.*, 2006).

González y Rojas (2005) señalan que un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran y posiblemente el vehículo alimentario implicado ya no se

encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal. Uno de ellos es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). El éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos causantes de ETA depende, entre otros factores, de la elección correcta de la secuencia blanco. Las regiones genómicas más comúnmente empleadas en el diseño de iniciadores para la identificación de microorganismos patógenos son las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas.

Fera *et al.*, (2004) evaluaron los métodos clásicos y las técnicas moleculares para determinar la presencia de formas no viables y viables pero no cultivables de *Arcobacter* spp. Mencionan que esta última forma es una sofisticada estrategia desarrollada por muchas bacterias Gram-negativas para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, señalando que la pérdida de la capacidad de ser cultivada no puede garantizar una pérdida de patogenicidad, por lo que deben emplearse métodos más creíbles para la correcta identificación de estos organismos, que no consuman mucho tiempo y no produzcan resultados dudosos o pobres como las técnicas microbiológicas, y que sean rápidos y confiables como las técnicas basadas en la amplificación del ADN.

Callicott *et al.*, (2005) describen un método simple para la preparación de ADN a partir de aislados no cultivables de *Campylobacter jejuni* mantenidos en un medio especial para transportar muestras microbiológicas, y mencionan que con este método

aislados no recuperables por métodos microbiológicos pueden ser usados para proporcionar información filogenética para estudios epidemiológicos.

4.3. Técnicas de Tipificación Molecular para Identificar Patógenos

Dado que está demostrado que existe una gran diversidad genética y recombinación intragénica en los microorganismos, lo cual los hace que se adapten a diversos ambientes, hay quienes proponen que la mejor forma de caracterizar y entender la presencia de los microorganismos en uno o varios ambientes es a través del uso de técnicas genéticas moleculares (Souza *et al.*, 2001).

Donde una vez los científicos buscaron anticuerpos relacionados con la enfermedad en un paciente, ahora pueden identificar el organismo mismo causante de la enfermedad por métodos nunca antes imaginados. Algo común, a estas técnicas, lo es la molécula de ADN. Ahora es posible reproducir el ADN en un tubo de ensayo, fragmentar éste, determinar su composición, cambiar su estructura, y mapear sus genes. Los principios aprendidos de estas técnicas han sido aplicados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, detectar individuos con cáncer y enfermedades genéticas, y asegurar la salud pública identificando patógenos. Muchas de estas técnicas han sido posibles gracias a una tecnología de la PCR (Alcano, 2001).

Los métodos de tipificación molecular pueden ser clasificados en tres amplios grupos basándose en el tipo de macromolécula a ser tipificada: métodos basados en

lipopolisacáridos y ácidos grasos, métodos basados en proteínas, y métodos basados en ácidos nucleicos. Dentro de estos últimos, se puede mencionar el análisis de restricción de ADN cromosomal, el análisis de plásmidos, las técnicas de hibridación, electroforesis de gel en campo pulsado, y la tipificación basada en PCR (Swaminathan y Matar, 1993). Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR, se fundamentan en el mismo principio general común a todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos. Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE, y permiten trabajar con un mayor número de muestras (Cockerill, 1999; Fernández, 2004).

4.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este es un método *in vitro* para amplificar secuencias específicas de ADN. Es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades, sobre todo de aquellas provocadas por patógenos difíciles de cultivar (González y Rojas, 2005). Iniciando con cantidades traza de una secuencia particular de ácido nucleico de cualquier fuente, la PCR enzimáticamente genera millones o billones de copias exactas, por lo tanto, haciendo de los análisis genéticos un proceso relativamente simple, con

aplicaciones directas en los campos de investigación genética, diagnósticos médicos y la ciencia forense (Bernard y Pasternak, 1998).

La PCR es una síntesis de polimerización enzimática que se lleva a cabo en ciclos térmicos. La enzima participante es una polimerasa termoestable y en la reacción, secuencias de ADN son copiadas muchas veces. El producto de la polimerización del primer ciclo de la reacción, sirve de molde para el siguiente, de tal modo que el número de copias del ADN blanco se duplica exponencialmente en cada ciclo de polimerización. Así, 30 ciclos de síntesis a partir de una molécula de ADN, producirá la sorprendente cantidad teórica de un billón de moléculas nuevas de ADN. El segmento amplificado puede visualizarse en un gel de agarosa o poliacrilamida. Un ciclo térmico de PCR implica tres pasos fundamentales: 1) Desnaturalización, separa el ADN en dos cadenas sencillas. 2) Alineación del iniciador a la molécula molde. 3) Extensión del iniciador mediante una polimerización, en dirección 5' a 3' por medio de una ADN polimerasa y desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs). Esta extensión de los iniciadores resultará en la síntesis de una copia del ADN. Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo y dan por resultado que la molécula de ADN de doble cadena sea copiada para producir 2 cadenas de ADN "hijas" (Silva *et al.*, 1999).

Oliveira *et al.*, (2002) reportaron que encontraron 100% de especificidad para detectar la presencia de *Salmonella* spp y para identificar el serotipo *S. Typhimurium* con la PCR en muestras colectadas en el ambiente de granjas avícolas, mencionando además 128% más de muestras positivas al conjugar la PCR con el paso de enriquecimiento en caldo

selectivo Rappaport-Vassiliadis, reduciendo el tiempo de detección de siete días a 48 h. Ohtsuka *et al.*, (2005) por su parte, al comparar los métodos LAMP, PCR y microbiológico para detectar la presencia de *Salmonella* en huevo líquido, encontraron que la PCR falló en un 10% para detectar muestras que fueron positivas por los otros dos métodos no obstante que LAMP y PCR se hicieron a partir del medio de preenriquecimiento agua peptonada tamponada. Ellos consideraron la posibilidad de falsos positivos, como explicación de la superioridad de LAMP sobre PCR.

Maurer *et al.*, (1999) diseñaron un par de iniciadores para amplificar un fragmento de 420 pares de bases (pb) del gen *rfb* en serotipos de *E. coli* O157 y encontraron que la PCR fue específica, detectando desde 10 células en muestras de leche y estiércol bovino. Además mencionan que conjuntamente con protocolos de enriquecimiento, la PCR constituye un método rápido, específico y sensitivo para la identificación de *E. coli* O157.

Löfström *et al.*, (2004) mencionan varios obstáculos presentes en las muestras de alimento para animal analizadas para la presencia de *Salmonella* por PCR, entre ellos bajas concentraciones y distribución desigual del organismo blanco, el medio de enriquecimiento o sus componentes y altos niveles de la flora acompañante en la muestra, siendo este último un factor que limita la eficiencia de la PCR.

Burtscher *et al.*, (1999) señalan que el problema con la PCR, es el hecho de que la *Taq* DNA polimerasa es fácilmente inhibida por un número de sustancias presentes en desechos orgánicos, tales como los ácidos húmicos y fúlvicos, grasas, proteínas, y iones

metálicos, siendo también inhibida por químicos requeridos para el enriquecimiento selectivo de células o la extracción del ADN, remarcando que una extracción eficiente y purificación del ADN son cruciales para amplificación exitosa.

Weinstein del Lawrence Livermore National Laboratory (S&TR, 2000) señala algunas de las características de un marcador ideal para la identificación de organismos patógenos o con potencial de usarse en bioterrorismo por medio de técnicas moleculares como la PCR: pocas regiones cortas (<0.1% total), que ocurra solamente en el patógeno (no se generen falsos positivos), que ocurra en todas las variantes (no produce falsos negativos), que sea un gen necesario para la virulencia.

4.3.2. PCR Múltiplex

En PCR múltiplex, dos o más secuencias únicas de ADN blanco en la misma reacción son amplificadas simultáneamente. Esta técnica es usada para amplificar el ADN de varios organismos en una sola prueba. Esta demandante técnica es usada para tamizaje genético, detección de patógenos, análisis de microsatélites y otras aplicaciones donde es necesario amplificar varias regiones de ADN en una sola reacción (Tang *et al.*, 1997).

Soumet *et al.*, (1999) estandarizaron condiciones de PCR múltiplex para detectar simultáneamente en muestras de ambientes de granjas avícolas la presencia de *Salmonella* spp, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, evaluando tres métodos de preparación

de la muestra para la PCR-múltiplex. Encontraron que la combinación Rappaport Vassiliadis Semisólido Modificado (MSRV, por sus siglas en inglés)-PCR múltiplex detectó las mismas muestras positivas que el método microbiológico, pero no así los otros dos métodos, explicando que estos últimos detectaron menos muestras positivas debido probablemente a inhibidores presentes en las mismas y que no pudieron ser removidos después de la preparación de la muestra. Mencionan también que debido a que uno de los pares de iniciadores fue diseñado para amplificar un gen de un plásmido virulento presente solamente en el 30% de las cepas de *S. Enteritidis* aisladas en ambientes de granjas avícolas, nuevos pares de iniciadores deben ser evaluados para identificar por igual a todos los aislados de este serotipo.

Lim *et al.*, (2003) diseñaron iniciadores y estandarizaron condiciones para una prueba de PCR múltiplex para identificar a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediante la detección simultáneamente los genes *rfbJ*, *fliC* y *fljB* que codifican para los antígenos O4, H:i y H:1,2 respectivamente. Encontraron que los productos amplificados fueron suficientemente específicos para la detección del serovar Typhimurium, ya que el juego de iniciadores utilizado permitió la identificación específica de la combinación antigénica mencionada exclusiva del serovar Typhimurium.

Bubert *et al.*, (1999) desarrollaron un juego de iniciadores a partir del gen *iap* que codifica para la proteína p60 en todas las especies de *Listeria* y el cual tiene regiones conservadas, así como regiones específicas por especie, los cuales en una reacción de PCR-múltiplex les permitió la detección específica y diferenciación de especies de

Listeria, pudiendo identificar a *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, y *L. welshimeri* en la misma reacción.

Escherichia coli O157: H7 puede causar enfermedades fatales como el síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica, con síntomas iniciales similares a los de otras bacterias gastrointestinales, por lo tanto la disponibilidad de un método rápido y preciso es importante para el reconocimiento inicial. Pan *et al.*, (2002), reportan que trabajaron PCR múltiplex con iniciadores para detectar la presencia de los genes *hlyA*, el cual produce enterohemolisina, *eaeA* (intimina), *stx1* (Shiga-like toxin I), *stx2* (Shiga-like toxin II), *fliC* (antígeno H flagelar), y *rfb* (antígeno O de superficie) de *E. coli* O157:H7. Ellos encontraron que esta técnica mejoró la especificidad comparada con la PCR general cuando se usan con $\geq 10^3$ UFC. Específicamente se examinaron 32 serotipos de *E. coli* O157:H7 provenientes de USA, Japón, Canadá y Taiwán, todas las cuales fueron positivas para *hlyA*, *eaeA*, *fliC*, *rfb*, y *stx1* y/o *stx2*. 35 serotipos diferentes a O157 no virulentos de *E. coli*, dos serotipos de *Shigella* sp, y dos *Salmonella* sp, fueron también examinados y ninguno dio resultados positivos de la expresión de genes mencionados atrás. Esta PCR múltiplex fue altamente específica para identificar y fue más útil que la PCR general en detecciones clínicas iniciales de este patógeno.

4.3.3. Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas. Con esta técnica

se estudia una región muy limitada del genoma (p. ej., gen *fliC* que codifica para la proteína flagelina la cual forma el flagelo en *Salmonella* y otras bacterias). Por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de otros métodos de tipificación. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. El poder de discriminación de la técnica de PCR-RFLP es inferior al de la PFGE aunque puede incrementarse utilizando varias enzimas de restricción. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción (Fernández, 2004).

Hidaka *et al.*, (2000) emplearon la técnica de PCR-RFLP para tratar de distinguir especies del género *Mycobacterium*, para ello amplificaron por PCR un fragmento de 368 pb del gen que codifica para un antígeno de 65 kD el cual es común a las especies de *Mycobacterium*, y luego digerido con la enzima de restricción *HaeIII*. El análisis les permitió identificar a *M. tuberculosis* y a siete especies de micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* en base a los diferentes patrones de restricción, concluyendo que PCR-RFLP es una forma muy útil de distinguir especies de micobacterias incluyendo a *M. tuberculosis*.

Wu *et al.*, (2003) mencionan que en la caracterización de *Cryptosporidium parvum* con la técnica PCR-RFLP se han usado varios genes, pero que debido a las pocas diferencias en la secuencia nucleotídica de éstos no se ha detectado variabilidad intra

genotípica, recomendando la búsqueda y uso de otros genes con mayor variabilidad, como el gene Cpgp40/15 que codifica para una glicoproteína. Ellos usaron este gen con la técnica PCR-RFLP realizando doble digestión con las enzimas *RsaI* y *AluI* con lo que pudieron diferenciar exitosamente aislados de *C. parvum*.

Kilger y Grimont (1993) señalan que no obstante la serotipificación es un método preciso y confiable para diferenciar serotipos de *Salmonella*, esta técnica emplea mucho tiempo, así como de un juego de 167 muestras de sueros específicos, mientras que la técnica PCR-RFLP en base al gen *fliC* utilizada por ellos, probó ser un método útil en la identificación de serotipos de *Salmonella* que han perdido su flagelo pero que poseen el gen *fliC* en estado reprimido.

Winstanley *et al.*, (2001) describen la aplicación de la técnica PCR-RFLP en base al gen *fliC* de *Burkholderia cepacia* para determinar la correlación entre el genotipo del gen para la proteína flagelina y la designación del genomovar. Encontraron que las cepas que comparten el mismo patrón de restricción son consistentes en cuanto a la designación de su genomovar, concluyendo que este método de genotipificación en base al gen *fliC* de *B. cepacia* puede ser usada como herramienta epidemiológica para la identificación de cepas similares pero de diferente origen.

Smith y Selander (1990), mencionan que se ha sugerido que la diversidad antigénica en la proteína flagelina de los serotipos de *Salmonella* es generada por una rápida deriva aleatoria en la secuencia aminoacídica de la región central, apoyando esta hipótesis el

hecho de que los péptidos trípticos solubles a partir de las proteínas de la flagelina fase 1 de dos aislados de *S. Typhimurium* LT2 diferían en al menos cinco aminoácidos. Si las flagelinas de células clonales de la misma cepa pueden exhibir este nivel de divergencia, se puede esperar encontrar que los genes para la flagelina contengan las secuencias más variables del genoma de *Salmonella*, proporcionando un poderoso sistema para la determinación de relaciones filogenéticas entre cepas estrechamente relacionadas y una rica fuente de marcadores para investigación epidemiológica.

4.3.4. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

Esta técnica permite la generación de fragmentos de restricción simplificados de cromosomas sin tener que recurrir a los métodos de hibridación de sondas. En este método, las endonucleasas de restricción que cortan el ADN infrecuentemente son usadas para generar largos fragmentos de ADN cromosomal, los cuales luego son separados por procedimientos especiales de electroforesis. Como los fragmentos muy largos (más de 40 Kb) no pueden migrar por los poros de la matriz convencional de gel de agarosa, éstos son resueltos alterando cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis. El procedimiento para aislar el ADN incluye el atrapamiento de bacterias en insertos de agarosa. Las células son lisadas por el tratamiento de los insertos de agarosa con enzimas y detergentes. Mientras el largo fragmento de ADN cromosomal permanece atrapado en la matriz de gel de agarosa, otros contaminantes son removidos por diálisis o lavado excesivo. Las enzimas utilizadas cortan el ADN en un número pequeño de fragmentos largos de restricción. Los insertos de agarosa conteniendo los

fragmentos de ADN son utilizados en la electroforesis de campo pulsado. Dependiendo del número de bases a separar será el tipo de PFGE a utilizar: para separar fragmentos con menos de 106 pb, se puede utilizar la técnica de gel electroforesis de inversión de campo, o bien la de gel electroforesis de alternación ortogonal de campo. Para fragmentos más grandes se requerirá la electroforesis de campo con alternación del ángulo, que tiene dos modalidades, la electroforesis transversa de campo alternante y la electroforesis de campo eléctrico homogéneo de contorno sujeto. Estas dos últimas modificaciones se utilizan para separar fragmentos en un rango de 200 Kpb a 12 Mpb. PFGE ha sido utilizado para tipificar bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *C. jejuni*, etc. Para algunas bacterias como *L. monocytogenes* PFGE ha tenido gran capacidad discriminatoria, mejor que ribotipificación y RFLP (Swaminathan y Matar, 1993).

Fitzgerald *et al.*, (2001), en un trabajo para diferenciar aislados de *C. jejuni* obtenidos en un brote epidemiológico, probaron varios métodos de tipificación y encontraron que PFGE tuvo el más alto poder de discriminación, pero que también fue el más laborioso (3-4 días). Mencionan, no obstante, que para ellos es el método estándar de excelencia ya que examina polimorfismos a lo largo de todo el genoma.

Davis *et al.*, (2003), mediante PFGE determinaron la función que el alimento para ganado pueda tener como posible vehículo transmisor de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp hacia el ganado. Encontraron en algunas granjas que hubo patrones de PFGE indistinguibles para *Salmonella* Typhimurium DT104 y *E. coli* O157:H7 entre los

aislados obtenidos en el alimento y aquellos obtenidos de muestras fecales dentro de una misma granja, concluyendo que existe evidencia que demuestra que el alimento es un factor de riesgo en la transmisión de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* hacia el ganado.

Moore *et al.*, (2003a), compararon las características fenotípicas y genotípicas de *Salmonella enterica* serovar Bredeney con las de aislados obtenidos en un brote de gastroenteritis relacionado con pollos en Irlanda del Norte. Encontraron que todas las muestras de pollo cocido así como las ambientales de las carnicerías donde se cocinaron los pollos, fueron negativas para *S. Bredeney*, y sólo una muestra tomada de una carcasa cruda fue positiva para *S. Bredeney*. También encontraron una buena correlación entre los resultados del antibiograma y los de PFGE y RAPD, y que los potenciales problemas de reproducibilidad de la técnica RAPD hacen que PFGE pueda ser un esquema de tipificación más estable, reproducible y fácil de estandarizar entre laboratorios. Concluyen que la fuente y ruta de transmisión más probable de *S. Bredeney* en este brote fueron carcasas contaminadas de pollo desde un proveedor local hacia una carnicería, donde hubo un rompimiento del esquema HACCP.

5. MÉTODOS

5.1. Localización del Sitio Experimental

Los análisis de caracterización molecular se realizaron en el Laboratorio Central Regional de Monterrey (LCRM) del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria de Nuevo León (CFPPNL), localizado en las instalaciones de la Exposición Ganadera en la ciudad de Guadalupe, N. L, en la Unidad de Investigación en Biología Molecular y Celular del INIFAP, convenio UANL-INIFAP, ubicado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, así como en la Unidad de Investigación Microbiológica en Seguridad Alimentaria del USDA-ARS en Wyndmoor, PA, E.U.A.

5.2. Controles Positivos

Se utilizaron como controles positivos cepas de referencia de *Salmonella enterica* serotipos Typhimurium (ATCC 13311), Paratyphi A (ATCC 9150), Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* O157:H7 (Donada por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. (CENAPA) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644).

5.3. Muestras Cárnicas

El método diagnóstico utilizado en el muestreo bacteriológico de las plantas Tipo Inspección Federal (TIF) de las canales de bovino y porcino fue el método no destructivo, que se explica en el punto 5.3.1. Para las especies bovinas y porcinas se utilizó la metodología de arrastre por esponja. Por otra parte se analizaron muestras de carne de res, cerdo y/o pollo remitidas al LCRM para su análisis microbiológico.

5.3.1. Muestras a Partir de Canales de Res y Cerdo

La toma y manejo de las muestras con esponja se realizó conforme a lo especificado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109 SSA1-1994 y la NOM 030 ZOO-1995. Los muestreos se realizaron en dos plantas procesadoras de productos cárnicos, una de cerdo (I) y una de bovino (II) localizadas en la Comarca Lagunera, México, en dos fechas para cada planta, 20/02/2004 y 15/03/2004 para la planta I y 02/03/2004 y 24/03/2004 para la planta II. Las canales se muestrearon inmediatamente a su arribo al área de inspección y sellado (15 y 10 minutos en promedio después del inicio del sacrificio del animal hasta la toma de las muestras, respectivamente para canal de bovino y cerdo). En cada planta procesadora se procedió a muestrear 15 canales al azar para el análisis de superficies, a las cuales se les muestreo con esponja estéril (Nasco, Modesto, CA USA) embebida en 10 ml de agua peptonada tamponada (APB por sus siglas en inglés) estéril 0.1%, en tres sitios diferentes (una esponja por sitio): falda (sitio A), costado (sitio B) y cuello (sitio C), para un total de 45 muestras por planta. El área que se

muestreo fue de 100 cm². Después de frotar la superficie, la esponja se depositó en la bolsa Whirl-Pak estéril (Nasco, Modesto, CA USA) con el resto del diluyente y fue transportada en refrigeración para ser procesada en el laboratorio. De las 15 muestras de cada sitio de la canal (A, B, C) se formaron tres grupos de cinco muestras cada uno, para tener nueve muestras compuestas por planta, lo que dio un tamaño final de 18 muestras compuestas en las dos plantas.

5.4. Muestras de los Sistemas Productivos de Melón y Chile Tipo Bell

Las muestras a partir del sistema productivo de melón, procedían de los municipios Santiago Ixcuintla y Rosamorada en el estado de Nayarit, México y fueron obtenidas por personal del INIFAP-Nayarit, así como de los municipios de Matamoros y Parras de la Fuente (Comarca Lagunera), Coahuila, México, obtenidas en colaboración con personal del INIFAP-Matamoros, Coah. Las muestras se obtuvieron de huertas manejadas bajo dos esquemas de producción, con buenas prácticas agrícolas (BPA) y sin éstas. Las muestras que procedían del estado de Nayarit se obtuvieron de cuatro huertas (tres sin BPA y una con BPA) en cuatro diferentes fechas (25/02/05, 04/03/05, 16/03/05 y 11/04/05) respectivamente. Las muestras obtenidas en el estado de Coahuila se obtuvieron de 12 huertas (nueve con BPA y tres sin BPA) en siete fechas diferentes 12/07/05, 30/08/05, 26/09/05, 11/10/05, 18/10/05, 26/10/05, 28/06/06, siendo la última fecha de muestreo para las huertas sin BPA. También se obtuvieron muestras a partir de lavados de frutos de melón y de manos de trabajadores en dos bodegas del mercado de abastos estrella de la ciudad de Monterrey, N. L., México, en dos fechas 13/10/05 y

01/11/05. Las muestras obtenidas a partir del sistema productivo de chile tipo Bell procedían del estado de Sinaloa, México, se obtuvieron durante el mes de Abril del 2005 de una huerta sin BPA y fueron obtenidas por personal del INIFAP-Sinaloa. Las muestras consistieron en lavados de frutos en huerta, frutos en empaque, frutos en bodega, agua del canal de riego, agua dentro de la huerta, cosechadores, trabajadores en bodega, carretillas, caja de vehículo de transporte y suelo.

5.4.1. Muestras a Partir de Frutos

En cada huerta (de melón o chile) el área se dividió en cinco cuadrantes (I, II, III, IV, y V) representativos de la superficie de muestreo y en cada cuadrante (punto de muestreo) se colectaron 5 frutos. Los frutos se tomaron al azar en el campo en un radio de tres metros y no se les eliminó ninguna partícula adherida de suelo ni de otro tipo. El lavado de los frutos se realizó en el campo y consistió en el lavado de la superficie externa del fruto. Para el lavado, cada fruto se colocó en una bolsa de plástico con capacidad de 3 l tomándose cada fruto con guantes (por cada muestra se uso un par de guantes) con la finalidad de evitar contaminación cruzada. A cada bolsa con el fruto se le adicionó 200 ml de APB estéril 0.1%. Posteriormente se lavó el fruto dentro de la bolsa y se homogenizó muy bien por lo menos 2 min. Los lavados de cada uno de los cinco frutos que corresponden a un punto de muestreo se juntaron en un frasco estéril para constituir una muestra. Las muestras se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio, para proseguir con el procesamiento microbiológico dentro de las 24 h de haber sido colectadas. En el empaque se tomaron cinco frutos al azar de la banda de selección y se

procedió al lavado y manejo igual que para los frutos procedentes del campo. Se procedió de igual manera para el lavado de frutos en bodega.

5.4.2. Muestras a Partir de Manos de Cosechadores y/o Trabajadores en Bodega

Para realizar el muestreo se usaron guantes estériles (un par por trabajador). Las manos de los trabajadores se frotaron con esponja estéril (Nasco) embebida en 10 ml de APB al 0.1%. Posteriormente la esponja se guardó en bolsa Whirl-Pak estéril (Nasco, Modesto, CA USA) y se mantuvo en frío hasta su procesamiento dentro de las 24 h.

5.4.3. Muestras a Partir de Carretillas y Vehículo de Transporte

La superficie de las carretillas fue muestreada de igual forma que para las manos de los trabajadores, pero en este caso se talló toda la superficie de carga de la carretilla. Para el muestreo de la caja del vehículo de transporte se pasó la esponja al azar por cinco partes de la caja del vehículo.

5.4.4. Muestras a Partir de Agua de Riego

Se tomaron directamente 100 ml del agua del canal de riego y además, se tomó agua que se encontró dentro de la huerta. Las muestras se tomaron en frascos estériles de vidrio, los cuales se colocaron en hielo para ser trasladados al laboratorio para su análisis dentro de las 24 h.

5.4.5. Muestras de Suelo

Las muestras de tierra (aproximadamente 500 g) se tomaron con barrena a una profundidad de 25 cm en puntos al azar dentro de la huerta y con cucharas estériles se vaciaron en bolsas estériles de polipropileno. Las muestras se colocaron en hielo para su traslado al laboratorio y posterior análisis dentro de las 24 h.

5.5. Análisis Microbiológico de las Muestras

Las muestras se analizaron según las siguientes metodologías:

5.5.1. Aislamiento de *Salmonella* spp

Para las muestras cárnicas tomadas con esponja se adicionaron a la muestra 50 ml de APB, se homogenizó y se incubó por 20-24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. En el caso de las muestras cárnicas remitidas al LCRM, se pesaron 25 ± 0.5 g de carne en bolsa estéril Whirl-Pak y se adicionaron 225 ml de APB. Para las muestras a partir de los sistemas productivos de melón y chile, como casi todas eran muestras líquidas (lavados o muestras de agua) a cada muestra se adicionaron 50 ml de APB. Para las muestras de suelo se tomó 1 g de la muestra y se adicionó a 9 ml de APB. Las muestras se homogenizaron manualmente por 2 min y se pusieron a incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20-24 h. Después de este tiempo se transfirieron 0.5 ± 0.05 ml en 10 ml de caldo Tetrionato (TT) y 0.1 ± 0.02 ml en 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis modificado (mRV por sus siglas en inglés). Se incubaron

a $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h en baño con agitación. A partir de estos medios de cultivo se efectuó una siembra en 4 cuadrantes en medios de cultivos selectivos de agar lisina doblemente modificado (DMLIA por sus siglas en inglés) y agar Verde Brillante con Sulfadiazina (BGS por sus siglas en inglés). Se usó una sola asa y placa por muestra. Las placas se pusieron a incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Después de este tiempo se examinó el crecimiento en las placas. Las placas sin crecimiento se volvieron a incubar otras 18-24 h y se volvieron a examinar. Para la determinación de la morfología colonial en agar BGS, se seleccionaron las colonias de color rosa y opacas con apariencia tersa y rodeadas por un halo de color rojo. Estas características corresponden a colonias lactosa y sacarosa negativas típicas en *Salmonella* spp. En la determinación de la morfología colonial en agar DMLIA, se seleccionaron las colonias de color púrpura con o sin centro negro, con base en que las cepas de *Salmonella* típicamente en medio DMLIA utilizan la lisina y no metabolizan la lactosa. Para la identificación bioquímica preliminar se seleccionaron 3 colonias probables de ser *Salmonella* de cada medio selectivo y cada una de ellas se inoculó en medios para la identificación preliminar de los microorganismos: en agar tres azúcares y hierro (TSI por sus siglas en inglés) y el agar hierro-lisina (LIA por sus siglas en inglés), se inocularon por punción y estría en la superficie y se incubaron a 35°C por 24 h. También se utilizó el medio de Motilidad-Indol-Ornitina (MIO) el cual se inoculó por punción y se incubó el mismo tiempo y temperatura que los medios TSI y LIA.

Fueron consideradas como *Salmonella* aquellos organismos con una reacción K/A (base sobre ácido) con o sin producción de gas y H_2S en TSI, una reacción K/K (base

sobre base) en LIA con o sin producción de H₂S y una descarboxilación de ornitina positiva sin producción de indol.

5.5.1.1. Sistema bioquímico y antisueros.

Las colonias cuya clona resultó con morfología bacilar y que reaccionaron negativamente a la tinción de Gram (datos no mostrados), se identificaron mediante el sistema API 20 E (bioMérieux Marcy l'Etoile France) según especificaciones técnicas del fabricante y se aglutinaron con el antisuero para *Salmonella* O poly A-1 & Vi (Difco) según metodología del fabricante.

5.5.2. Aislamiento de *Escherichia coli*

En condiciones de esterilización, se agregaron 15 ml de APB estéril a la esponja en la bolsa. Se realizó el muestreo de las canales, como se mencionó anteriormente. Esta suspensión se consideró como muestra directa y representa la dilución 10°. A partir de ella se realizan las diluciones necesarias para obtener las cuentas reales del muestreo. Después, las diluciones fueron colocadas en una placa petrifilm™ (3M) sobre una superficie de trabajo totalmente plana, se levanto la lamina superior y se depositó con cuidado 1 ml de las diluciones realizadas y se depositaron en el centro de la lámina, se cubrió delicadamente y se incubó a 35 °C por 48 h. Después de este tiempo se contaron las colonias. Con el resto de la solución que contenía la esponja se procedió a realizar el aislamiento de *E. coli* O157:H7.

5.5.2.1. Aislamiento de *E. coli* O157:H7 por el Método Reveal.

Para las muestras de esponjas y lavado de frutos, se agregaron 90 ml del medio cultivo Reveal previamente preparado con agua estéril con un pH de 7 ± 2 ; para muestras de carne, se pesaron 25 g de carne la cual se colocó en una bolsa (Nasco estéril) y se adicionaron 225 ml del caldo Reveal, las muestras fueron colocadas en un homogenizador peristáltico (Modelo 3081L Type BA7020) durante 1 min, seguido de una incubación de 42 °C por 8 h.

5.5.2.1.1. Método Rápido Test Reveal. Se llevó a cabo un método rápido para la detección de *E. coli* O157:H7, por medio del dispositivo Reveal (Inmunoprecipitación en capa fina). Esta prueba permite la detección de *E. coli* O157:H7 después de 8 a 20 h de incubación en un medio de enriquecimiento en el pozo del dispositivo, con el fin de que la muestra sea difundida en la membrana de nitrocelulosa al llegar a la zona de reacción donde se encuentran los anticuerpos monoclonales específicos marcados con oro coloidal y en presencia de los antígenos correspondientes, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Estos complejos migran a través de la membrana que actúa como una capa fina, hasta una zona de reacción que contiene una segunda línea de anticuerpos específicos.

5.5.2.1.2. Aislamiento Selectivo. Del enriquecimiento (Reveal) se tomó una alícuota de 0.1 ml, y se depositó en la superficie de agar MacConkey sorbitol (Difco) suplementado con 0.05 mg/ml de cefixima (Denvar) y 2.5 mg/l de telurito de potasio

(Sigma) (MCS+CT); el inóculo se dispersó en cuatro cuadrantes en el cual se aseguró la distribución y aislamiento de las colonias. Las placas se incubaron a 37 °C por 18-24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron cinco colonias típicas de *E. coli* O157:H7 (colonias no fermentadoras de sorbitol; incoloras con centro oscuro) y se sembraron en agar soya tripticasa (AST) (Difco) adicionada con extracto de levadura (Bioxon) por medio de estría en 4 cuadrantes, las placas se incubaron a 37 °C y a las 24 h, se seleccionaron las colonias características con las cuales se llevaron a cabo las pruebas de indol y MUG.

5.5.2.1.3. Aislamiento y Sistema Bioquímico. Colonias que presentaron características bioquímicas se sembraron en AST (Difco) y se incubaron durante 24 h a 35 °C para después realizar la aglutinación con antisueros O157:H7 (Difco) y H7 (Difco), además del Sistema API 20E (BioMérieux Marcy l'Etoile France), siguiendo las instrucciones del fabricante para cada uno de ellos.

Para las muestras a partir de los sistemas productivos de melón o chile. Se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito, solamente que en este caso se partió de los lavados de chile y melón.

5.5.3. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

En el caso de las muestras cárnicas remitidas al LCRM, se pesaron 25 ± 1.0 g de carne en bolsa estéril Whirl-Pak y se adicionaron 225 ml de UVM. Para las muestras a

partir de los sistemas productivos de melón y chile, como casi todas eran muestras líquidas (lavados o muestras de agua) de cada muestra se tomaron 25 ml de agua y fueron adicionados a 225 ml de caldo UVM, para las muestras de suelo se tomó 1 g de la muestra y se adicionó a 9 ml de UVM. Cada muestra se homogenizó manualmente por 2 min y se incubó a 35 ± 2 °C por 22-24 h. Después de este tiempo se transfirió $0.1 \text{ ml} \pm 0.02 \text{ ml}$ del medio UVM a $10 \pm 0.5 \text{ ml}$ de caldo Fraser en tubo Falcon de 15 ml. Enseguida se pusieron los tubos a incubar 35 °C por 24 h. A partir de las muestras que mostraron ennegrecimiento por la hidrólisis de la esculina, se efectuó una siembra en placa en 4 cuadrantes en el medio selectivo agar Oxford modificado (MOX). Se usó una sola asa y placa por muestra. La placa se puso a incubar a 35 ± 2 °C por 24 h. Después de este tiempo las colonias presuntivas se confirmaron con el sistema API *Listeria*.

5.6. Extracción del ADN

La extracción se hizo a partir de cada medio de enriquecimiento específico para cada patógeno. Primero se inactivaron los microorganismos poniendo los tubos a hervir en agua durante 5 minutos y dejándolos enfriar a temperatura ambiente. De cada tubo marcado se tomó 1 ml del medio de enriquecimiento, se depositó en tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos (Centrifuga Sigma 1-15K, Alemania), repitiendo lo anterior dos veces más para formar una pastilla y hacer la extracción de ADN con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) pero omitiendo el uso de polivinilpirrolidona y mercaptoethanol. La pastilla se resuspendió en 400 µl de buffer amortiguador TE 1X pH=8 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). Se adicionaron 50 µl de

lisosima (10 mg/ml), se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 75 µl de SDS al 10% más 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml), se agitó por inversión e incubó a 65 °C durante 10 min en baño seco. Enseguida se agregaron 100 µl de NaCl 5M y nuevamente se mezcló. Después se adicionaron 100 µl de una solución precalentada a 65 °C de CTAB/NaCl (2% CTAB; 10mM Tris-HCl pH=8; 20mM EDTA pH=8; 1.4M NaCl) se agitó hasta que la solución tomó una consistencia lechosa y se incubó a 65 °C durante 10 min en baño seco. Enseguida la mezcla anterior se calentó en agua hirviendo por 5 min para inactivar las enzimas. Se adicionaron 750 µl de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1), se agitó por inversión para hacer una solución homogénea y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml (aproximadamente 300 µl) y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol (180 µl aproximadamente) para precipitar los ácidos nucleicos, se dejó incubando a -20 °C durante 30 min. Después se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol frío, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. El alcohol se dejó evaporar al aire con el tubo destapado por aproximadamente 20 min. Finalmente el ADN obtenido se resuspendió en 20 µl de buffer TE 1X estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.7. Búsqueda de Iniciadores y Secuencias Reportadas en Bancos de Genes para Cada uno de los Patógenos en Estudio

En el Banco de Genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina/Instituto Nacional de

Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, se realizó una búsqueda de iniciadores y secuencias reportados para amplificar los genomas de *Salmonella* spp, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

5.8. Simulaciones de PCR Mediante el Programa Amplify 1.2

Después de analizar iniciadores y secuencias reportadas para *Salmonella* spp, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, se realizaron simulaciones de PCR con el programa Amplify 1.2, (Amplify, 1992), para seleccionar los iniciadores que tuvieran un mejor alineamiento (tablas XIII, IX, y X, apéndices A, B y C respectivamente).

5.9. Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PCR Express (ThermoHybaid, USA) y los volúmenes utilizados y las condiciones de cada reacción se describen a continuación.

5.9.1. Reacciones de PCR para *Salmonella* spp

Se hicieron reacciones de PCR separadas en base a los genes *invA* (invasión), *fliC* (proteína flagelina) y *sdfl* (región diferencial I) de *S. Enteritidis*. Las reacciones de PCR en base al gen *invA* se realizaron en volúmenes de 25 µl, utilizando de 25 a 50 pmoles de los iniciadores descritos por Rahn *et al* (1992) (tabla XIII, apéndice A), 200 µM de una

mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1-3 mM de MgCl₂, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 1.0 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para completar el volumen final. Las condiciones del termociclador fueron un ciclo de 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento a 58 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 30 seg, con una extensión final a 72 °C por 10 min.

Para el gen *fliC* la mezcla de PCR contenía 25 pmoles de cada uno de los iniciadores (tabla XIII, apéndice A), 250 µM de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1 mM de MgCl₂, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 2.5 U de *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 µl. Las condiciones de corrida del PCR fueron: desnaturalización a 95 °C por 1 min y luego 35 ciclos adicionales con desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineado de iniciadores a 60 °C por 30 seg, y extensión a 72 °C por 30 seg. Después del último ciclo las muestras se mantuvieron a 72 °C por 10 min para completar la síntesis del ADN.

Puesto que algunos de los aislados provenían de aves, para descartar que pertenecieran al serotipo *S. Enteritidis*, se estandarizó una reacción de PCR para amplificar el gen *sdfl*. El volumen de la reacción fue de 25 µl, utilizando de 25 pmoles de los iniciadores para este gen (tabla XIII, apéndice A), 250 µM de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1.0 mM de MgCl₂, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0

500 mM KCl), 1.0 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para completar el volumen final. Las condiciones del termociclador fueron las mismas utilizadas para el gen *invA* de *Salmonella* spp.

5.9.2. Reacciones de PCR para *E. coli* O157:H7

Primero se realizó una reacción de PCR-múltiple para amplificar simultáneamente dos fragmentos correspondientes a los genes *rfbE* y *fliC* (lipopolisacárido O157 y proteína flagelina, respectivamente). En los aislados que resultaron positivos para los genes anteriores, se realizaron reacciones de PCR por separado para amplificar un fragmento de cada uno de los siguientes genes: *stx1*, *stx2* y *eaeA* (respectivamente codifican para la verotoxina 1, verotoxina 2 e intimina). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando de 25 a 50 pmoles de cada uno de los iniciadores para los genes mencionados anteriormente (tabla IX, apéndice B), 200 μ M de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1-1.5 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 2.5 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de corrida para los genes *rfbE* y *fliC* fueron: un ciclo de 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento a 66 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 75 seg, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Para los genes *stx1* y *stx2* se modificó el paso de alineamiento a 58 °C por 30 seg. Para el gen *eaeA* se modificó el paso de alineamiento a 64 °C por 30 seg. Las demás temperaturas y tiempos fueron iguales.

5.9.3. Reacciones de PCR para *Listeria monocytogenes*

Se hicieron en base al gen *hlyA* que codifica para la listeriolisina O (LLO). Las reacciones se realizaron utilizando de 25 a 50 pmoles de los iniciadores descritos por Fitter *et al* (1992) (tabla X, apéndice C) 200 μ M de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (GIBCOBRL), 1-3 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 1.0 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones del termociclador fueron un ciclo de 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento a 58 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 30 seg, con una extensión final a 72 °C por 10 min.

5.10. Electroforesis

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5% a 100 Volts durante 1 h, utilizando 5 μ l de cada reacción de PCR. Para el gen *fliC* de *Salmonella* se utilizó un marcador de peso molecular Ladder de 250 pb (Invitrogen, USA) y para el resto de los genes se utilizó un marcador de peso molecular hyperladder 100 pb (Bioline) para determinar el tamaño de los productos de PCR. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados con transiluminador de luz UV (Spectroline Transilluminator, Model 7C-254R. Electronics Corporation, Westbury, New York, U.S.A.) y analizados mediante fotografía tomada con cámara polaroid y película A667 adaptada con filtro para luz ultravioleta.

5.11. Caracterización Molecular

Se evaluó la técnica de PCR-RFLP y electroforesis de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés).

5.11.1. Simulación de Restricción con DNA Strider

Previo a la realización de las digestiones del análisis de PCR-RFLP, se realizó una simulación del análisis de restricción con el software DNA Strider 1.2 (Marck, 1988), sobre secuencias del gen *fliC* de serotipos conocidos y bajadas del GenBank con la finalidad de conocer el tamaño y número de los fragmentos esperados después de la restricción y con los cuales se compararon los patrones obtenidos en los aislados utilizados del presente estudio.

5.11.2. Condiciones del Análisis de PCR-RFLP

Con la intención de encontrar diferencias de sitios de restricción entre los productos de PCR del gen *fliC* de los diferentes aislados de *Salmonella* spp, se realizó el análisis de PCR-RFLP. Los productos de PCR del gen *fliC* sin purificar se usaron directamente en el análisis de restricción con la endonucleasa *Sau3A* I (Promega). La enzima *Sau3A* I reconoce y corta la secuencia 5'...▼GATC... 3'. Cada reacción de digestión contenía lo siguiente: 7.3 µl de agua miliQ estéril, 2 µl de buffer 10X (60mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, 60 mM MgCl₂ y 10 mM DTT), 0.2 µl de BSA (10

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 U de la enzima *Sau3A I* y 10 μl de producto de PCR sin purificar. Los ingredientes de la reacción se mezclaron suavemente por pipeteo, se centrifugaron durante 5 segundos y se puso la reacción a incubar durante 1 h a 37 °C. Los productos de la digestión se observaron en geles de acrilamida al 10%, corridos a 100 Volts durante 2:30 h, utilizando 6 μl de cada reacción de digestión. Un marcador de peso molecular hyper ladder 100 pb (Bioline) se uso para determinar el tamaño de los fragmentos de restricción. Los geles fueron teñidos y visualizados como anteriormente se mencionó.

5.11.3. Condiciones para la Electroforesis de Campo Pulsado

El análisis de Electroforesis de Campo Pulsado se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por el CDC (2004b) la cual se describe a continuación.

5.11.3.1. Suspensión de Bacterias

Para la obtención del ADN cromosómico se partió de cultivos de *Salmonella* spp de crecimiento reciente en un medio de AST. Las colonias fueron tomadas con un cotonete de algodón embebido en buffer para suspensión celular (CBS por sus siglas en inglés) (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0) y transferidas suavemente a tubos Falcon (12 mm x 75 mm) los cuales contenían 2 ml de buffer CBS. La concentración final de células se ajustó a una densidad óptica (absorbancia) de 1.35 a una longitud de onda de 610 nm.

5.11.3.2. Formación de los Moldes de Agarosa

De cada suspensión ajustada y a temperatura ambiente, se tomaron 400 μ l y se depositaron en tubo Eppendorf de 1.5 ml. Enseguida se adicionaron 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) a cada tubo y se agitaron suavemente con micropipeta. Después se adicionaron 400 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (SeaKem Gold 1%: SDS 1%), se mezcló suavemente con micropipeta y se mantuvieron los tubos en agua a 55-60 °C. Inmediatamente se dispensó parte de esta mezcla en los moldes reutilizables de agarosa, dejándolos solidificar en el refrigerador a 4 °C durante cinco minutos.

5.11.3.3. Lisis Celular en los Moldes de Agarosa

Primero se marcaron tubos de 50 ml con tapón de rosca para igual número de muestras. Después se adicionaron 5 ml de una solución de proteinasa K (20 mg/ml)/buffer de lisis celular (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) (concentración final de proteinasa K/buffer de lisis de 0.1 mg/ml) en cada tubo marcado. En seguida se eliminó el exceso de agarosa de la parte superior de los bloques con bisturí. Se abrió el molde reutilizable y se transfirió el bloque de agarosa con una espátula adecuada de 6 mm de ancho al tubo respectivo teniendo cuidado de asegurarse que el bloque quedara dentro del buffer. Una vez hecho lo anterior los tubos se colocaron en una gradilla y se pusieron a incubar en baño de agitación (150-175 rpm) a 54 °C durante 1.5 a 2 h, teniendo el cuidado de asegurarse que el nivel del agua del baño de agitación estuviera por arriba del nivel del buffer de lisis.

5.11.3.4. Lavado de Bloques de Agarosa Después de la Lisis Celular

Una vez que terminó el paso anterior, los tubos fueron retirados del baño de agitación y el buffer de lisis se decantó. En seguida se adicionaron 15 ml de agua estéril ultrapura (tipo grado 1) previamente calentada a 50 °C a cada tubo y se volvieron a colocar en baño de agitación a 50 °C por 10 a 15 minutos, tiempo después del cual se decantó el agua y se volvió a repetir este paso una vez más. Se continuó con la adición de 15 ml de buffer TE estéril precalentado a 50 °C y se volvió a incubar los tubos en baño de agitación a 50 °C durante 10 a 15 minutos, se decantó el buffer TE y se volvió a repetir el lavado con TE tres veces más. Después se adicionó 10 ml de buffer TE estéril, quedando listos los bloques para pasar a la restricción enzimática.

5.11.3.5. Restricción Enzimática del ADN en los Bloques de Agarosa con *Xba*I

Primero se etiquetaron tubos Eppendorf de 1.5 ml para identificar a cada una de las muestras más tres tubos para *Salmonella* ser. Braenderup H9812 que se usó como control para la técnica. Después se cortaron rebanadas de 2.0 mm de ancho de cada bloque de agarosa, se colocaron en el tubo respectivo y se les adicionó 200 µl de buffer H 1X (Roche grado bioquímico) teniendo la precaución de que el buffer cubriera la rebanada. Para el caso del bloque del serotipo control se cortaron tres rebanadas. En seguida se pusieron a incubar los tubos en baño de agua a 37 °C por 5 a 10 minutos. Después de este tiempo se retiró el buffer H con micropipeta. En seguida a cada tubo se le adicionó 200 µl de una mezcla hecha con 5 µl de la enzima de restricción *Xba*I (10

U/ μ l) más 20 μ l de buffer H 1X más 175 μ l de agua estéril ultrapura (grado tipo 1) y se pusieron a incubar en baño de agua a 37 °C durante 1.5 a 2.0 horas.

5.11.3.6. Carga de las Muestras en el Gel de Agarosa

Una hora antes de que terminara la digestión se preparó el gel de agarosa al 1.0 % disolviendo 1.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TBE al 0.5 X, teniendo cuidado de que el gel quedara nivelado y que los dientes del peine quedaran 2 mm por arriba de la plataforma del gel. Después de haber dejado solidificar el gel por 30 minutos, se colocó en la cámara de electroforesis y se adicionaron 2.0 l de buffer TBE 0.5 X, fijando el bombeo del buffer a un flujo de 1.0 l/min durante 30 minutos. Hecho lo anterior se retiraron las muestras del baño de agua, se decantó la mezcla buffer/enzima, se adicionaron 200 μ l de buffer TBE 0.5 X y se dejaron incubando por cinco minutos a temperatura ambiente. Después de esto se cargaron las muestras en el gel.

5.11.3.7. Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en el sistema CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) y las condiciones fueron las siguientes: programa auto algoritmo, valor bajo y alto de migración de ADN respectivamente 30 kb y 600 kb, tiempo de corrida 19 h con una distribución lineal entre pulsos de 2.16 y 63.8 s, un ángulo de 120° a 6.0 V/cm y una temperatura de 14 °C.

5.11.3.8. Tinción del Gel

Una vez que terminaron los ciclos, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 20 a 30 minutos. Después se lavó el gel con agua destilada durante 60 a 90 minutos, cambiando el agua cada 20 minutos.

5.12. Análisis de Resultados

Las siguientes pruebas estadísticas fueron utilizadas: Chi cuadrada (X^2) (Christensen, 1989) para probar si las diferencias observadas en el número de canales positivas al patógeno de cerdo y de bovino eran estadísticamente significativas; La prueba de diferencia entre dos proporciones binomiales (Christensen, 1989) se realizó para determinar la existencia de diferencias significativas entre las proporciones de muestras positivas de los sistemas productivos de melón y chile. El grado de variabilidad entre dos aislados se determinó en base al coeficiente de Dice, en el que se define la similitud entre dos cepas como:

$$S = 2n_{ab} / n_a + n_b$$

Donde n_{ab} es el número de bandas en común en las cepas a y b , n_a y n_b respectivamente número total de bandas de la cepa a y b . Para ello se formó una matriz con 0 y 1, en donde 0 correspondió a ausencia de la banda y 1 fue presencia de ésta, generándose un dendrograma con el método UPGMA, analizados ambos con el paquete estadístico SPSS (10.0). Para PFGE la imagen del gel fue capturada con un fotodocumentador Gel Doc 1000 y analizada con el programa BioNumerics y el grado de variabilidad entre dos

aislados se determinó en base al coeficiente de Dice. El poder de discriminación de los métodos que se define como la probabilidad de que dos cepas escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas por el método de tipificación se determinó en base al índice de diversidad de Simpson:

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S X_j(X_j-1) \right]$$

Donde S es el número de tipos reconocidos por una técnica particular, X_j es número de aislados idénticos a la j -ésima cepa o serotipo, y N es el número total de cepas evaluadas.

6. RESULTADOS

6.1. Extracción del ADN con el Método CTAB

La extracción del ADN se hizo a partir de los medios de enriquecimiento específicos para cada especie de interés, TT para *Salmonella* spp, EC modificado para *E. coli* O157:H7 y UVM para *L. monocytogenes*. La técnica utilizada mostró ser eficiente, ya que se obtuvo ADN en cantidad y calidad adecuada (figura 1) para utilizarlo en las reacciones de PCR, PCR-múltiplex y PCR-RFLP.

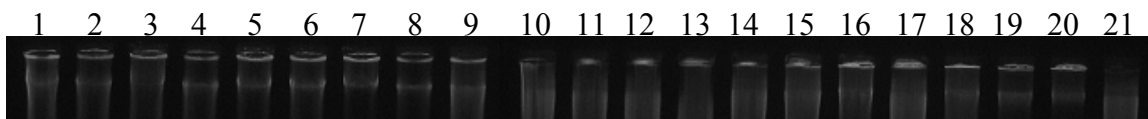


Figura 1. Extracción de ADN con el método CTAB. Todos los carriles corresponden a extracciones de ADN para *Salmonella* spp.

6.2. Simulaciones de PCR con Amplify 1.2

A partir de los iniciadores originales utilizados por los diferentes autores y de las secuencias de ADN para cada gen en estudio obtenidas del Genbank, se procedió a realizar una simulación de PCR con el programa Amplify 1.2 para ver si alineaban perfectamente bien y en caso contrario hacer las modificaciones necesarias. Hecho lo

anterior se obtuvieron los iniciadores adecuados que se utilizaron en el presente estudio (tablas XIII, IX, y X, apéndices A, B y C respectivamente). Las figuras 2 a 10 muestran los resultados de la simulación de PCR, así como las secuencias de los iniciadores.

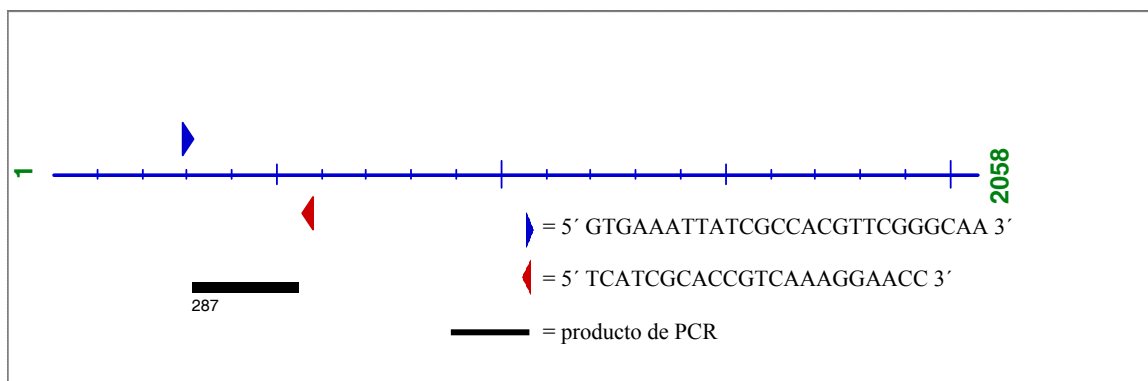


Figura 2. Simulación de PCR del gen *invA* de *S. Typhimirium* LT2 (Genbank accession NC_003197).

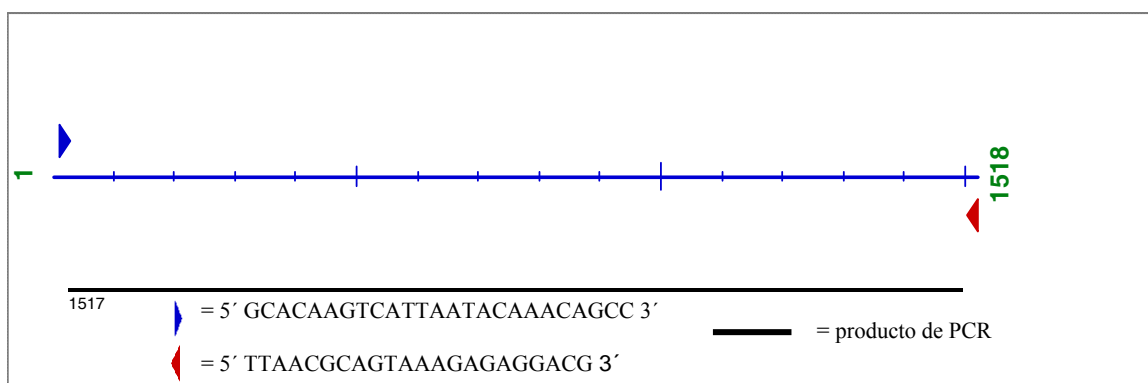


Figura 3. Simulación de PCR del gen *fliC* de *S. Enteritidis* (Genbank accession AY649709).

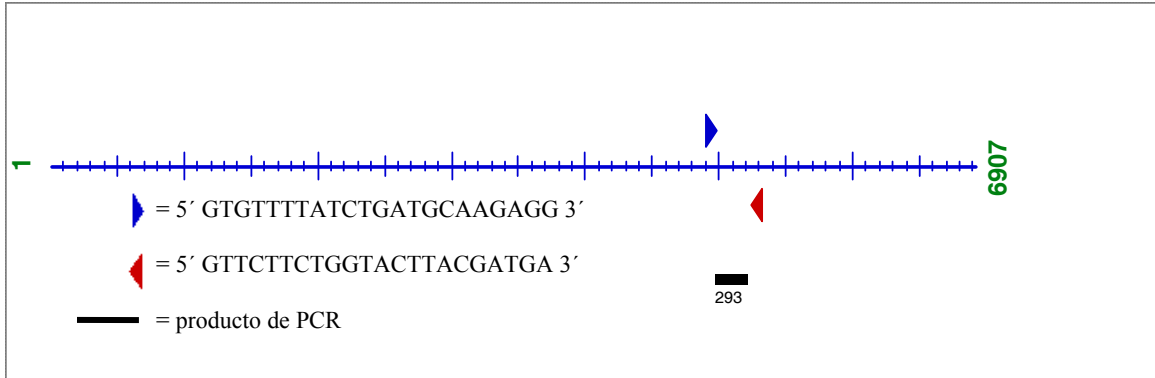


Figura 4. Simulación de PCR del gen *sdfI* de *S. Enteritidis* (Genbank accession AF370716).

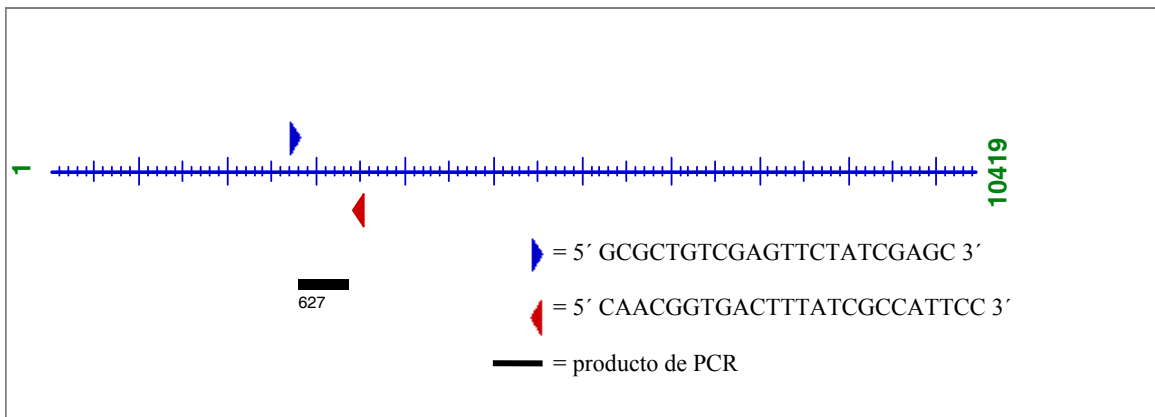


Figura 5. Simulación de PCR del gen *fliC* de *E. coli* O157:H7 (Genbank accession AE005174.2).

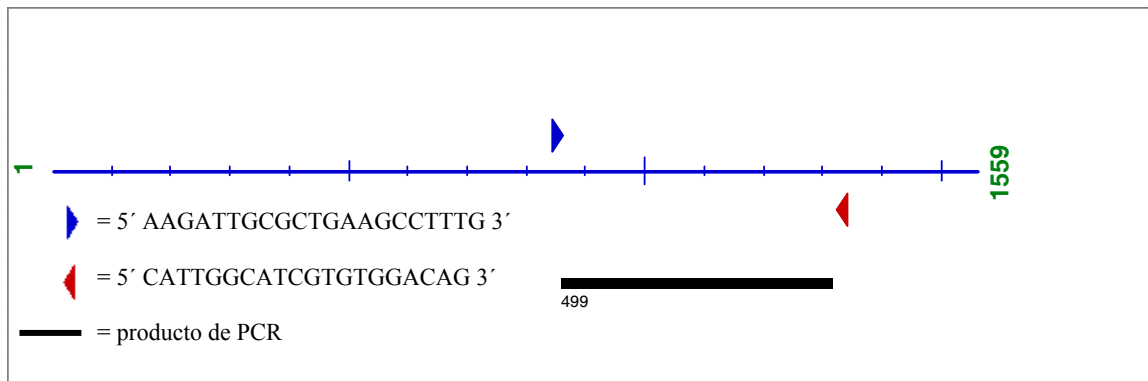


Figura 6. Simulación de PCR del gen *rfbE* de *E. coli* O157:H7 (Genbank accession S83460).

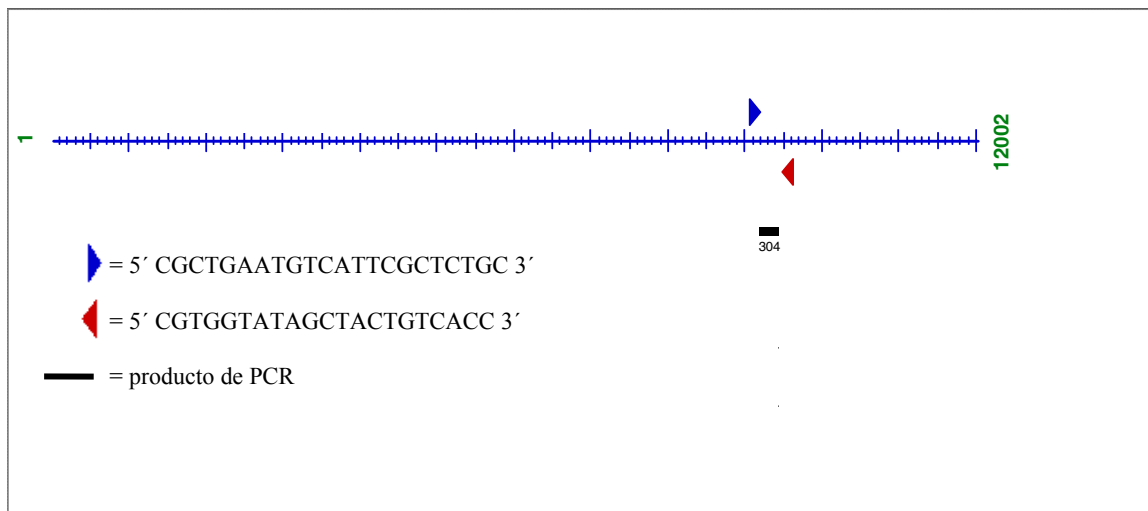


Figura 7. Simulación de PCR del gen *stx1* de *E. coli* O157:H7 (Genbank accession AE005174.2).

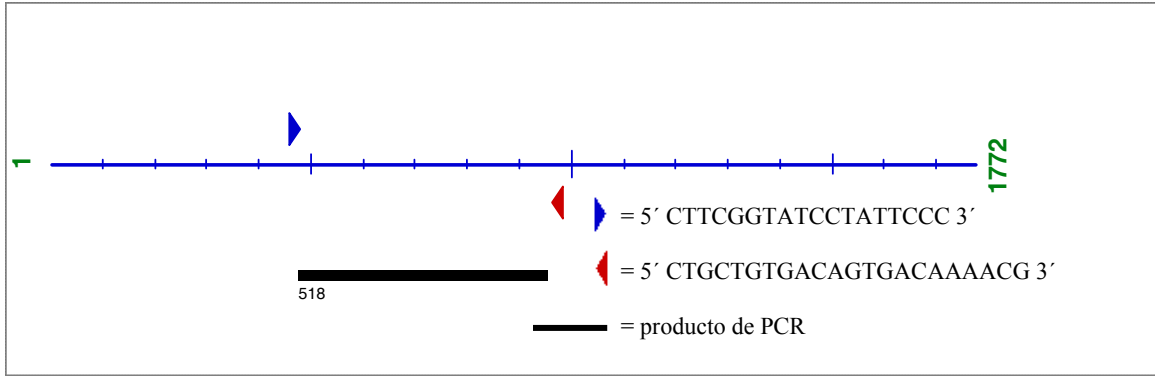


Figura 8. Simulación de PCR del gen *stx2* de *E. coli* O157:H7 (Genbank accession AY143337).

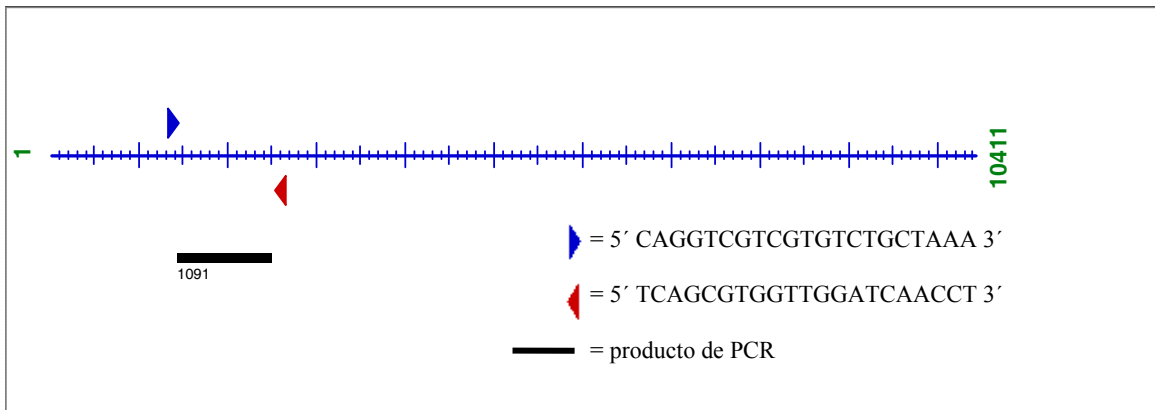


Figura 9. Simulación de PCR del gen *eaeA* de *E. coli* (Genbank accession AE005174.2).

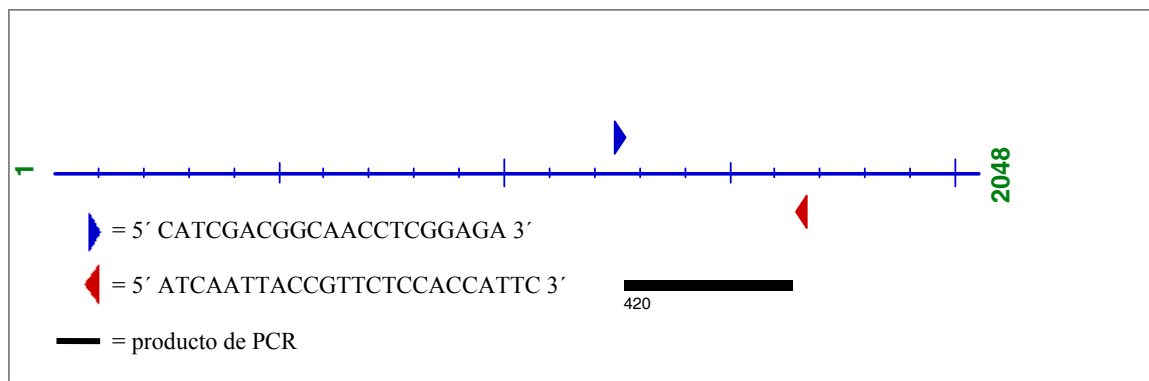


Figura 10. Simulación de PCR del gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes* (Genbank accession M24199).

6.3 Estandarización de la PCR

A partir del ADN extraído de cada cepa de referencia se corrieron reacciones de PCR simples y múltiplex empleando gradientes de temperatura para el alineamiento de iniciadores (T_m) y de $MgCl_2$ para determinar las mejores condiciones de amplificación de el (los) producto(s) de PCR de interés. Como resultado, las mejores condiciones para la PCR tanto de los ingredientes del cóctel de PCR como del termociclador, son las que se mencionan a continuación en la identificación y caracterización de cada patógeno y gen.

6.4. Identificación y Caracterización Molecular de *Salmoella* spp

Salmonella spp., se identificó y caracterizó en base a los genes *invA*, *fliC* y *sdfl*. Para el caso de los genes *invA* y *fliC* se estandarizaron condiciones de PCR por separado para cada uno de ellos. Las reacciones de PCR en base al gen *invA* se realizaron en volúmenes

de 25 μ l, utilizando 25 pmoles de los iniciadores (tabla XIII, apéndice A), 200 μ M de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1.0 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 1.0 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para completar el volumen final. Las condiciones del termociclador fueron: un ciclo de 1 min a 95 $^{\circ}C$, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 $^{\circ}C$ por 30 seg, alineamiento a 58 $^{\circ}C$ por 30 seg y una extensión a 72 $^{\circ}C$ por 30 seg, con una extensión final a 72 $^{\circ}C$ por 10 min. La figura 11 muestra los productos de PCR a partir del gene *invA* en las cepas de referencia de *Salmonella*. El producto de PCR esperado fue de 287 pares de bases (pb).

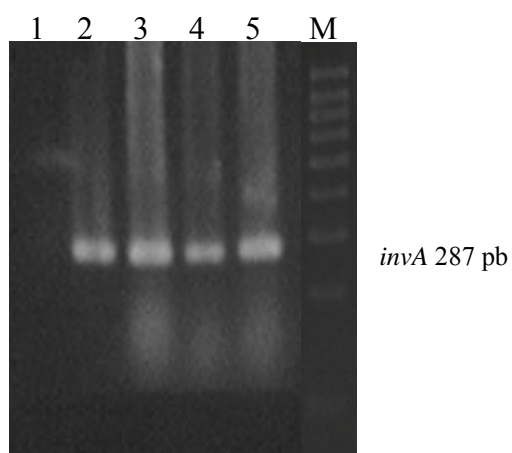


Figura 11. Productos de PCR para el gen *invA* de *Salmonella* spp después de estandarizada la técnica. Carril 1: control negativo; carril 2: control positivo *S. Typhimurium* (ATCC 13311); carril 3: control positivo *S. Enteritidis* (ATCC 13076); carril 4: control positivo *S. Paratyphi A* (ATCC 9150); carril 5: aislado de *Salmonella* spp; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Para el gen *fliC* el cocktail de PCR contenía 25 pmoles de cada uno de los iniciadores (tabla XIII, apéndice A), 250 μ M de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1.0 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl), 2.5 U de *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de corrida del PCR fueron: desnaturalización a 95 °C por 1 min seguido 35 ciclos adicionales con desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineado de iniciadores a 60 °C por 30 seg, y extensión a 72 °C por 30 seg. Después del último ciclo las muestras se mantuvieron a 72 °C por 10 min para completar la síntesis del ADN. La figura 12 muestra los productos de PCR de aproximadamente 1500 pb a partir del gene *fliC* en las cepa de referencia de *S. Typhimurium* (ATCC 13311).

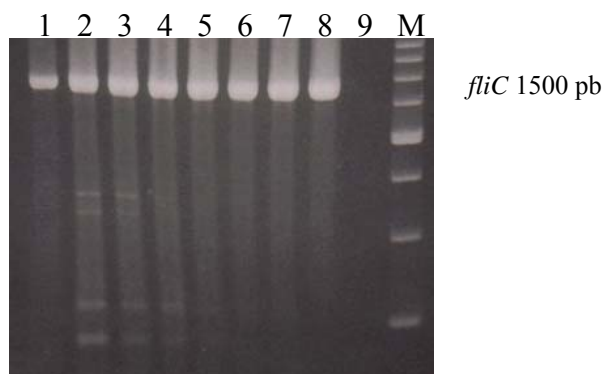


Figura 12. Productos de PCR para el gen *fliC* de *S. Typhimurium* (ATCC 13311) probando varias temperaturas de alineamiento (T_m) en °C. Carril 1: 48 °C; carril 2: 50 °C; carril 3: 52 °C; carril 4: 54 °C; carril 5: 56 °C; carril 6: 58 °C; carril 7: 60 °C; carril 8: 62 °C; carril 9: control negativo (54 °C); M: marcador de peso molecular (250 pb).

En el caso del gen *sdfl* (región diferencial I) de *S. Enteritidis* se estandarizó una reacción de PCR en la cual se amplificó exitosamente el gen. Las reacciones de PCR en

base a este gen se realizaron en volúmenes de 25 μ l, utilizando 25 pmoles de los iniciadores para este gen (tabla XIII, apéndice A), 250 μ M de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1.0 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 1.0 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para completar el volumen final. Las condiciones del termociclador fueron las mismas utilizadas para el gen *invA* de *Salmonella* spp. La figura 13 muestra el producto de PCR para este gen el cual fue de 293 pb.

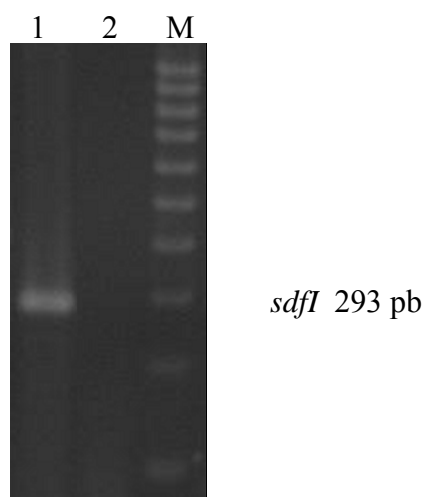


Figura 13. PCR del gen *sdfI* de *S. Enteritidis*, después de estandarizada la técnica. Carril 1: control positivo *S. Enteritidis* (ATCC 13076); carril 2: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

6.4.1. Detección de *Salmonella* spp Mediante PCR del gen *invA* en Muestras de Campo

Un total de 329 muestras de diversas fuentes, melón (255 muestras), chile (43 muestras) y productos cárnicos (31) fueron analizadas por PCR para determinar la presencia de *Salmonella* spp (tablas I y II). De acuerdo a la tabla I, de 298 muestras obtenidas de los sistemas productivos de melón y chile, en 71 de éstas (23.8%) se amplificó el producto de PCR a partir del gen *invA* con lo que se confirmó que eran positivas para la presencia de *Salmonella* spp. De éstas, el 19.12% (57/298) eran muestras del sistema productivo de melón y el 4.69% (14/298) del sistema productivo de chile. Del total de muestras de cada sistema productivo, el 22.35% (57/255) en melón y el 32.55% (14/43) en chile, fueron positivas para *Salmonella* spp., y la diferencia entre ambas proporciones no fue significativa ($P > 0.05$). Según el tipo y el número de muestras analizadas, se encontraron los siguientes resultados de muestras positivas a *Salmonella* spp: 17.7% (24/135) de las muestras a partir de lavados de frutos en el campo y de éstas el 12.6% (17/135) correspondió a las muestras de lavados de frutos de melón, mientras que el 5.1% (7/135) a muestras de lavados de frutos de chile. De los lavados de frutos en empaque el 12.5 % (1/8) fueron positivas y eran frutos de chile. 38.7 % (12/31) de las muestras a partir de agua del canal de riego, siendo seis de las muestras a partir del sistema productivo de melón y seis a partir del de chile. Un 42.1 % (8/19) de las muestras de agua tomadas de la huerta resultaron positivas y fueron tomadas de dos huertas de melón de la Comarca Lagunera y en las cuales no se aplicaron Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). 27.0 % (10/37) de las muestras tomadas de las manos de los cosechadores fueron positivas, siendo el 24.3 % (9/37) de cosechadores del sistema

TABLA I

Resultados del análisis de PCR para *Salmonella* spp., en muestras de melón y chile tipo Bell.

†	††	†††	a	b	c	d	e	f	g	h	i	J	Total
Nayarit 1	M	22	4/5	-	-	1/2	-	5/5	5/5	5/5	-	-	20/22
Nayarit 2	M	5	5/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5
Nayarit 3	M	15	3/5	-	-	-	-	4/4	5/5	1/1	-	-	13/15
Nayarit 4 BPA	M	21	0/5	-	-	0/1	-	0/5	0/5	0/5	-	-	0/21
Mat. Coah.	M	19	1/4	-	-	2/2	5/13	-	-	-	-	-	8/19
Mat. Coah. BPA	M	21	0/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/21
Mat. Coah. BPA	M	19	1/17	-	-	0/2	-	-	-	-	-	-	1/19
Mat. Coah. BPA	M	19	0/16	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-	0/19
Paila Coah. BPA	M	8	0/6	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-	0/8
Mat. Coah. Suelo BPA	M	8	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8	-	0/8
Merc. Aba. Mty	M	13	-	-	0/13	-	-	-	-	-	-	-	0/13
Merc. Aba. Mty	M	16	-	-	0/10	-	-	-	-	-	-	0/6	0/16
Sinaloa	Ch	43	7/21	1/8	-	6/11	0/3	-	-	-	-	-	14/43
Nayarit 5 BPA	M	22	0/5	-	-	0/2	-	0/15	-	-	-	-	0/22
Nayarit 6 BPA	M	14	0/10	-	-	1/4	-	-	-	-	-	-	1/14
Mat. Coah, riego con agua de río	M	33	3/15	-	-	2/4	3/3	1/6	0/3	0/1	0/1	-	9/33
TOTAL		298	24/135	1/8	0/23	12/31	8/19	10/37	10/18	6/12	0/9	0/6	71/298

†= lugar de muestreo, ††= fuente, †††= No. de muestras analizadas, M= melón, Ch= chile, a=Fruto en huerta, b= fruto en empaque, c= fruto en bodega, d= agua del canal, e= agua dentro de la huerta, f= cosechador, g= carretilla, h= caja de camioneta, i= suelo, j= trabajador en bodega

productivo de melón en el estado de Nayarit y el 2.7 % (1/37) de cosechadores de melón en la Comarca Lagunera, en ambos casos no se aplicaron BPA en la huerta. Un 55.5% (10/18) de las muestras a partir de las carretillas de traslado de frutos fueron positivas y provenían del sistema productivo de melón del estado de Nayarit. El 50 % (6/12) de las muestras tomadas de la caja de la camioneta para el transporte resultaron positivas y

provenían del sistema productivo de melón del estado de Nayarit. Solamente el 1.5% (2/132) de las muestras provenientes de huertas en las cuales se aplicaron BPA fueron positivas a *Salmonella* spp. No se encontraron muestras positivas en las muestras a partir de lavados de frutos en bodegas del mercado de abastos, manos de los trabajadores de esas bodegas y muestras de suelo de las huertas localizadas en la Comarca Lagunera y con aplicación de BPA.

En relación con las muestras a partir de productos cárnicos, *Salmonella* spp se encontró en el 37.28 % (22/59) de las muestras analizadas, siendo éstas 17 de canales de res y 5 de otras fuentes cárnicas (tabla II).

TABLA II

Relación de muestras de carnes, canales y otras fuentes animales y resultados del análisis de PCR para *Salmonella* spp.

Origen	No. de muestras	Fuente	Positivas por PCR a <i>Salmonella</i> spp
Com. Lagunera	45	Canales de res	17/45
LCRM	14	Muestras varias de carne	5/14
	59	Total	22/59

De las muestras anteriores que resultaron positivas por PCR para *Salmonella* spp, se logró recuperar 12 y 13 aislados de los sistemas de melón y chile respectivamente, 17 de las muestras obtenidas de canales de res, mientras que en las muestras remitidas al LCRM se obtuvieron cinco aislados de 14 muestras. Estos 47 aislados más 51 que se

mencionan en la tabla XI (apéndice D) se utilizaron para los análisis por PCR-RFLP y PFGE.

6.4.2. Caracterización Mediante PCR-RFLP

Para este estudio se utilizaron 81 aislados (tabla XII, apéndice E) y se amplificó en cada uno de ellos un producto de PCR con los iniciadores ABMS1 y ABMS2. El producto de PCR en las cepas de referencia (figura 14 A) y en los aislados de serotipo conocido (figura 14 B) fue del tamaño esperado de acuerdo con el producto de PCR simulado con el software Amplify 1.2. Los tamaños fueron de 1487 pb en *S. Paratyphi A* y *S. Typhimurium*, de 1517 pb en *S. Enteritidis* y de 1520 pb en *S. Typhi* y *S. Stanley*. La figura 14 B muestra productos de PCR de diferente tamaño entre serotipos diferentes de

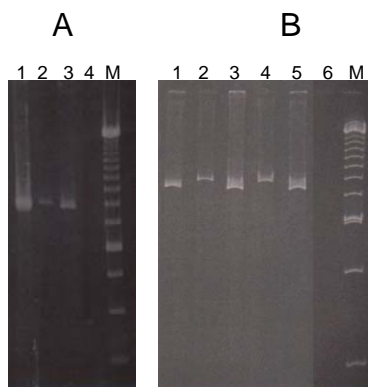


Figura 14. Productos de PCR amplificados con los iniciadores ABMS1 y ABMS2 en aislados de serotipo conocido. (A) Carril 1: *S. Paratyphi A* (ATCC 9150); carril 2: *S. Enteritidis* (ATCC 13076); carril 3: *S. Typhimurium* (ATCC 13311); carril 4: control negativo. (B) Carril 1: *S. Kentucky*; carril 2: *S. Typhi*; carril 3: *S. Worthington*; carril 4: *S. Stanley*; carril 5: *S. Typhimurium*; carril 6: control negativo; M: marcador de peso molecular (250 pb).

Salmonella como evidencia de la variabilidad genética del gen *fliC*. El tamaño promedio del producto de PCR fue de aproximadamente 1.5 kb. El análisis de PCR-RFLP con *Sau3A* I en los aislados de serotipo conocido generó siete distintos patrones de restricción del gen *fliC* (figura 15). El hecho de haber encontrado siete patrones de restricción, uno por serotipo conocido, es otra evidencia de la variabilidad genética del gen *fliC* y por lo tanto sugiere que es un buen gen blanco para la identificación a nivel de serotipo, sino de todos, de muchos aislados de *Salmonella* usando PCR-RFLP.

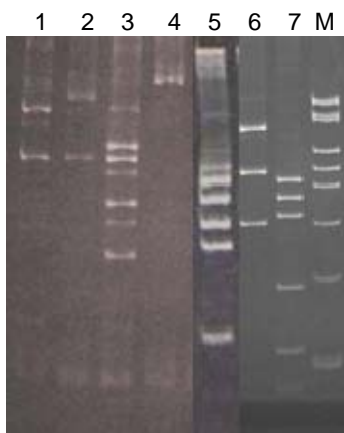


Figura 15. Perfiles de restricción del gen *fliC* de *Salmonella* obtenidos con la endonucleasa *Sau3A* I en aislados de serotipo conocido. Carril 1: *S. Kentucky*; carril 2: *S. Typhi*; carril 3: *S. Worthington*; carril 4: *S. Stanley*; carril 5: *S. Paratyphi A* (ATCC 9150); carril 6: *S. Typhimurium* (ATCC 13311); carril 7: *S. Enteritidis* (ATCC 13076); M: marcador de peso molecular (100 pb).

El producto de PCR a partir del gen *fliC* de los 81 aislados fue sometido a digestión con la endonucleasa *Sau3A* I generándose los respectivos patrones de restricción, algunos de ellos observados en la figura 16, y posteriormente el dendrograma de la figura 17. El coeficiente de similitud varió de 100 a 75 y el índice de diversidad (D) fue de 0.68.

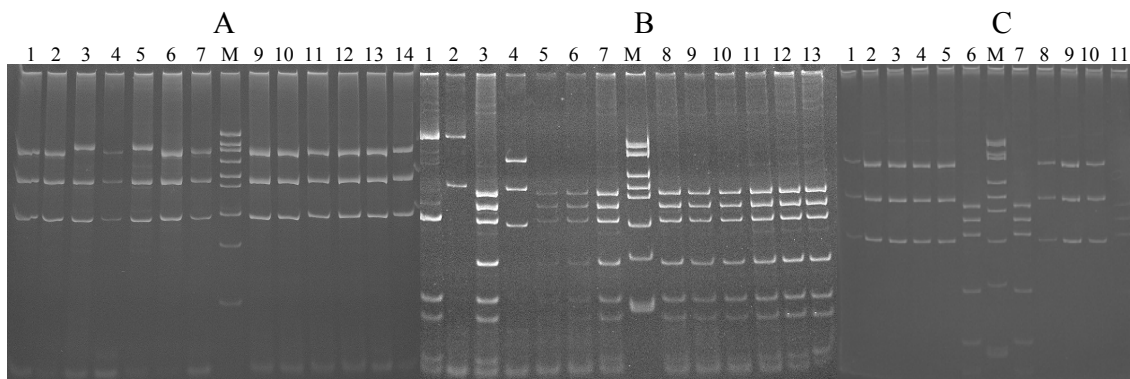


Figura 16. Perfiles de restricción del gen *fliC* de *Salmonella* obtenidos con la endonucleasa *Sau3A* I en muestras de campo. (A). Carril 1-2: aislados de *Salmonella* a partir de melón; Carril 3-7 y 9-13: aislados de *Salmonella* a partir de canales de res; Carril 14: *S. Typhimurium* (ATCC 13311). (B). Carril 1, 3-7 y 8-12: aislados de *Salmonella* a partir de ave; carril 2: aislado de *Salmonella* a partir de carne de cerdo; carril 13: *S. Enteritidis* (ATCC 13076). (C). Carriles 1-6 y 7-10: aislados de *Salmonella* obtenidos de chile var Bell; carril 11: *S. Enteritidis* (ATCC 13076); M: marcador 100 pb.

Los perfiles de restricción se agruparon básicamente en cuatro grupos, siendo uno de ellos (I) donde quedó *S. Typhimurium*, el cual agrupó a 38 aislados. De éstos, 12 (31.57%) fueron obtenidos de una huerta de melón en la cual no se aplicaron BPA localizada en Matamoros Coahuila, México. Ocho de los aislados (21.05%) provenían de la huerta de chile Bell (sin BPA) localizada en Sinaloa, México. 13 (34.21%) se obtuvieron de productos cárnicos derivados de canales de bovino de diferente procedencia. También hubo una que se obtuvo de ave (2.63%), otra de humano (2.63%) y tres (7.89%) eran aislados confirmados de *S. Typhimurium*. El otro grupo es donde quedó *S. Enteritidis* (III), dentro del cual quedaron 25 aislados, siendo 17 (68%) obtenidos a partir de aves (pollo o gallina), 5 (20%) obtenidos de humanos, 2 (8%) de la huerta de chile Bell y uno (4%) que era un aislado confirmado de *S. Enteritidis*.

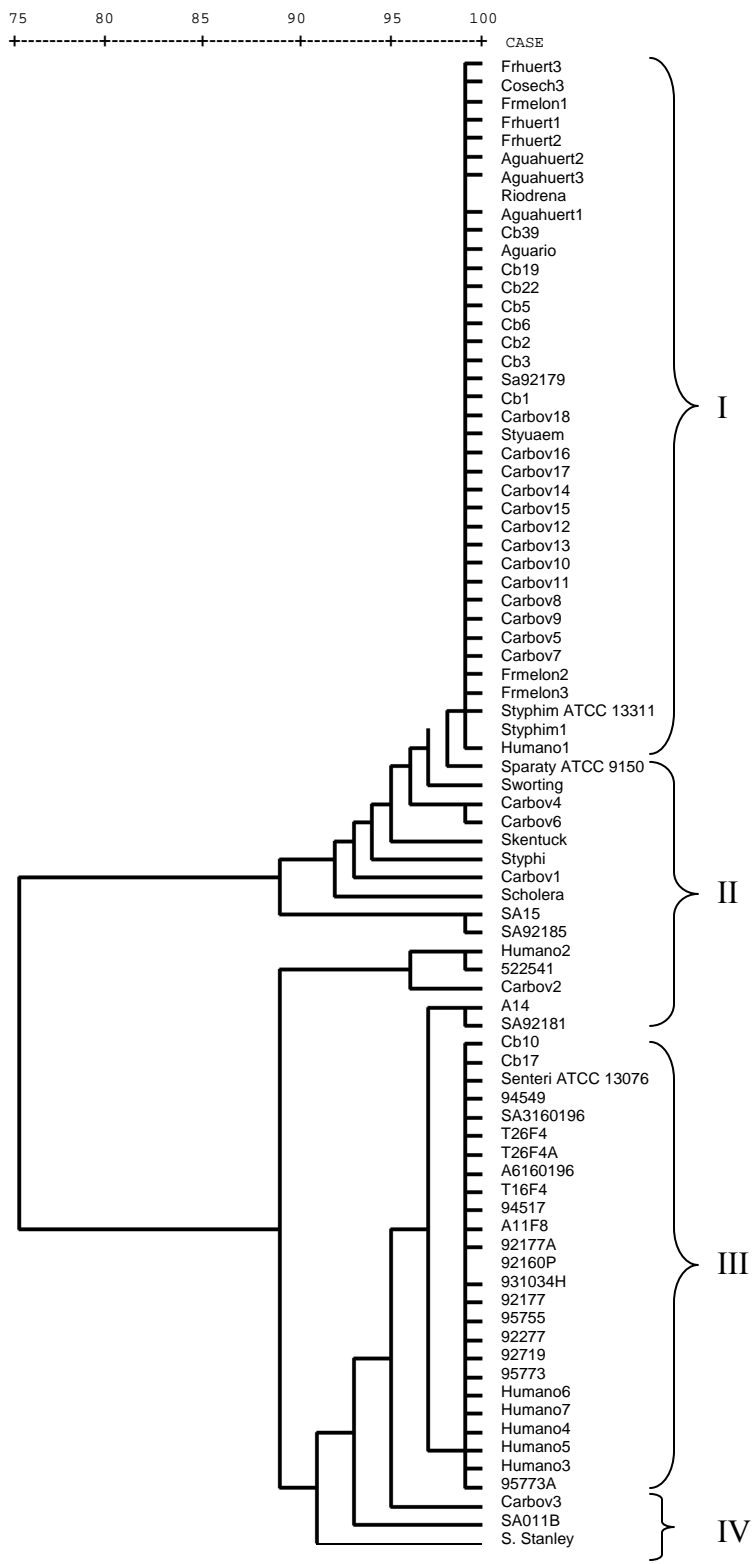


Figura 17. Dendrograma PCR-RFLP.

Debido a que la enzima *Sau3A I* no tiene la capacidad para diferenciar entre el serotipo de *S. Enteritidis* y los de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* ya que presentan un patrón de restricción similar, para saber si los aislados provenientes de aves eran del serotipo *S. Enteritidis*, éstos fueron analizados por PCR para descartar esta situación, siendo el resultado de PCR negativo con lo que se confirmó que no eran del serotipo de *S. Enteritidis*.

El resto de los aislados quedaron en otros dos grupos (II y IV) con mayores distancias génicas entre ellos y en el cual quedaron incluidos los serotipos *S. Paratyphi A*, *S. Worthington*, *S. Kentucky*, *S. Typhi*, *S. Choleraesuis* y *S. Stanley*.

6.4.3. Caracterización Mediante PFGE

Un total de 54 aislados (tabla XIII, apéndice F) se sometieron al análisis de PFGE obtenidos de las siguientes fuentes: 29 de aves (pollo y/o gallina), 14 del sistema productivo de chile tipo Bell, cuatro a partir de carne y/o carcasas de bovino, cinco de origen desconocido donados por IBT-Cuernavaca, uno a partir de cerdo y uno a partir de pasta de pollo. Los aislados se obtuvieron de diferentes sitios geográficos en México y en diferentes tiempos. Los aislados a partir de aves procedían de Cerro brujo Villa flores Chiapas (CBVFC), AVIMEX casos clínicos en México (Avimex), Tehuacan Puebla (TP), Sanidad Animal (SA) y UAEM. Los aislados de chile procedían de una misma huerta en el estado de Sinaloa (Sin), los de bovino de la Comarca Lagunera (CL), el de origen porcino de la ciudad de México (Mex.) y el resto desconocido (Desc.)

El análisis de restricción con la enzima *Xba*I generó nueve patrones de restricción diferentes, con un rango de fragmentos de ADN entre 6 y 17, siendo 11 el número de bandas más frecuente presente en 15 aislados. Se observaron 28 principales pulsotipos. En los aislados a partir de aves se observaron 16 pulsotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 19, 21, 22, 23) siendo el pulsotipo 4 el más frecuente (11/29) representando el 38%. Los aislados obtenidos de CBVFC se agruparon en siete pulsotipos (1, 2, 3, 4, 11, 16, 21), mientras que los de SA se agruparon en seis pulsotipos (4, 5, 13, 14, 22, 23), los de Avimex en tres (4, 8, 12), los de TP en dos (4, 6) y el de la UAEM en uno (19). El pulsotipo 4 fue común entre los aislados de CBVFC, SA, Avimex y TP. El aislado a partir de porcino se agrupó en un solo pulsotipo (24), al igual que el de carne seca (9) y pasta de pollo (15).

En el sistema productivo de Chile los aislados se agruparon en cuatro pulsotipos (6, 7, 17, 20), proviniendo los pulsotipos 6, 17 y 20 de frutos en campo, 7 y 17 de muestras de agua de canal, y el pulsotipo 20 de frutos en empaque. El pulsotipo 17 fue común en los aislados provenientes de frutos y de campo, mientras que el 20 lo fue a los aislados obtenidos de frutos en campo y empaque. El pulsotipo 6 agrupó tres aislados y el 7 agrupó a uno, los cuales no obstante ser del serotipo *S. Enteritidis*, mostraron diferencias en el patrón de bandas. Por otro lado los pulsotipos 17 y 20 y que pertenecen al serotipo *S. Typhimurium*, agruparon respectivamente a seis y tres aislados. Lo anterior demuestra la presencia de varias cepas estrechamente relacionadas dentro de un mismo serotipo en el sistema productivo de Chile. Los aislados de bovino obtenidos en la Comarca Lag., se

agruparon en tres pulsotipos (10, 18, 26) y el resto de origen desconocido se agrupó en tres pulsotipos (25, 27, 28).

El coeficiente de similitud varió de 1.0 a 0.35 y el índice de diversidad (D) fue de 0.94. En la figura 18 se puede ver que a una distancia de 0.35 se separan los aislamientos en tres grupos claramente distinguibles. En el grupo I se encuentran los aislamientos que pertenecen al serotipo *S. Enteritidis* y/o *S. Gallinarum* o *S. Pullorum*. En el grupo II los aislados del serotipo *S. Typhimurium* y en el grupo III los aislados que pertenecen a los serotipos *S. Choleraesuis*, *S. Typhi* y otros que no fueron serotipificados.

Los aislados cb1, cb2, cb3, cb5 y cb6 provenientes de muestras tomadas del agua del canal y el aislado cb25 obtenido de lavado de fruto en campo, fueron agrupados dentro del pulsotipo 17 y asociadas al serotipo *S. Typhimurium*. El aislado cb10 proveniente del agua del canal agrupado como el pulsotipo 7 y los aislados cb17, cb 26 y cb 32 provenientes de lavados de frutos en campo agrupados como el pulsotipo 6 fueron asociados al serotipo *S. Enteritidis*. Los aislados cb19, cb22 a partir de lavados de frutos en campo y el aislado cb39 a partir de lavado de fruto en el empaque fueron agrupados en el pulsotipo 20 y asociados a *S. Typhimurium*. Lo anterior muestra que ambos serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* están presentes en un mismo tipo de muestras, así como un mismo serotipo puede estar presente en diferentes tipos de muestras y tener diferentes pulsotipos.

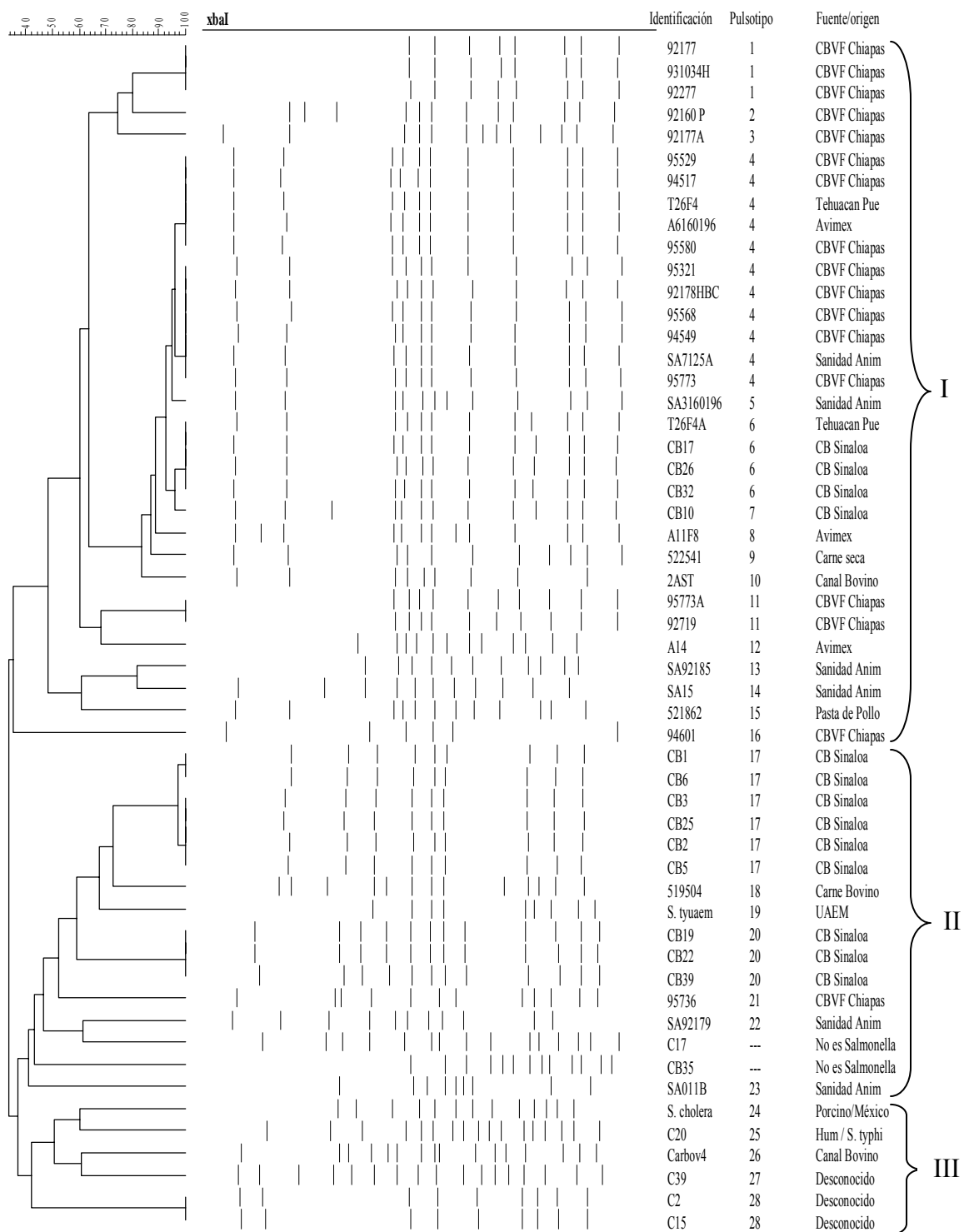


Figura 18. Dendrograma PFGE.

6.5. Identificación y Caracterización Molecular de *E. coli* O157:H7

Para saber si los aislados de *E. coli* spp recuperados pertenecían al serotipo O157:H7 se identificaron y caracterizaron en base a los genes *rfbE* y *fliC*, y posteriormente se caracterizaron en base a los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA* para determinar si eran enterohemorrágicos. Para los genes *rfbE* y *fliC* se estandarizó una reacción de PCR-múltiple y para los otros tres genes fueron reacciones individuales. El cóctel de la reacción de PCR en cada caso incluyó lo siguiente: 25 pmoles de cada uno de los iniciadores para los genes mencionados anteriormente (tabla IX, apéndice B), 250 μ M de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (GIBCO-BRL), 1.0 mM de $MgCl_2$, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 2.5 U de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 μ l. En el caso de los genes *rfbE* y *fliC* las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo de 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 66 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 75 seg, con una extensión final de 10 min a 72 °C. La figura 19 muestra los productos de PCR de ambos genes después del gradiente de T_m . El tamaño de los productos de PCR fue de 497 pb para el gen *rfbE* y de 625 para el gen *fliC*. Un total de 18 aislados sospechosos de ser *E. coli* O157:H7 fueron obtenidos de canales de cerdo y bovino en dos plantas procesadoras de productos cárnicos en la Comarca Lagunera, una por cada tipo de canal. De éstas, el 66.66% (12/18) dieron positivas para los genes que codifican para el antígeno O157 y H7 (figura 20) siendo seis de cada tipo de canal.

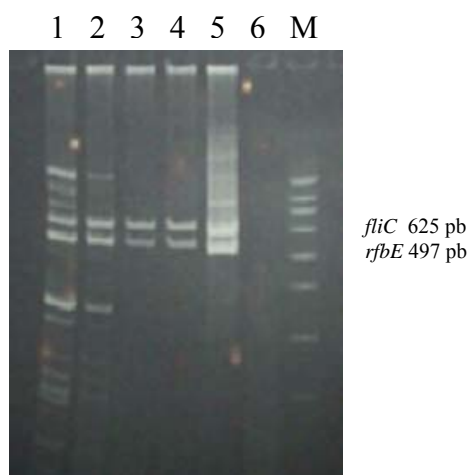


Figura 19. Productos de PCR de los genes *rfbE* y *fliC* de *E. coli* O157:H7 probando diferentes Tm. Carriles 1-4: aislado de *E. coli* O157:H7 bajo diferentes Tm (62, 64, 66 y 68 °C, respectivamente); carril 5: cepa de referencia *E. coli* O157:H7 (CENAPA); carril 6: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Posteriormente en los aislados que dieron positivos para los genes *fliC* y *rfbE*, se les realizó la prueba de PCR para determinar si eran portadores de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA* y su posterior clasificación como enterohemorrágicas.

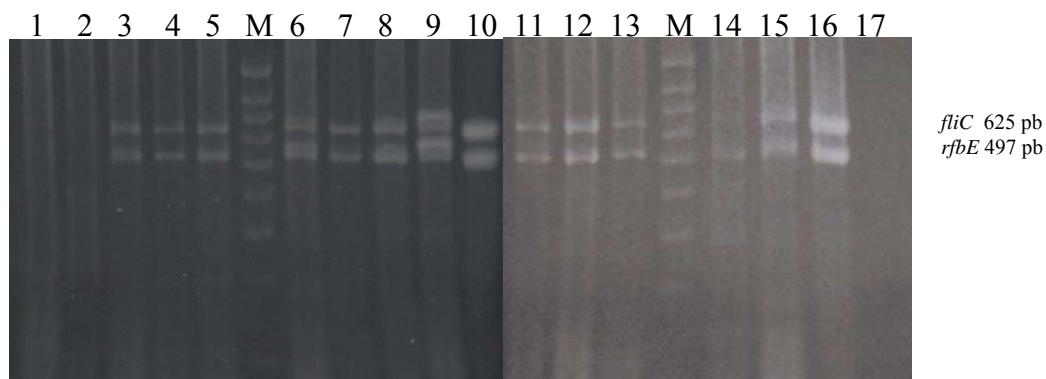


Figura 20. Productos de PCR de los genes *rfbE* y *fliC* en aislados obtenidos de canales de cerdo y bovino. Carriles del 1-5 y 6-8: aislados de canales de cerdo; carriles 9, 11-13, 14 y 15: canales de bovino; carriles 10 y 16: control positivo *E. coli* O157:H7 (CENAPA); carril 17: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Para lo anterior y en relación a los genes *stx1* y *stx2* en las condiciones del termociclador se modificó el paso de alineamiento a 58 °C por 30 segundos y para el gen *eaeA* se modificó el paso de alineamiento a 64 °C por 30 seg. Las demás temperaturas y tiempos fueron igual que para los genes *rfbE* y *fliC*. La figura 21 muestra los productos de PCR del gen *stx1* de un tamaño de 302 pb en los aislados que salieron positivos a los genes *rfbE* y *fliC*. De los 12 aislados que fueron positivos por PCR para los genes *rfbE* y *fliC*, el 58.33% (7/12) fue portador del gen que codifica para la verotoxina 1 (*stx1*), de los cuales cuatro fueron obtenidos de canales de bovino y tres de canales de cerdo.

A los aislados clasificados como portadores de los genes *rfbE*, *fliC* y *stx1*, se les realizó la prueba de PCR para determinar si eran portadores del gen que codifica para la verotoxina 2 (*stx2*), resultando el 57.14% (4/7) de éstos positivos, correspondiendo tres a

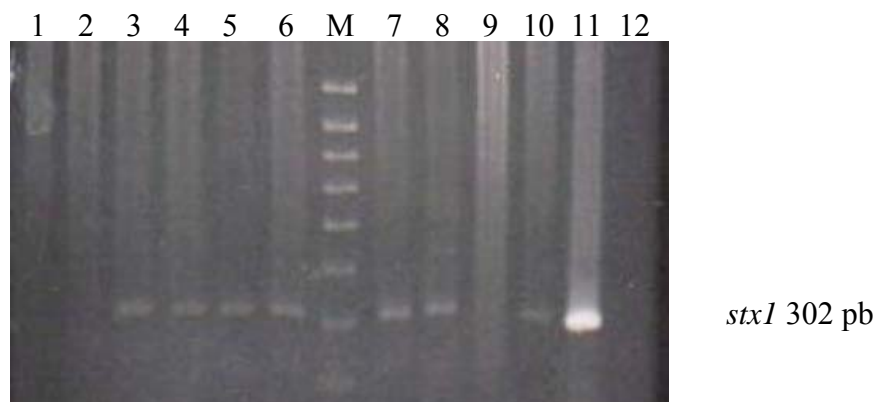


Figura 21. Productos de PCR del gen *stx1* en los aislados que dieron positivos para los genes *rfbE* y *fliC*. Carriles 1 y 2 y 7-10: aislados de canales de cerdo; carriles 3-6: aislados de canales de bovino; carril 11: control positivo *E. coli* O157:H7 (CENAPA); carril 12: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

aislados obtenidos de canales de cerdo y uno de canal de bovino. Los productos de PCR amplificados tuvieron un tamaño de 518 pb y son mostrados en la figura 22.

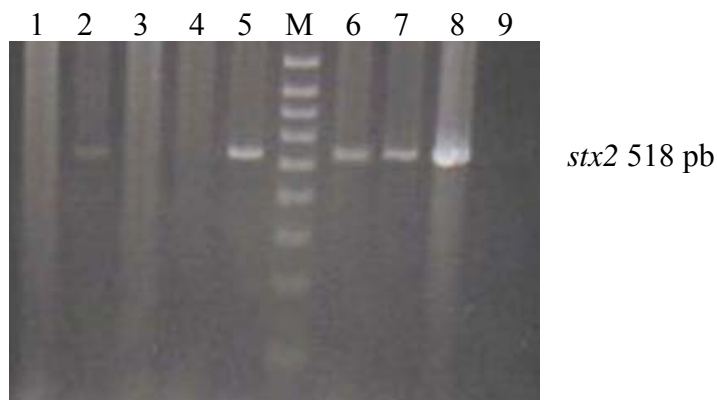


Figura 22. Productos de PCR del gen *stx2* en los aislados que dieron positivo para los genes *rfbE*, *fliC* y *stx1*. Carriles 1-4: aislados de canales de bovino; carriles 5, 6 y 7: aislados de canales de cerdo; carril 8: control positivo *E. coli* O157:H7 (CENAPA); carril 9: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Finalmente para determinar si los aislados anteriores eran portadores del gen *eaeA* que codifica para la proteína intimina se realizó la PCR, resultando que los cuatro aislados positivos para el gen *stx2* también lo fueron para el gen *eaeA*, correspondiendo esto a un 57.14% (4/7). El tamaño del producto de PCR fue de 1087 pb y la figura 23 muestra los productos de este gen en los cuatro aislados.

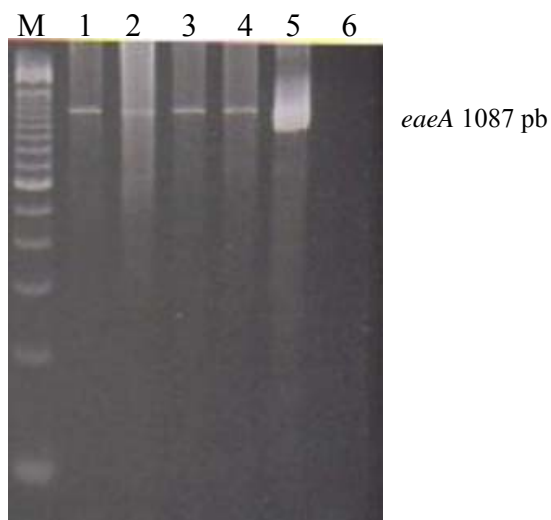


Figura 23. Productos de PCR del gen *eaeA* en los aislados que dieron positivo para los genes *rfbE*, *fliC*, *stx1* y *stx2*. Carril 1: aislado de canal de bovino; carriles 2-4: aislados de canales de cerdo; carril 5: control positivo *E. coli* O157:H7 (CENAPA); carril 6: control negativo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

Mediante PCR-RFLP del gen *stx2* se trató de encontrar alguna diferencia entre los aislados que fueron positivos para los cinco genes (*rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2* y *eaeA*). Para ello el producto de PCR del gen *stx2* se digirió con la enzima *Hae* III, generándose el patrón de restricción observado en la figura 24. El patrón de restricción obtenido consistió de una sola banda de aproximadamente 250 pb.

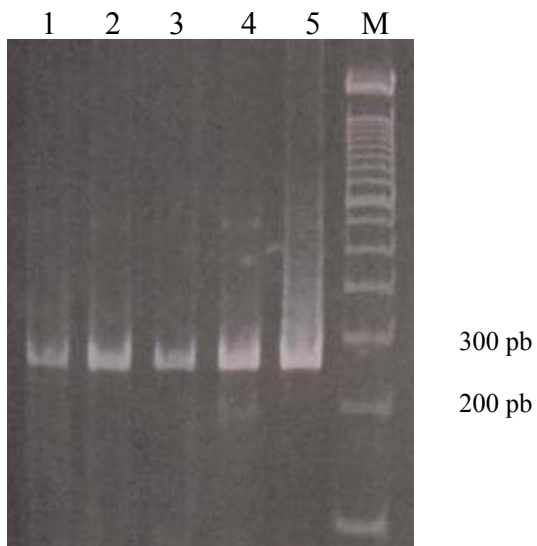


Figura 24. PCR- RFLP del *stx2* con *Hae* III en los aislados que fueron positivos para los genes *rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2* y *eaeA* de *E. coli* O157:H7. Carril 1: aislado de canal de bovino; carriles 2-4: aislados de canales de cerdo; carril 5: control positivo *E. coli* O157:H7 (CENAPA); M: marcador de peso molecular (100 pb).

Como resultado de caracterización molecular de los aislados de *E. coli* obtenidos de canales de cerdo y bovino, en la tabla III se tiene lo siguiente: de un total de 18 muestras, el 66.66% (6/9) en ambos tipos de canal fueron positivas por PCR para la presencia de *E. coli* serotipo O157:H7, demostrándose de esta manera que el patógeno puede estar presente en ambos tipos de canal.

En relación con la planta I se encontró que de los seis aislados que resultaron positivos para los genes que codifican para los antígenos O157 y H7, tres eran portadores de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA* por lo que fueron considerados como cepas enterohemorrágicas, y fueron obtenidos cada uno en un sitio diferente de la canal. Los otros tres no eran portadores de ninguno de los dos genes que codifican para las verotoxinas ni el gen de la intimina. Respecto a los seis aislados que fueron encontrados en la planta II y que amplificaron por PCR para los genes que codifican para los

TABLA III

Resumen de la caracterización molecular de los aislados de *E. coli* obtenidos de canales de cerdo y bovino.

Canal	Planta	Sitio de muestreo	Genotipo				
			<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>
Cerdo	I	A	-	-	-	-	-
Cerdo	I	B	-	-	-	-	-
Cerdo	I	B	-	-	-	-	-
Cerdo	I	C	+	+	-	-	-
Cerdo	I	C	+	+	-	-	-
Cerdo	I	A	+	+	+	+	+
Cerdo	I	B	+	+	+	+	+
Cerdo	I	C	+	+	-	-	-
Cerdo	I	C	+	+	+	+	+
Bovino	II	B	+	+	+	-	-
Bovino	II	C	+	+	+	+	+
Bovino	II	A	+	+	+	-	-
Bovino	II	B	+	+	+	-	-
Bovino	II	B	+	+	-	-	-
Bovino	II	C	+	+	-	-	-
Bovino	II	A	-	-	-	-	-
Bovino	II	C	-	-	-	-	-
Bovino	II	A	-	-	-	-	-

A = falda, B = costado, C = cuello

antígenos O157 y H7, cuatro fueron portadores del gen de la verotoxina 1, y de estos sólo uno fue portador del gen de verotoxina 2 y el de intimina, fue obtenido del cuello del animal y también clasificado como enterohemorrágico. Las diferencias observadas entre el número de canales positivas de cerdo y bovino para cualquiera de los genes no fueron significativas ($P > 0.05$) (tabla IV), lo que sugiere la posibilidad de encontrar a *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica indistintamente en ambos tipos de canal, sin embargo, estos datos deben considerarse con reserva, dado el tamaño pequeño de muestras analizadas. Respecto a los muestreos que se hicieron en los sistemas productivos de melón y chile (tabla V), solamente una muestra resultó positiva por PCR para los genes que codifican

TABLA IV

Proporción de aislados portadores de cada uno de los genes *rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, y de los cinco genes por tipo de canal

Canal	<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	Gen <i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	Portador de los cinco genes
Bovino	6/9 = 0.6666	6/9 = 0.6666	4/9 = 0.4444	1/9 = 0.1111	1/9 = 0.1111	1/9 = 0.1111
Cerdo	6/9 = 0.6666	6/9 = 0.6666	3/9 = 0.3333	3/9 = 0.3333	3/9 = 0.3333	3/9 = 0.3333
Significancia	NS	NS	NS	NS	NS	NS

para los antígenos O157 y H7, pero fue negativa para los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*, por lo que no fue considerada enterohemorrágica. La muestra era agua negra y fue tomada en la compuerta que separa el canal de aguas negras del canal de agua de río con el que se riega las huertas de melón en el Municipio de Matamoros Coahuila.

6.6. Identificación y Caracterización Molecular de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes se identificó y caracterizó en base al gen *hly* que codifica para la listeriolisina O (LLO). Las reacciones de PCR en base a este gen se realizaron utilizando 25 pmoles de los iniciadores (tabla X, apéndice C), 250 µM de una mezcla de deoxinucleotidos trifosfatos (GIBCOBRL), 1.5 mM de MgCl₂, 1X de Buffer para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 1.0 unidad de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline), 10-200 ng de ADN templado y agua miliQ estéril para un volumen final de 25 µl. Las condiciones del termociclador fueron un ciclo de 1 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento de iniciadores a 58 °C por 30 seg y una extensión a 72 °C por 30 seg, con una extensión final a 72 °C por

TABLA V

Resultados del análisis de PCR para *E. coli* O157:H7 en muestras de melón y chile tipo Bell.

†	††	†††	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	Total
Nayarit 1	M	22	0/5	-	-	0/2	-	0/5	0/5	0/5	-	-	0/22
Nayarit 2	M	5	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
Nayarit 3	M	15	0/5	-	-	-	-	0/4	0/5	0/1	-	-	0/15
Nayarit 4 BPA	M	21	0/5	-	-	0/1	-	0/5	0/5	0/5	-	-	0/21
Com. Lagunera	M	50	0/50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/50
Mat. Coah.	M	19	0/4	-	-	0/2	0/13	-	-	-	-	-	0/19
Mat. Coah. BPA	M	19	0/17	-	-	0/2	-	-	-	-	-	-	0/19
Paila Coah. BPA	M	8	0/6	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-	0/8
Mat. Coah. Suelo	M	8	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8	-	0/8
Merc. Aba. Mty	M	13	-	-	0/13	-	-	-	-	-	-	-	0/13
Merc. Aba. Mty	M	16	-	-	0/10	-	-	-	-	-	-	0/6	0/16
Sinaloa	Ch	43	0/21	0/8	-	0/11	0/3	-	-	-	-	-	0/43
Nayarit 5 BPA	M	22	0/5	-	-	0/2	-	0/15	-	-	-	-	0/22
Nayarit 6 BPA	M	14	0/10	-	-	0/4	-	-	-	-	-	-	0/14
Mat. Coah, riego con agua de río	M	33	0/15	-	-	1/4	0/3	0/6	0/3	0/1	0/1	-	1/33
TOTAL		308	0/148	0/8	0/23	1/28	0/19	0/37	0/18	0/12	0/9	0/6	1/308

†= lugar de muestreo, ††= fuente, †††= No. de muestras analizadas, M= melón, Ch= chile, a=Fruto en huerta, b= fruto en empaque, c= fruto en bodega, d= agua del canal, e= agua dentro de la huerta, f= cosechador, g= carretilla, h= caja de camioneta, i= suelo, j= trabajador en bodega.

10 min. El producto de PCR esperado fue de 420 pares de bases (pb). La figura 25 muestra el producto de PCR después de ser estandarizada la técnica.

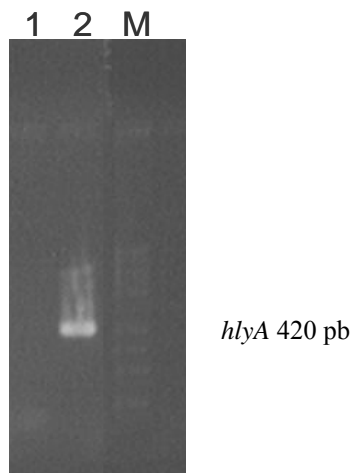


Figura 25. Producto de PCR para el gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes* después de estandarizada la técnica. Carril 1: control negativo; carril 2: control positivo *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644); M: marcador de peso molecular (100 pb).

Listeria monocytogenes se encontró solamente en 1.64% (3/182) de las muestras obtenidas del sistema productivo de melón (tabla VI), siendo dos de las muestras lavados de frutos de melón en la huerta y una de agua del canal de riego de la huerta de melón.

Respecto a las muestras cárnicas se encontró en un 35.71% (5/14) de las muestras (tabla VII). El producto de PCR obtenido fue de 420 pb (figura 26)

TABLA VI

Resultados del análisis de PCR para *L. monocytogenes* en muestras de melón y chile tipo Bell

†	††	†††	a	b	c	d	e	f	g	h	i	Total
Nayarit 1	M	22	0/5	-	1/2	-	0/5	0/5	0/5	-	-	0/22
Nayarit 2	M	5	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5
Nayarit 3	M	15	2/5	-	-	-	0/4	0/5	0/1	-	-	2/15
Nayarit 4 BPA	M	21	0/5	-	0/1	-	0/5	0/5	0/5	-	-	0/21
Mat. Coah. BPA	M	19	0/17	-	0/2	-	-	-	-	-	-	0/19
Paila Coah. BPA	M	8	0/6	-	-	-	0/2	-	-	-	-	0/8
Mat. Coah. Suelo	M	8	-	-	-	-	-	-	-	0/8	-	0/8
Merc. Aba. Mty	M	13	-	0/13	-	-	-	-	-	-	-	0/13
Merc. Aba. Mty	M	16	-	0/10	-	-	-	-	-	-	0/6	0/16
Nayarit 5 BPA	M	22	0/5	-	0/2	-	0/15	-	-	-	-	0/22
Mat. Coah, riego con agua de río	M	33	0/15	-	0/4	0/3	0/6	0/3	0/1	0/1	-	0/33
TOTAL		182	2/63	0/23	1/11	0/3	0/37	0/18	0/12	0/9	0/6	3/182

†= lugar de muestreo, ††= fuente, †††= No. de muestras analizadas, M= melón, a=Fruto en huerta, b= fruto en bodega, c= agua del canal, d= agua dentro de la huerta, e= cosechador, f= carretilla, g= caja de camioneta, h= suelo, i= trabajador en bodega

TABLA VII

Relación de muestras de carnes, canales y otras fuentes animales y resultados del análisis de PCR para *L. monocytogenes*.

Lugar de Muestreo	No. de muestras	Fuente	Positivas por PCR a <i>L. monocytogenes</i>
LCRM	14	Muestras varias de carne (bovino)	5/14
	14	Total	5/14

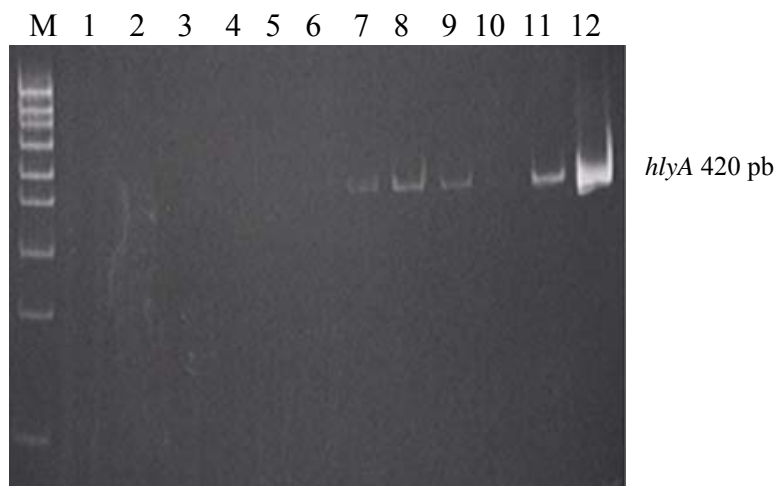


Figura 26. Productos de PCR para el gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes* de muestras enviadas al LCRM. Carriles 1-11: muestras cárnicas de origen bovino; carril 12: control positivo *L. monocytogenes* (ATCC 7644); M: marcador de peso molecular (100 pb).

El producto de PCR del gen *hly* fue sometido a digestión con al enzima *Mbo* I, generando el patrón de restricción observado en la figura 27. Los ocho aislados generaron el mismo patrón de restricción.

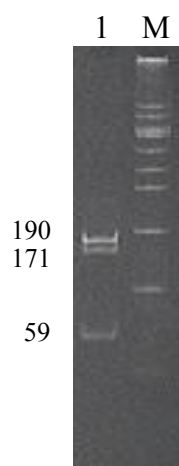


Figura 27. PCR- RFLP del gen *hly* con la enzima de restricción *Mbo* I. Carril 1: aislado de canal de bovino; M: marcador de peso molecular (100 pb).

7. DISCUSIÓN

La inocuidad de los alimentos ocupa un lugar preponderante en muchos países, debido a los riesgos y desafíos emergentes como los peligros microbiológicos que presentan los alimentos (FAO 2000), representados principalmente por bacterias de la familia Enterobacteriaceae (*Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *Shiguella*). Los incrementos en la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), la emergencia y reemergencia de algunas de esas ETA, aparición de nuevos escenarios epidemiológicos y formas de transmisión, el incremento de la resistencia antimicrobiana así como los costos socioeconómicos que lo anterior genera, ha conllevado al desarrollo de métodos de detección de patógenos basados en técnicas moleculares que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad y que a la vez son menos laboriosas y consumen menos tiempo en el diagnóstico comparadas contra las microbiológicas tradicionales. Tales técnicas resultan de gran ayuda cuando se analizan alimentos perecederos como carne fresca y/o de consumo en fresco como frutas y vegetales (Rojas y González, 2006).

Esta discusión se realizará en tres partes, correspondiendo la primera a los resultados relativos a *Salmonella* spp, la segunda a los resultados de *E. coli* O157:H7 y la última a los resultados sobre *Listeria monocytogenes*.

7.1. Discusión Sobre *Salmonella* spp

La salmonelosis es causada por especies del género *Salmonella* y fue descrita en 1984 como una nueva y significativa amenaza para la salud pública por la Organización Mundial de la Salud (FAO 1984). En este trabajo *Salmonella* spp., fue identificada utilizando la técnica de PCR en base al gen *invA* que codifica para una proteína esencial involucrada en el proceso de invasión a las células epiteliales y presente en la mayoría de (sino es que en todos) los serotipos de *Salmonella* (Galán *et al.*, 1992). La secuencia nucleotídica específica del gen *invA* en el género *Salmonella* y la ausencia de esta secuencia en otras bacterias invasivas como *Yersinia* spp., *Shigella* spp., y *E. coli* enteroinvasiva que también tienen la capacidad de invadir células epiteliales demuestra la particular especificidad y utilidad de este gen para la detección de *Salmonella* spp (Galán y Curtiss 1991). El gen *invA* ha sido usado principalmente como blanco en ensayos de PCR para detectar *Salmonella* en muestras alimenticias obtenidas de aves, carnes, lácteos, frutas y vegetales (Guo *et al.* 2000).

Los iniciadores utilizados en este estudio para amplificar un fragmento del gen *invA* ya han sido previamente evaluados (Rahn, *et al.* 1992) y en este caso junto con las condiciones que se estandarizaron de la reacción de PCR, se amplificó exitosamente este fragmento en las cepas de referencia así como en las muestras de campo que estaban contaminadas con *Salmonella* spp. La diferencia observada entre la proporción de muestras positivas a *Salmonella* en ambos sistemas productivos no fue significativa ($P > 0.05$), lo que sugiere que *Salmonella* puede ser encontrada con igual frecuencia en

ambos sistemas productivos. Sin embargo, es importante señalar que en el caso de las muestras obtenidas a partir del sistema productivo de melón, las que provenían de huertas manejadas bajo el esquema de buenas prácticas agrícolas (BPA) resultaron con un menor porcentaje ($2/132 = 1.5\%$) de muestras positivas a *Salmonella*, que en aquellas que provenían de huertas que no fueron manejadas bajo el esquema de BPA ya que en éstas se observó un mayor porcentaje de muestras contaminadas ($55/94 = 58.51\%$). Las BPA incluyen entre otras el uso de acolchado plástico, fertirrigación, agua de riego sin evidencia de contaminación microbiológica, baños portátiles en el campo, entrenamiento de los trabajadores de campo sobre BPA, el uso de pesticidas autorizados, designación de áreas donde los trabajadores pueden comer y descansar, y disponibilidad de agua potable, las cuales son herramientas básicas para reducir la contaminación microbiológica en la producción agrícola (FDA, 1998).

De acuerdo a la proporción de muestras positivas a *Salmonella* por tipo de muestra, la mayor proporción se presentó, en el siguiente orden, en muestras tomadas de las superficies de carretillas para acarrear los melones, caja de la camioneta donde transportan los melones, muestras de agua dentro de la huerta, muestras de agua del canal, cosechadores, lavados de frutos en huerta y lavados de frutos en el empaque. La presencia de *Salmonella* en las carretillas, caja de la camioneta y cosechadores pueden ser explicada por el hecho de que pudo haber contaminación cruzada, ya que tanto las carretillas como la caja de la camioneta por ser los medios de acarreo y transporte respectivamente y ser cargados y descargados por los cosechadores, reciben el total de frutos cosechados los cuales hasta ese momento estaban en contacto con el suelo y llevan

consigo residuos de suelo donde puede estar presente el patógeno. En relación con las muestras positivas de agua dentro de la huerta y muestras de agua del canal, existe literatura que menciona que el agua es una importante fuente de contaminación, particularmente aquella que pueda contener estiércol, heces fecales de fauna silvestre o contaminada con aguas negras (Reilly *et al.*, 1981; Islam *et al.*, 2004). Una probable razón por la cual se encontró *Salmonella* en muestras de agua de huertas donde no se aplicaron BPA, es que el agua utilizada para el riego de las explotaciones tanto de melón como de chile, procedían de canales abiertos sin ningún tipo de protección contra el contacto con los animales. Además, las explotaciones de melón en la Comarca Lagunera donde no se aplicaron BPA fueron regadas con los mismos canales utilizados para regar los cultivos forrajeros con aguas residuales. Esto último puede explicar la presencia de *Salmonella* en los lavados de frutos de melón, ya que el fruto está en contacto con el suelo húmedo y eventualmente con el agua cuando es aplicado el riego. Los frutos de chile dependiendo del hábito de crecimiento de la variedad, pueden tener contacto con el suelo aunque la mayoría crece en la parte aérea de la planta, por lo que la presencia de *Salmonella* en los frutos de chile puede atribuirse a la posibilidad de que insectos o aves sean los vectores. Moore *et al.*, (2003) mencionan la posibilidad de que los insectos que pertenecen al género *Chironomus* sean, directa o indirectamente los vectores de bacterias entéricas para el agua y los alimentos. Por otra parte, Sela *et al.*, (2005) probaron que el contacto directo con el suelo contaminado con estiércol o el polvo podría ser una fuente de contaminación pre-cosecha, y que fuentes indirectas de contaminación también puede ser debido a las interacciones tróficas entre los frutos y la fauna que se alimenta de vegetales como aves, mamíferos e insectos. Aunque en menor proporción, la presencia de

Salmonella en lavados de frutos en el empaque puede deberse a una mala calidad de agua utilizada para lavar los frutos o a una inadecuada limpieza y sanitización del equipo que entra en contacto con los frutos (CDC, 2002).

De los tipos de muestras analizadas del sistema productivo de melón, *Salmonella* no se encontró en frutos en las bodegas del mercado de abastos de Monterrey ni en los trabajadores de esas bodegas, lo cual puede reflejar un efecto positivo del tratamiento de sanitización usado en el empaque así como el buen nivel de higiene de los trabajadores. Tampoco se observaron muestras de suelo positivas en las huertas de melón con BPA en la Comarca Lagunera, pudiendo esto deberse al efecto de las BPA, las cuales tienen por objetivo, entre otros, eliminar o reducir las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento y desarrollo de malezas, plagas y microorganismos (SENASICA, 2002). En las muestras de carne analizadas también se detectó la presencia de *Salmonella*, lo cual ya ha sido documentado por otros autores quienes mencionan que entre las principales fuentes donde se puede encontrar a *Salmonella*, destacan los productos cárnicos de diverso origen como bovino, aves, cerdo, pescado, mariscos, etc. (Botteldoorn *et al*, 2004; Ohtsuka *et al*, 2005; Van *et al*, 2007)

No en todas las muestras que resultaron positivas por PCR para la presencia de *Salmonella* se pudo obtener el aislado por la técnica microbiológica, siendo una posible explicación que el microorganismo no estaba viable o se encontraba estresado lo cual pudo inhibir el crecimiento en estas muestras (Way *et al*, 1993; Maalej, *et al*, 2004; Fera *et al*, 2004). Esto demuestra la ventaja de la técnica de PCR sobre la microbiológica ya

que no es necesario que el microorganismo este viable para poder detectar su presencia, siendo suficiente con que la secuencia nucleotídica del gen de interés este intacta en la muestra a analizar (Strachan y Read, 1999; Graham y Qureshi, 2001).

Los aislados recuperados de *Salmonella* fueron caracterizados en base a la técnica PCR-RFLP. Este estudio se realizó en base a la amplificación del gen *fliC* por PCR y posterior digestión con la enzima de restricción *Sau3AI*. El par de iniciadores utilizados permitió la amplificación del gen *fliC*, tanto en las cepas de referencia como en los aislados recuperados, el cual fue de tres tamaños básicamente de acuerdo a la simulación de PCR y los cuales estuvieron dentro del rango en tamaño que ya ha sido mencionado por McQuiston *et al.*, (2004). Estos resultados señalan un primer indicio de la variabilidad en la secuencia nucleotídica de este gen y que es responsable de la variabilidad antigénica observada en la proteína flagelina fase 1 (Kilger y Grimont, 1993; Herrera-León *et al.*, 2004).

Los patrones de restricción que se generaron con la endonucleasa *Sau3AI* en los aislados de serotipo conocido, coincidieron con los encontrados por Hong *et al.*, (2003) quienes señalan que mediante el análisis del gen *fliC* y *fljB* y doble digestión con la enzimas *Sau3AI* y *HhaI*, lograron diferenciar 24 genes flagelares fase 1 y ocho genes flagelares fase 2, los que contienen los mayores determinantes antigénicos de 52 serotipos de las especies de *Salmonella*, e incluyen los serotipos comunes encontrados en avicultura y en otras especies animales importantes destinadas al consumo alimenticio. En este trabajo se empleo sólo la enzima *Sau3AI* y fue capaz de diferenciar a los

serotipos *S. Kentucky*, *S. Typhi*, *S. Wortingthon*, *S. Stanley*, *S. Paratyphi A* (ATCC 9150), *S. Typhimurium* (ATCC 13311) y *S. Enteritidis* (ATCC 13076) ya que cada uno produjo un patrón de restricción diferente. Sin embargo no pudo diferenciar al serotipo *S. Enteritidis* de los que provenían de origen de ave, ya que los patrones de restricción fueron similares. Al respecto Hong *et al.*, (2003) mencionan que ni aún con la doble digestión ellos pudieron diferenciar a *S. Enteritidis* de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, que son los serotipos más comunes de origen avícola, explicando que esto es debido a la alta homología en el gen *fliC* entre estos serotipos. En lo que respecta a los aislados obtenidos de los diferentes tipos de muestras analizadas en este estudio, esta técnica fue capaz de separar los aislados por el serotipo al que pertenecen, por el origen de las muestras y por diferencias nucleotídicas en el gen *fliC* expresadas éstas como diferencias en el número de bandas y tamaño de las mismas, lo que contribuyó a que los aislados se agruparan en cuatro grupos. El serotipo más frecuente fue *S. Typhimurium* el cual se encontró en las muestras cárnicas de origen bovino, una muestra de ave, una muestra de origen humano y en las muestras de los sistemas productivos de melón y chile, lo cual coincide con Gutiérrez-Cogco *et al.*, (2000) quienes mencionan que *S. Typhimurium* es el serotipo más frecuentemente aislado tanto en muestras de origen humano como ambientales. De los aislados que se agruparon con *S. Enteritidis*, 17 de ellos se obtuvieron de aves, a los que fue necesario analizarlos por PCR para descartar si eran del serotipo *S. Enteritidis* y como no hubo amplificación del producto de PCR esperado a partir del gen *sdfl* específico de *S. Enteritidis*, se confirmó que no eran de este serotipo. El motivo por el que agruparon juntos *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* puede ser explicado por el hecho de que la región central del gen *fliC* que codifica para los factores antigénicos en estos serotipos

es idéntica (Mortimer *et al.*, 2004), y siendo *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* serovariedades no móviles, se considera al gen *fliC* en estos serotipos un gen críptico (Kilger y Grimont, 1993; Hong *et al.*, 2003; Imre *et al.*, 2005). También en este grupo quedaron cinco aislados obtenidos de humano y dos del sistema productivo de Chile. El resto de los aislados quedaron en dos grupos con menor similitud entre ellos con serotipos como *S. Kentucky*, *S. Typhi*, *S. Worthington*, *S. Stanley* y *S. Paratyphi A*. Respecto al software DNA Strider 1.2, es importante señalar que fue de gran ayuda ya que gracias a su uso y a las secuencias reportadas del gen *fliC* en el GeneBank, pudimos conocer antes de la digestión con *Sau3AI*, el número y tamaño de los fragmentos esperados a partir del gen *fliC* de cada serotipo conocido con lo cual corroboramos los patrones de restricción obtenidos, además nos permitió saber que entre los aislados obtenidos del sistema productivo de melón tanto de Nayarit como de la Comarca Lagunera, el serotipo *S. Poona* que fue motivo de brotes de salmonelosis en el período 2000-2002 en Estados Unidos por consumo de melón mexicano (CDC, 2002), no estaba presente, ya que el patrón de restricción esperado para el gen *fliC* de este serotipo (en base a la secuencia del gen *fliC* de *S. Poona* obtenida del GeneBank: accesión No. AY353467) no fue observado entre los aislados obtenidos de melón. Dauga *et al.*, (1998) mencionan que si bien el gen *fliC* no fue suficiente para distinguir algunos factores antigénicos, si tiene el potencial para distinguir otros antígenos flagelares e incluso algunos serotipos, lo cual coincide esto último con lo encontrado en este trabajo. Fitzgerald *et al.*, (2001) señalan que PCR-RFLP puede ser útil por su rapidez en la caracterización preliminar de cepas cuando el objetivo es establecer una relación epidemiológica. Se menciona también (Dauga *et al.*, 1998; McQuiston *et al.*, 2004) que la técnica de serotipificación tradicional tiene entre otros

inconvenientes que es cara, laboriosa y tardada (hasta tres días para determinar un serotipo) y que la técnica de PCR-RFLP puede ser una buena opción para distinguir a los serotipos más comunes, dejando la serotipificación para serotipos menos frecuentes. Si bien no se tiene un aproximado del costo que representó en este trabajo la identificación por aislado con esta técnica, el tiempo empleado para identificar varios aislados al mismo tiempo desde la puesta en marcha del PCR hasta la visualización de los fragmentos de restricción en el gel fue de aproximadamente 5 horas lo cual representa una ventaja.

Electroforesis de campo pulsado (PFGE) ha sido catalogada como la técnica estándar en estudios de genotipificación debido a su alta capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas (Fitzgerald *et al.*, 2001; Gebreyes, 2003; Fernández, 2004). En este estudio PFGE tuvo capacidad adicional para distinguir entre cepas no relacionadas de un mismo serotipo, ya que aislados que agruparon juntos con la técnica de PCR-RFLP, en este caso fueron separados en grupos diferentes, demostrando la existencia de diferencias nucleotídicas adicionales entre estos aislados. Tales resultados eran de esperarse, dado que el tamaño del material genético base fue diferente en una y otra técnica, siendo en el caso de PCR-RFLP una secuencia que puede representar un gen completo (gen *fliC*) o una fracción de éste, estando limitado a esa región nucleotídica y a la existencia de sitios de restricción para la endonucleasa empleada el potencial de diferenciación de la técnica de PCR-RFLP (Fitzgerald *et al.*, 2001), mientras que en PFGE al emplearse el genoma completo, se tiene material genético extra (más genes) (Foxman *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2006) sobre el cual actuó la endonucleasa de corte poco frecuente, lo cual determinó las

diferencias principalmente en el tamaño de los fragmentos generados y en el número de éstos en una y otra técnica.

De acuerdo a la interpretación de resultados de PFGE los aislados que agrupan dentro de un mismo pulsotipo son indistinguibles y se considera que son clones por derivarse de un progenitor común (Tenover *et al.*, 1995; Amavisit *et al.*, 2005). Dentro de los aislados provenientes de aves, el pulsotipo 4 fue común entre los aislados de CBVFC, SA, Avimex y TP, lo que puede sugerir la presencia de una cepa endémica en esos lugares (Tenover *et al.*, 1995) o bien que la presencia en esos lugares obedece al movimiento de esa cepa vía la movilización y transporte de aves. La posibilidad anterior es señalada por Thong *et al.*, (1995) quienes encontraron un pulsotipo común de *S. Typhi* entre aislados de Malasia, Tailandia e Indonesia atribuyendo esto al excesivo movimiento de trabajadores migrantes y visitantes entre esos países.

Si bien la técnica de PCR-RFLP del gen *fliC* no fue capaz de separar entre aislados pertenecientes al serotipo de *S. Enteritidis* y de aquellos obtenidos de aves con posible serotipo *S. Gallinarum* y/o *S. Pullorum*, la técnica de PFGE si fue capaz de hacerlo, ya que varios de los aislados obtenidos de muestras del sistema productivo de Chile y que fueron caracterizados por PCR-RFLP del gen *fliC* como pertenecientes al serotipo *S. Enteritidis*, fueron agrupados en el pulsotipo 6 de *S. Enteritidis*, el cual incluso incluyó un aislado obtenido de aves, lo cual coincide con lo señalado por Mancera *et al.*, (2005) quienes reportan que además de la presencia de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en aves, también puede estar presente *S. Enteritidis*, serotipos que están estrechamente

relacionados (Porwollik *et al*, 2005). En los aislados provenientes del sistema productivo de Chile, se encontraron los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* cada uno con dos pulsotipos. En el caso de los aislados pertenecientes a *S. Enteritidis* los dos pulsotipos diferían por una banda y fueron encontrados, uno en muestras de lavados de frutos en campo y el otro en una muestra de agua del canal, mientras que los dos pulsotipos que pertenecían a *S. Typhimurium* diferían por tres bandas, siendo uno de los pulsotipos encontrado en una muestra de lavados de frutos en campo y en muestras de agua del canal, y el otro en muestras de lavados de frutos en campo y en un lavado de frutos en empaque, y lo cual de acuerdo a Tenover *et al.*, (1995) se trata de cepas estrechamente relacionadas. Lo anterior muestra que ambos serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* están presentes en un mismo tipo de muestras, así como un mismo serotipo puede estar presente en diferentes tipos de muestras y tener diferentes pulsotipos. Existen estudios que indican que existe una gran diversidad genética y ecológica, así como una alta recombinación e intercambio genético en los microorganismos y que estos fenómenos permiten generar gran cantidad de genotipos a pesar de no suceder en cada generación. No sólo se mueven genes, sino que se recombinan plásmidos y fragmentos de genes. Algunas de estas combinaciones resultan exitosas e invaden nuevos nichos ambientales o nuevos hospederos, y así continuamente están surgiendo nuevas variantes como las de *E. coli* que pueden llegar a ser muy competitivas, como por ejemplo, la patógena O157:H7. Esto genera una estructura poblacional con ecotipos y al mismo tiempo cepas que pueden vivir en gran cantidad de ambientes que antes se creían secundarios o atípicos para la especie, Souza *et al.*, (2001).

Los coeficientes de similitud y el índice de diversidad, fueron diferentes en ambas técnicas, siendo mayores los valores de ambos parámetros en PFGE (El coeficiente de similitud varió de 1.0 a 0.35 y el índice de diversidad (D) fue de 0.94) que en PCR-RFLP (El coeficiente de similitud varió de 100 a 75 y el índice de diversidad (D) fue de 0.68), lo cual señala que PFGE tuvo un poder de discriminación mayor que PCR-RFLP. Estos resultados pueden explicarse considerando la variabilidad genética base utilizada en una y otra técnica, siendo mayor en PFGE, ya que examina los polimorfismos en el genoma completo mientras que en PCR-RFLP es en base a un solo locus genético el cual puede no ser representativo del genoma entero (Fitzgerald *et al*, 2001).

7.2. Discusión Sobre *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno transmitido por alimentos y es importante en salud pública, implicado en brotes de colitis hemorrágica y posible aparición posterior del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Mead y Griffin, 1998). Una característica de *E. coli* O157:H7 es el bajo número de células requeridas para desarrollar la enfermedad, de 10 a 100 células (Feng y Weagant, 2002) por lo que la no detección por los métodos tradicionales microbiológicos no es sinónimo de seguridad del alimento. *E. coli* O157:H7 puede estar presente en una gran variedad de animales silvestres y domésticos entre los cuales se encuentran bovinos, porcinos y ovinos (Hutchison *et al.*, 2000), siendo principalmente los rumiantes y sus heces fecales un reservorio natural de este patógeno (Heuvelink *et al.*, 1998; Nataro y Kaper, 1998). La transmisión de *E. coli* O157:H7 a los humanos en forma directa o indirecta puede ser por contaminación de los alimentos a

partir de material fecal, agua contaminada, y contacto con personas o animales enfermos (Cornick y Helgerson, 2004). Por otro lado, microorganismos patógenos al humano como *E. coli* O157:H7, que habita naturalmente en el tracto digestivo del ganado bovino, puede eventualmente contaminar la canal durante el proceso de evisceración o en el manejo posterior (Schroeder *et al.*, 2003). Aunque el serotipo de *E. coli*, O157:H7 es determinado por los genes *rfbE* y *fliC* que codifican respectivamente para la biosíntesis del lipopolisacárido O157 y la proteína flagelina, lo que a su vez determina respectivamente los antígenos O y H, la patogenicidad se debe a la expresión de varios genes que codifican para factores de virulencia, entre estos se encuentran los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las verotoxinas 1 y 2 respectivamente, los cuales se encuentran en un bacteriófago integrado al cromosoma bacteriano y que han sido asociados al desarrollo del SUH, particularmente *stx2* (Paton y Paton, 1998). Otro de los genes de virulencia localizado en el locus de efusión en enterocitos (LEE) es el gen *eaeA* que codifica para la intimina y que es necesario para el proceso de la adherencia íntima a las células epiteliales del intestino humano (Fratamico *et al.*, 1995; Nataro y Kaper, 1998; Rogerie *et al.*, 2001).

Solamente una muestra proveniente del sistema productivo de melón fue positiva para los antígenos O157 y H7 pero negativa para los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y *eaeA*, por lo que no fue considerada enterohemorrágica, sin embargo, el potencial de contaminación por *E. coli* O157:H7 en estos tipos de frutos es alto, dado que es común en algunas regiones agrícolas del país el riego de los cultivos forrajeros con aguas negras y posterior rotación en el mismo terreno a cultivos horto-frutícolas de hábito rastrero como el melón,

así como el uso de los mismos canales por donde se condujo aguas negras para conducir el agua de río, lo cual representa uno de los factores de riesgo microbiológico (INFOSAN, 2007).

En relación con las muestras obtenidas de canales de cerdo (planta I) y bovino (planta II), en ambos tipos de muestras se determinó por PCR la presencia de *E. coli* serotipo O157:H7, comprobándose así que además de las canales de bovino, este patógeno puede estar presente en canales de cerdo. *E. coli* O157:H7 se ha encontrado en una gran variedad de alimentos tanto de origen vegetal como animal, pero se ha asociado particularmente a la carne del ganado bovino, ya que esta especie se ha considerado como un reservorio natural de este patógeno. Sin embargo existen reportes que mencionan su presencia en otras especies animales como cerdos, ovejas, caballos, venados, perros y aves (Doyle, 1991; Heuvelink *et al.*, 1999; Bouvet *et al.*, 2001). De las muestras obtenidas de canales de cerdo, tres fueron consideradas enterohemorrágicas. Es importante mencionar que cada una de estas tres cepas fue obtenida de un sitio diferente en la canal, una en la cadera, una en el costado y otra en el cuello, lo que plantea la posibilidad de que se tratara de un mismo animal, o bien que se tratara de animales diferentes pero procedentes de una misma granja o lugar y en la cual existe la presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica. Respecto a las seis cepas que fueron encontradas en las canales de bovino y que amplificaron por PCR para los genes que codifican para los antígenos O157 y H7, cuatro fueron portadores del gen de la verotoxina 1, y de éstos sólo uno fue portador del gen de verotoxina 2 y el de intimina, y fue obtenido del cuello del animal. Si bien lo anterior señala el riesgo de encontrar a este patógeno en ambos

tipos de canal y representa un riesgo para la salud, pone de manifiesto la ineficiencia de las buenas prácticas higiénicas en el manejo de la canal, puesto que un animal sano puede portar el patógeno en su pelo, piel y tracto intestinal (Bouvet *et al.*, 2001); o bien la canal contaminada en el proceso de sacrificio contamine a otras canales debido a un deficiente proceso de evisceración. Las diferencias entre el número de canales positivas de cerdo y bovino no fueron significativas ($P > 0.05$), lo que sugiere la posibilidad de encontrar a *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica indistintamente en ambos tipos de canal, habiendo concordancia con otros autores (Nakazawa *et al.*, 1999) quienes encontraron la cepa *E. coli* O157:H7 en cerdos de varias edades en granjas de Japón, apoyando los presentes resultados lo planteado por Cornick y Helgerson (2004) quienes mencionan la posibilidad de que los cerdos sean hospederos biológicamente competentes para *E. coli* O157:H7 y otras cepas de *E. coli* verotoxigénicas. Sin embargo, estos datos deben considerarse con reserva, dado el tamaño de muestras analizadas.

En algunos países como Estados Unidos la presencia del serotipo O157:H7 en los alimentos, no importa si es o no verotoxigénica, es motivo de preocupación por el riesgo que ello implica en la salud de los consumidores. Por lo tanto, además de determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en los alimentos es muy importante caracterizarlos en relación con otros factores de patogenicidad. La importancia clínica que tiene *E. coli* O157:H7 como patógeno radica en el hecho de que puede ser portadora de uno o ambos genes que codifican para las verotoxinas así como el gen de la intimina lo que determina que la cepa sea considerada enterohemorrágica (Nataro y Kaper, 1998). Las diferencias encontradas en la proporción de cepas portadoras de cada uno de los genes

independientemente del tipo de canal, fueron altamente significativas ($p \leq 0.01$). De las cepas que fueron positivas para los genes *rfbE* y *fliC*, sólo siete de éstas eran portadoras del gen *stx1*, y de estas siete, cuatro eran portadoras del gen *stx2*. Los genes *stx1* y *stx2* se encuentran cada uno en un bacteriófago temperado lisogénico, los cuales integran su ADN al cromosoma de *E. coli* O157:H7 (Shaikh y Tarr, 2003). Esto puede explicar que las cepas de *E. coli* O157:H7 expresen una o ambas verotoxinas, lo cual ya ha sido documentado (Rogerie *et al.*, 2001). Feder *et al.*, (2003) encontraron en cerdos, además de *E. coli* O157:H7 portadora de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, la presencia del genotipo portador de *stx1* y los genes de virulencia *eaeA* y *hly*, o bien, genotipos portadores de *eaeA*, *stx1* y *stx2*, pero no con los cuatro genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly*. Así mismo, otros autores reportaron en canales de bovino, un aislado de *E. coli* O157:H7 que fue negativa por PCR para los genes *stx* pero positiva para los genes de virulencia *ehx* y *eaeA* (Elder *et al.*, 2000). No obstante se ha reportado una mayor proporción de cepas portadoras del gen *stx2* que del gen *stx1* (Elder *et al.*, 2000), en el presente trabajo no se encontró la misma proporción, pero sí hubo coincidencia con otro reporte (Heuvelink *et al.*, 1998) donde se menciona que la mayoría de las cepas portadoras del gen *stx2*, también lo son para el gen *eaeA*, ya que las cuatro cepas portadoras del gen *stx2* también fueron portadoras del gen *eaeA*.

Mediante PCR-RFLP del gen *stx2* y con el uso de la enzima de restricción *Hae* III se buscó alguna diferencia entre los cuatro aislados que fueron caracterizados como enterohemorrágicos, no observándose diferencias en el patrón de restricción, lo que puede sugerir que se trata de una misma cepa enterohemorrágica la que puede ser

encontrada en ambos tipos de canal, pero debido a que el producto de PCR que fue sometido a digestión es muy pequeño, es mejor tomar las reservas del caso, aunque se ha mencionado (De Baets *et al.*, 2004) que existe variación nucleotídica en el gen *stx2* la cual puede ser determinada a través de PCR-RFLP.

7.3. Discusión sobre *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular del humano y animales transmitido por alimentos (Schlech, 1998), puede provocar meningitis, encefalitis, abortos espontáneos y septicemia, considerándose que la mayoría de la infecciones (99%) se deben a alimentos contaminados (crudos y listos para comer) con este patógeno (Mead *et al.*, 1999; Gombas *et al.*, 2003; Wiedmann, 2003). *L. monocytogenes* se ha asociado con infecciones invasivas de más de 40 especies de mamíferos y aves, y es capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de los hospederos por largos períodos de tiempo y soportar las condiciones estresantes del medio ambiente que matarían a otras bacterias patógenas transmitidas por alimentos, consecuentemente ha sido aislada de una gran variedad de fuentes ambientales como superficies de agua abiertas, suelo, aguas negras, vegetación y plantas procesadoras de alimentos (Fenlon, 1999).

En este estudio se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en muestras obtenidas del sistema productivo de melón de huertas en el estado de Nayarit y en las cuales no se aplicaron BPA. Asimismo en muestras cárnicas de origen bovino. El par de iniciadores utilizado así como las condiciones de PCR fueron adecuados ya que se pudo amplificar

un fragmento del gen *hly*, el cual codifica para una hemolisina conocida como listeriolisina O, la cual participa como factor de virulencia en la patogenia de esta bacteria, ya que una vez que es fagocitada por el macrófago, la listeriolisina es liberada y tiene actividad lítica en el fagosoma y el microorganismo es liberado a el citoplasma del macrófago. Este gen ha sido usado por Gray *et al.*, (2004) como gen blanco para identificar a *L. monocytogenes*. La presencia en ambos tipos de alimentos representa un factor de riesgo sobretodo en alimentos como el melón que son consumidos en forma directa. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2001) señala que *L. monocytogenes* frecuentemente puede estar presente en alimentos crudos tanto de origen animal como vegetal, así como en alimentos cocidos debido a contaminación post-procesamiento. Las muestras obtenidas del sistema productivo de melón correspondían a dos lavados de frutos en la huerta y una de agua obtenida del canal de riego, esto señala que *L. monocytogenes* está presente en el agua de riego así como en el terreno de siembra, siendo un flujo lógico de transmisión del patógeno del agua de riego hacia la huerta, donde los frutos de melón están en contacto directo con el suelo (recordemos que era una huerta donde no se aplicaron BPA como el acolchado plástico).

Mediante PCR-RFLP del gen *hly* y con el uso de la enzima de restricción *Mbo* I se buscó alguna diferencia entre los ocho aislados de *L. monocytogenes*, pero no se observaron diferencias en el patrón de restricción, lo cual puede sugerir que los aislados obtenidos tanto de las muestras del sistema productivo de melón como de los productos cárnicos pertenezcan a un mismo subtipo común entre aislados obtenidos de alimentos y no relacionados con casos clínicos en humanos (Gray *et al.*, 2004).

8. CONCLUSIONES

1. Mediante PCR se determinó de manera rápida y confiable la presencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* tanto en muestras de alimentos de origen cárnico como de frutas y hortalizas.
2. Mediante PCR-RFLP del gen *fliC* se logró diferenciar varios serotipos de *Salmonella* spp., entre ellos algunos de importancia como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi* y *S. Paratyphi A*.
3. Este estudio demostró la utilidad de PCR-RFLP para determinar el serotipo de aislados de *Salmonella* por comparación de perfiles de restricción de sepas de referencia conocidas.
4. PCR-RFLP es una técnica rápida, simple, y reproducible y puede potencialmente ser aplicada en la identificación de aislados de *Salmonella* obtenidos de otros sistemas agrícolas y pecuarios.
5. Debido a que PCR-RFLP no pudo diferenciar el serotipo *S. Enteritidis* de los de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, la serotipificación tradicional continúa siendo una opción viable.
6. Mediante PFGE se demostró la presencia de diferencias nucleotídicas adicionales en aislados de *Salmonella* pertenecientes al mismo serotipo, lo cual permitió separarlos en pulsotipos diferentes.

7. Se determinó mediante PFGE que los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los únicos encontrados en los sistemas productivos de melón y chile tipo Bell.
8. Se determinó mediante PFGE que ambos serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* están presentes en un mismo tipo de muestras, así como también pueden estar presentes en diferentes tipos de muestras y tener diferentes pulsotipos.
9. La aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas en el sistema productivo de melón demostraron que contribuyen a disminuir o evitar la presencia de patógenos como los estudiados en el presente trabajo.
10. Los resultados de esta investigación señalan que en los sistemas agrícolas en los cuales no se aplican BPA, puede ocurrir contaminación por *Salmonella*, representando un riesgo de salud para los agricultores y consumidores finales de productos agrícolas como el melón y chile.
11. Se demostró que el agua que se usa para irrigar los cultivos hortofrutícolas puede ser una importante fuente de contaminación por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.
12. Se demostró que *Salmonella* puede ser transmitida por contacto directo del agua hacia los melones y de éstos o del agua a otras partes del sistema productivo, incluyendo a los trabajadores agrícolas.
13. Se determinó mediante PCR y PCR-múltiplex la presencia de cepas de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágicas tanto en canales de res como de cerdo.

14. Se logró caracterizar mediante PCR y PCR-múltiplex aislados de *E. coli* O157:H7, diferenciando aquellos que son considerados cepas enterohemorrágicas de los que no son.
15. Las canales de bovino y las de cerdo pueden ser portadoras de *E. coli* O157:H7, lo que refleja la capacidad de este patógeno para colonizar también a la especie porcina.
16. Los resultados obtenidos en este trabajo a través de la PCR constituyen un aporte valioso en materia de inocuidad alimentaria y salud pública al demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica en estos tipos de alimentos.
17. De gran utilidad resultó la PCR para determinar el grado de virulencia de los aislados ya que permitió identificar los que fueron portadores de los genes de virulencia verotoxinas 1 y 2 y del gen de la intimina, siendo además muy importante desde el punto de vista epidemiológico el hecho de haber encontrado cepas portadoras de los factores de virulencia por ser consideradas patógenas al humano.
18. Si bien el gen *hly* de *L. monocytogenes* es un buen candidato para la identificación de este patógeno por PCR a partir de muestras de alimentos, otras alternativas para caracterizar patógenos deben probarse y descartar que se trate de cepas pertenecientes al mismo subtipo o diferente.

RECOMENDACIONES

1. En relación con el trabajo sobre *E. coli* O157:H7 y debido a que no se obtuvieron muestras ambientales, ni de los trabajadores dentro de los mataderos, así como de las herramientas de corte que ellos utilizan, serán necesarios estudios posteriores para descartar la existencia de fuentes externas de contaminación, así como la posibilidad de contaminación cruzada al momento de la evisceración.
2. De acuerdo con los resultados encontrados, se abre la posibilidad para realizar estudios más a fondo del destino que tendrían el tipo de cepas de *E. coli* O157:H7 sobre la incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos, o si bien, el proceso de cocción es suficiente para eliminar el riesgo de contaminación al momento del consumo de la carne contaminada con dicha bacteria.

LITERATURA CITADA

Agron PG, Walker RL, Kinde H, Sawyer SJ, Hayes DC, Wollard J, and Andersen GL. 2001. Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, No. 11: 4984–4991.

Alcano IE. 2001. DNA technology. The awesome skill. 2nd edition. Harcourt/Academic Press. U.S.A. pp: 154.

Amavisit P, Boonyawiwat W, and Bangtrakulnont A. 2005. Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- Isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43, No. 6: 2736–2740.

Amplify. 1992. For Analyzing PCR Experiments [program]. V1.2B version. Madison, WI 53706: University of Wisconsin.

Bernard RG and Pasternak JJ. 1998. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. In: PRESS. A, ed. Washington, D.C.

Beuchat LR. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Geneva. World Health Organization. (Report No. WHO/FSFIFOV98.2).

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso M, Hermoso J, Alonso MP, Dhabi G, Gonzalez EA, Bernardez MI, Blanco J. 2003. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxins (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J Clin Microbiol*. 41: 1351-1356.

Botteldoorn N, Herman L, Rijpens N, and Heyndrickx M. 2004. Phenotypic and Molecular Typing of *Salmonella* Strains Reveals Different Contamination Sources in Two Commercial Pig Slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, No. 9: 5305-5314.

Bouvet J, Bavai C, Rossel R, Le Roux A, Montet MP, Ray-Gueniot S, Mazuy C, Arquillie`re C and Vernozy-Rozand C. 2001. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 71: 249-255.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R & Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2465-2467.

Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W and Martin W. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, No. 10: 4688–4692.

Burtscher C, Fall PA, Wilderer PA and Wuertz S. 1999. Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Suspended Organic Waste by Nucleic Acid Extraction and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, No. 5: 2235–2237.

Callicott KA, Stern NJ, Hiatt KL, and the Campy-on-Ice Consortium. 2005. Isolation of DNA for PCR assays from noncultivable *Campylobacter jejuni* isolates. *Poultry Science* 84:1530–1532.

CDC. 2000. Maneje y Prepare los Alimentos Higiénicamente. http://www.cdc.gov/ncidod/op/food_sp.htm [Revisado el 15 de julio de 2003].

CDC. 2002. Multistate Outbreaks of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 2000-2002. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5146a2.htm> [Revisado el 12 de noviembre de 2003].

CDC. 2004a. *Salmonella* Annual Summary. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2004/SalmonellaAnnualSummary%202004.pdf> [Revisado el 10 de octubre de 2006].

CDC. 2004b. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Pulse Net USA-The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols.htm> [Revisado el 18 de enero de 2006].

Christensen HB. 1989. Datos categóricos y sus pruebas. Novena unidad. En: Houghton Mifflin Co. (Ed) Estadística paso a paso. 2a. Edición. Trillas, México. Pp 459-477.

Cisneros OY. 1999. Calidad del agua. Memorias sobre inocuidad alimentaria. SAGAR. BANCOMEXT. pp: 15-16.

Cockerill III, FR. 1999. Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 43, No. 2: 199–212.

Cornick NA and Helgerson AF. 2004. Transmission and Infectious Dose of *Escherichia coli* O157:H7 in Swine. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5331–5335.

Dauga C, Zabrovskaja A, and Grimont PAD. 1998. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2835–2843.

Davis MA, Hancock DD, Rice DH, Call DR, DiGiacomo R, Samadpour M, Besser TE. 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology* 95: 199–210.

De Baets L, Van der Taelen I, De Filette M, Pie´rard D, Allison L, De Greve H, Hernalsteens JP and Imberechts H. 2004. Genetic Typing of Shiga Toxin 2 Variants of *Escherichia coli* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, No. 10: 6309–6314.

Desmarchelier PM, Bilge SS, Fegan N, Mills L, Vary Jr JC, Tarr PI. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157:H7 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolisaccharide. *J Clin Microbiol.* 36: 1801-1804.

Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.

Doyle MP. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12: 289-301.

Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M and Laegreid WW. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the national Academic of Sciences* 97: 2999-3003.

Ezaki T, Kawamura Y and Yabuuchi E. 2000. Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved Lists 1980) and *Salmonella typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 945–947.

FAO. 1984. Food inspection. In *Food and Nutrition Paper*, Vol. 14. pp. 107-12.

FAO. 2000. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control. Roma. Disponible en el sitio de red: <http://www.fao.org/DOCREP/005/W8088S/W8088S00.HTM> [Revisado el 8 de mayo de 2004].

FDA. 1998. Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables. USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.foodsafety.gov/~dms/prodguid.html> [Revisado el 3 de abril de 2006].

FDA. 2001a. Los diez patógenos de alimentos menos apreciados. USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.foodsafety.gov/~fsg/bac/s10least.html> [Revisado el 21 de junio de 2003].

FDA. 2001b. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Chapter IV: Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-4a.html> [Revisado el 16 de junio de 2006].

FDA. 2003a. U.S. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Salmonella* spp. USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html> [Revisado el 10 de junio de 2003].

FDA. 2003b. U.S. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Escherichia coli* O157:H7 spp. USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html> [Revisado el 10 de junio de 2003].

Feder I, Morgan WF, Gray JT, Fratamico P, Fedorka-Cray PJ, Pearce RA, Call JE, Perrine R and Luchansky JB. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerging Infectious Diseases* 9: 380-383.

Feng P and Weagant SD. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 4a. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html#fn1> [Revisado el 27 de septiembre de 2004].

Fenlon DR. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: *Listeria listeriosis and food safety*, E. T. Ryser and E. H. Marth (eds.), 2nd ed. Marcel Decker, Inc., New York, N.Y. pp. 21–38

Fera MT, Maugeri TL, Gugliandolo C, Beninati C, Giannone M, La Camera E and Carbone M. 2004. Detection of *Arcobacter* spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 3: 1271–1276

Fernández, CF. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(6):355-60.

Fitter S, Heuzenroeder M and Thomas CJ. 1992. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 53-59.

Fitzgerald C, Helsel LO, Nicholson MA, Olsen SJ, Swerdlow DL, Flahart R, Sexton J and Fields PI. 2001. Evaluation of Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* during an Outbreak Involving a Food Handler. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39, No. 7: 2386–2390.

Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD and Marrs CF. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 2:10

Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M and Deng MJ. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2188-2191.

Galán JE and Curtiss R. 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D Genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59, 2901-2908.

Galán JE, Ginocchio E and Costeas P. 1992. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of InvA to Members of a New Protein Family. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174, No. 13: 4338-4349.

Gannon VPJ, Rashed M, King RK, Gosteyn EJ. 1993. Detection and Characterization of the *eae* Gene of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 31: 1268-1274.

Gannon VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. 1997. Use of the Flagellar H7 Gene as a Target in Multiplex PCR Assays and Improved Specificity in Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol.* 35: 656–662.

Gebreyes WA. 2003. Pre-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovars. Part 2: Molecular diagnostics. *J Swine Health Prod.* 11 (3):141-145.

Gombas DE, Chen Y, Clavero RS and Scott VN. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Prot.* 66:559–569.

González FT y Rojas HRA. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*. Vol.47, No.5: 388-390.

Graham DY and Qureshi WA. 2001. Markers of Infection. Pathogenesis in the Host, Diagnosis, and Treatment. In: *Helicobacter pylori* Physiology and Genetics, Harry L. T. Mobley, George L. Mendz, and Stuart L. Hazell (Eds). ASM Press: Virginia, USA. Disponible en el sitio de red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=advantages,PCR&rid=hp.chapter.4712#4740> [Revisado el 19 de marzo de 2005].

Gray MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, Scott VN, Gombas DE, Boor KJ and Wiedmann M. 2004. *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Humans Form Distinct but Overlapping Populations. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70, No. 10: 5833–5841

Guo X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE. 2000. PCR Detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5248-5252.

Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P and González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México 42:490-495.

Hernández JL, Valdez G, Lagorreta M y Flores JL. 2000. Contaminantes microbiológicos y físicos en frutas y hortalizas. Curso de capacitación sobre Buenas Prácticas Agrícolas. 26 nov-1 dic. Boca del río, Veracruz, Mex. pp: 31-35.

Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, and Echeita MA. 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase 1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 42: No.6: 2581-2586.

Heuvelink AE, Van Den Biggelaar FLAM, Zwartkruis-Nahuis JTM, Herbes RG, Huyben R, Nagelkerke N, Melchers WIG, Monnens LAH, De Boer E. 1998. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. J Clin Microbiol. 36: No. 12: 3480-3487.

Heuvelink AE, Swartkruis-Nahuis JT, Beumer RR and De Boer E. 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. Journal of Food Protection 62: 1115-1122.

Hidaka E, Honda T, Ueno I, Yamasaki Y, Kubo K and Katsuyama T. 2000. Sensitive Identification of Mycobacterial Species Using PCR-RFLP on Bronchial Washings. Am J Respir Crit Care Med. 161:930–934.

Hong, Y., Liu T, Hofacre C, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, and Maurer JJ. 2003. A restriction fragment length polymorphism-based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying *Salmonella* serotypes. Avian Dis. 47:387–395.

Hutchison ML, Nicholson FA, Smith KA, Keevil CW, Moore A. 2000. A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain. HMSO: MAFF Publications. U. K.

Imre A, Olasz F, Nagy B. 2005. Development of a PCR system for the characterisation of *Salmonella* flagellin genes. *Acta Veterinaria Hungarica*. 53: No. 2:163-172.

INFOSAN. 2007. Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas. Disponible en el [sitio de red: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_spinach_Feb06_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_spinach_Feb06_sp.pdf) [Revisado el 14 de marzo de 2007].

Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P and Jiang X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2497–2502.

Kilger G and Grimont PAD. 1993. Differentiation of *Salmonella* Phase 1 Flagellar Antigen Types by Restriction of the Amplified *fliC* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, No. 5: 1108-1110.

Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Korpela JM, Sandholm J and Salminen SJ. 2006. Intrinsic Properties of So-Called Dormant Probiotic Bacteria, Determined by Flow Cytometric Viability Assays. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 72, No. 7: 5132–5134.

Lim Y, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh K, Tamura K, Kim S and Watanabe H. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 151-155.

Löfström C, Knutsson R, Axelsson CE and Peter Radström. 2004. Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, No. 1: 69–75.

Maalej S, Denis M, Dukan S. 2004. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology*. 150: 181–187.

Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CML, Durán VS, López HD, Tenorio GVR. 2005. Identificación de *Salmonella* Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. *Técnica Pecuaria en México*. 2005;43(2):229-237.

Marck C. 1988. "DNA Strider": A "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* 16: 1829-1836.

Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L and Lee MD. 1999. Development of Primers to O-Antigen Biosynthesis Genes for Specific Detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 65, No. 7: 2954–2960.

McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, and Fields PI. 2004. Sequencing and Comparative Analysis of Flagellin Genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* 42: No. 5: 1923-1932.

Mead PS and Griffin PM. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet* 352: 1207–1212.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCraig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.

Moore JE, Murray L, Fanning S, Cormican M, Daly M, Delappe N, Morgan B, Murphy PG. 2003a. Comparison of phenotypic and genotypic characteristics of *Salmonella bredeney* associated with a poultry-related outbreak of gastroenteritis in Northern Ireland. *Journal of Infection* 47: 33–39.

Moore BC, Martinez E, Gay JM and Rice DH. 2003. Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4556–4560.

Mortimer CKB, Peters TM, Gharbia SE, Logan L. MJ, and Arnold C. 2004. Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology.* 4:31

Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, Vol. 11, No. 1: 142–201.

Nakazawa M, Akiba M, Sameshima T. 1999. Swine as a Potential Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases* 5: 833-834.

NOM-109 SSA1-1994. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM -109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-030-ZOO-1995 Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria.

Odumeru. J. A.; Steele, M.; Fruhner, L.; Larkin, C.; Jiang, J.; Mann, E.; and Bruce McNab, W. 1999. Evaluation of Accuracy and Repeatability of Identification of Food-Borne Pathogens by Automated Bacterial Identification Systems. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37. No. 4: 944–949.

Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K and Hara-Kudo Y.2005. Detection of *Salmonella enterica* in Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Characterization of *Salmonella* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71, No. 11: 6730–6735.

Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology* 87: 25-35.

Pan TM, Chen LM, Su YC. 2002. Identification of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR with primers specific to the *hlyA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliC* and *rfb* genes. *J Formos Med Assoc*. 2002 Sep;101(9):661-4. Disponible en el sitio de red: http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12645196&dopt=Abstract [Revisado el 16 de agosto de 2003].

Paton AW and Paton JC. 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 598–602.

Porwollik S, Santiviago CA, Cheng P, Florea L, Jackson S, and McClelland M. 2005. Differences in Gene Content between *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates and Comparison to Closely Related Serovars Gallinarum and Dublin. *Journal of Bacteriology*. Vol. 187, No. 18: 6545–6555.

Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss III R, and Gyles CL. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* 6, 271-279.

Reilly WJ, Forbes GI, Paterson GM and Sharp JC. 1981. Human and animal salmonellosis in Scotland associated with environmental contamination, 1973-79. *Vet. Rec.* 108:553-555.

Rojas HRA y González FT. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica* 31 No. 2: 69-76.

Rogerie F, Marecat A, Gambade S, Dupond F, Beaubois P and Lange M. 2001. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. *International Journal of Food Microbiology* 63: 217–223.

Schlech, W. F. 1998. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31:770–775.

Schroeder CM, White DG, Ge B, Zhang Y, Mcdermott PF, Ayers S, Zhao S, and Meng J. 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology* 85: 197– 202.

Sela S, Nestel D, Pinto R, Nemny-Lavy E and Bar-Joseph M. 2005. Mediterranean fruit fly as a potential vector of bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4052–4056.

SENASICA. 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Guía para el agricultor. Buenas prácticas agrícolas para frutas y hortalizas frescas. SAGARPA. México.

Shaikh, N and Tarr PI. 2003. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: Integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* 185: 3596–3605.

Silva RL, Alvarado GO y Martínez SJP. 1999. La reacción en cadena de la polimerasa como herramienta de diagnóstico en virología vegetal. *Fitopatología* 34 (1): 13-21.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, and Zervos MJ. 2006. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19, No. 3: 512–530.

Smith NH and Selander RK. 1990. Sequence Invariance of the Antigen-Coding Central Region of the Phase 1 Flagellar Filament Gene (*fliC*) among Strains of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. Vol 172, No. 2: 603-609.

Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G and Colin P. 1999. Evaluation of a Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology* 28: 113-117.

Souza V., Castillo A., Rocha M., Sandner L., Silva C.y Eguiarte L.E. 2001. Ecología Evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*. Vol. 26. No. 10: 513-517.

SSA. 2000. Vigilancia Epidemiológica. Serotipos de *Salmonella* spp en alimentos aislados con mayor frecuencia 1990 - 1997. México: Secretaria de Salubridad y

asistencia. Disponible en el sitio de red: http://www.cdc.gov/ncidod/op/food_sp.htm [Revisado el 21 de julio de 2003].

Strachan T, Read AP. 1999. PCR, DNA sequencing and *in vitro* mutagenesis. Human Molecular Genetics 2. Garland Science. Taylor & Francis Group. New York and London. Disponible en el sitio de red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=advantages,PCR&rid=hmg.section.552#569> [Revisado el 5 de noviembre de 2004].

S&TR (Science & Technology Review). 2000. Uncovering Bioterrorism. Disponible en el sitio de red: <http://www.llnl.gov/str/5.00.html> [Revisado el 26 de febrero de 2005].

Swaminathan B, y Matar GM. 1993. Molecular typing methods. Cap 2. In Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. D.H. Persing *et al.* (Eds.). American Society of Microbiology. Washington, D.C. pp: 26-50.

Tang YW, Procop GW and Persing DH. 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clinical Chemistry Vol. 43, No. 11: 2021–2038.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 33, No. 9: 2233–2239.

Thong KL, Puthuchery S, Yassin RM, Sudarmono P, Padmidewi M, Soewandjo E, Handojo I, Sarasombath S, and Pang T. 1995. Analysis of *Salmonella typhi* Isolates from Southeast Asia by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 33, No. 7: 1938–1941.

Van TTH, Moutafis G, Istivan T, Tran LT, Coloe PJ. 2007. Detection of *Salmonella* spp. in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6885-6890.

Viñas MR, Sanz ME, Padola NL, Etcheverría AI, Parma AE. 2000. Escherichia coli verotoxigénica (VTEC): su transmisión por alimentos. Revista de Divulgación y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Volumen 10 - N° 55 - Febrero/Marzo 2000. Disponible en el sitio de red: <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy55/escherichia.htm> [Revisado el 3 de agosto de 2003].

Way JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadegan M, Gerba CP, and Pepper IL. 1993. Specific Detection of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 5: 1473-1479.

WHO. 2000. Programme. FS. Food Safety. An essential Public Health Issue for the New Millennium. Geneva.: World Health Organization, WHO/SDE/PHE/FOS/99.4,

WHO Joint FAO/WHO Food Standards. 2001. Programme, Proposed Draft Guidelines for the Control of *Listeria monocytogenes* in Foods. Technical Report No. Agenda Item 6. Codex Alimentarius Commission.

Wiedmann, M. 2003. ADSA foundation scholar award—an integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. J. Dairy Sci. 86:1865–1875.

Winstanley C, Detsika MG, Glendinning KJ, Parsons YN and Hart CA. 2001. Flagellin gene PCR-RFLP analysis of a panel of strains from *Burkholderia cepacia* complex. J. Med. Microbiol. Vol. 50: 728-731.

Wu Z, Pagano I, Boonmars T, Nakada T, and Takahashi Y. 2003. Intraspecies Polymorphism of *Cryptosporidium parvum* Revealed by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and RFLP–Single-Strand Conformational Polymorphism Analyses. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69, No. 8: 4720–4726.

APÉNDICES

APÉNDICE A

TABLA VIII

Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de *Salmonella* spp.

Gen	Secuencia		Tamaño (pb)	Fuente
	5'	→ 3'		
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA		287	Rahn <i>et al</i> (1992)
		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>fliC</i>	GCACAAGTCATTAATAACAAACAGCC ^a		Aprox.	Dauga <i>et al</i> (1998)
		TTAACGCAGTAAAGAGAGGACG ^b	1500	
<i>sdfI</i>	GTGTTTTATCTGATGCAAGAGG ^c		293	Agron <i>et al</i> (2001)
		GTTCTTCTGGTACTTACGATGA ^d		

^a Se adicionó la secuencia GCA en el extremo 5', ^b se eliminó una guanina en el extremo 3'; ^c se eliminó una timina en el extremo 5', ^d se eliminó una citosina en ambos extremos 5' y 3'.

APÉNDICE B

TABLA IX

Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de *E. coli* O157:H7

Gen	Secuencia		Tamaño (pb)	Fuente
	5'	→ 3'		
<i>rfbE</i>	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG		497	Desmarchelier <i>et al</i> (1998)
	CATTGGCATCGTGTGGACAG			
<i>fliC</i>	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC		625	Gannon <i>et al</i> (1997)
	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC			
<i>stx1</i>	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC		302	Blanco <i>et al</i> (2003)
	CGTGGTATAGCTACTGTCACC			
<i>stx2</i>	CTTCGGTATCCTATTCCC ^a		518	Blanco <i>et al</i> (2003)
	CTGCTGTGACAGTGACAAAACG ^b			
<i>eaeA</i>	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA		1087	Gannon <i>et al</i> (1993)
	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT			

^a se eliminaron dos guaninas en el extremo 3', ^b se eliminó una citosina en el extremo 3'

APÉNDICE C

TABLA X

Relación de iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de *Listeria monocytogenes*

Gen	Secuencia	Tamaño	Fuente
	5' \longrightarrow 3'	(pb)	
<i>hlyA</i>	CATCGACGGCAACCTCGGAGA	420	Fitter <i>et al</i> (1992)
	ATCAATTACCGTTCTCCACCATTC		

APÉNDICE D

TABLA XI

Relación de aislados utilizados para los análisis de PCR-RFLP y PFGE

Origen	Fuente	Número de aislados
Comarca Lagunera y/o Nayarit	Sistema productivo de melón	12
Sinaloa	Sistema productivo Chile Bell	13
Comarca Lagunera	Canales de res	17
Chiapas, Edo.	Aves (pollo o gallina)	32
México, Puebla	Cerdo	1
México	humano	7
IBT-UNAM	Desconocido	7
ATCC	USA	3
CFPPNL	Desconocido	6
Total		98

APÉNDICE E

TABLA XII

Relación de aislados analizados por PCR-RFLP

Aislado	Fuente	Procedencia	Serotipo
Frhuert3	Lavado de fruto melón en huerta 3	CL	S. Typhimurium
Cosech3	Manos cosechador en huerta 3	CL	S. Typhimurium
Frmelon1	Lavado de fruto melón	CL	S. Typhimurium
Frhuert1	Lavado de fruto melón en huerta 1	CL	S. Typhimurium
Frhuert2	Lavado de fruto melón en huerta 2	CL	S. Typhimurium
Aguahuert2	Agua en huerta 2	CL	S. Typhimurium
Aguahuert3	Agua en huerta 3	CL	S. Typhimurium
Riodrena	Agua de río en unión canal-drenaje	CL	S. Typhimurium
Aguahuert1	Agua en huerta 1	CL	S. Typhimurium
Cb39	Lavado fruto chile Bell en empaque	Sinaloa	S. Typhimurium
Aguario	Agua de río tomada del canal	CL	S. Typhimurium
Cb19	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	S. Typhimurium
Cb22	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	S. Typhimurium
Cb5	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Typhimurium
Cb6	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Typhimurium
Cb2	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Typhimurium
Cb3	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Typhimurium
Sa92179	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Typhimurium
Cb1	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Typhimurium
Carbov18	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Styuaem	Ave (pollo o gallina)	UAEM	S. Typhimurium
Carbov16	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov17	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov14	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov15	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov12	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov13	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov10	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov11	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov8	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov9	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov5	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Carbov7	Canal de res	CL	S. Typhimurium
Frmelon2	Lavado de fruto melón	CL	S. Typhimurium
Frmelon3	Lavado de fruto melón	CL	S. Typhimurium
Styphim atcc13311	ATCC 13311	USA	S. Typhimurium
Styphim1	Desconocido	CFPPNL	S. Typhimurium
Humano1	Humano	México	S. Typhimurium
Sparaty atcc9150	ATCC 9150	USA	S. Paratyphi A

Tabla XII (continuación)

Aislado	Fuente	Procedencia	Serotipo
Sworting	Desconocido	IBT-UNAM	S. Wortingthon
Carbov4	Carne de res	CFPPNL	Desconocido
Carbov6	Canal de res	CL	Desconocido
Skentuck	Desconocido	IBT-UNAM	S. Kentucky
Styphi	Desconocido	IBT-UNAM	S. Typhi
Carbov1	Canal de res	CL	Desconocido
Scholera	Porcino	México	S. Choleraesuis
SA15	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Gallinarum/Pollorum
SA92185	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Gallinarum/Pollorum
Humano2	Humano	México	Desconocido
522541	Carne seca de res	CFPPNL	Desconocido
Carbov2	Canal de res	CL	Desconocido
A14	Ave (pollo o gallina)	Avimex	S. Gallinarum/Pollorum
SA92181	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Gallinarum/Pollorum
Cb10	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	S. Enteritidis
Cb17	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	S. Enteritidis
Senteri atcc13076	ATCC 13076	USA	S. Enteritidis
94549	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
SA3160196	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Gallinarum/Pollorum
T26F4	Ave (pollo o gallina)	TP	S. Gallinarum/Pollorum
T26F4A	Ave (pollo o gallina)	TP	S. Gallinarum/Pollorum
A6160196	Ave (pollo o gallina)	Avimex	S. Gallinarum/Pollorum
T16F4	Ave (pollo o gallina)	TP	S. Gallinarum/Pollorum
94517	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
A11F8	Ave (pollo o gallina)	Avimex	S. Gallinarum/Pollorum
92177A	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
92160P	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
931034H	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
92177	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
95755	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
92277	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
92719	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
95773	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
Humano6	Humano	México	S. Enteritidis
Humano7	Humano	México	S. Enteritidis
Humano4	Humano	México	S. Enteritidis
Humano5	Humano	México	S. Enteritidis
Humano3	Humano	México	S. Enteritidis
95773A	Ave (pollo o gallina)	CBVF	S. Gallinarum/Pollorum
Carbov3	Canal de res	CL	Desconocido
SA011B	Ave (pollo o gallina)	SA	S. Gallinarum/Pollorum
S. Stanley	Desconocido	IBT-UNAM	S. Stanley

APÉNDICE F

TABLA XIII

Relación de aislados analizados por PFGE

Aislado	Fuente	Procedencia	Serotipo	Pulsotipo
931034H	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	1
92177	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	1
92277	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	1
92160P	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	2
92177A	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	3
95529	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
94517	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
T26F4	Ave (pollo o gallina)	TP	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
A6160196	Ave (pollo o gallina)	Avimex	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
95580	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
95321	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
92178HBC	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
95568	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
94549	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
SA7125A	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
95773	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	4
SA3160196	Ave (pollo o gallina)	SA	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	5
T26F4A	Ave (pollo o gallina)	TP	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	6
Cb17	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Enteritidis</i>	6
Cb26	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Enteritidis</i>	6
Cb32	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Enteritidis</i>	6
Cb10	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Enteritidis</i>	7
A11F8	Ave (pollo o gallina)	Avimex	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	8
522541	Carne seca de bovino	CFPPNL	<i>S. Enteritidis</i>	9
2AST	Carne de bovino	CFPPNL	<i>S. Enteritidis</i>	10
95773A	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	11
92719	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	11
A14	Ave (pollo o gallina)	Avimex	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	12
SA92185	Ave (pollo o gallina)	SA	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	13
SA15	Ave (pollo o gallina)	SA	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	14
521862	Pasta de pollo	CFPPNL	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	15
94601	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	16
Cb1	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
Cb6	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
Cb3	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
Cb25	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
Cb2	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
Cb5	Agua de canal, Sist. Prod. Chile Bell	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	17
519504	Carne de bovino	CFPPNL	<i>S. Typhimurium</i>	18

TABLA XIII (continuación)

Aislado	Fuente	Procedencia	Serotipo	Pulsotipo
S.tyuaem	Ave (pollo o gallina)	UAEM	<i>S. Typhimurium</i>	19
Cb19	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	20
Cb22	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	20
Cb39	Lavado fruto chile Bell en empaque	Sinaloa	<i>S. Typhimurium</i>	20
95736	Ave (pollo o gallina)	CBVF	<i>S. Typhimurium</i>	21
SA92179	Ave (pollo o gallina)	SA	<i>S. Typhimurium</i>	22
C17	Desconocido	IBT-UNAM	No es Salmonella	
Cb35	Lavado fruto chile Bell en campo	Sinaloa	No es Salmonella	
SA011B	Ave (pollo o gallina)	SA	<i>S. Gallinarum/Pollorum</i>	23
<i>S. Cholera</i>	Porcino	México	<i>S. Choleraesuis</i>	24
C20	Humano	IBT-UNAM	<i>S. Typhi</i>	25
Carbov4	Carne de bovino	CFPPNL	No determinado	26
C39	Desconocido	IBT-UNAM	Desconocido	27
C2	Desconocido	IBT-UNAM	<i>S. Arizonae</i>	28
C15	Desconocido	IBT-UNAM	<i>S. Arizonae</i>	28

RESUMEN BIOGRÁFICO

Miguel Ángel Gallegos Robles

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp.,
Escherichia coli O157:H7 y *Listeria monocytogenes* AISLADOS DE PRODUCTOS
CARNICOS, MELÓN Y CHILE TIPO BELL

Campo de estudio: Biotecnología genómica y agrícola

Datos personales: Nacido en General Cepeda, Coahuila, México, el día 10 de febrero de 1964. Hijo del Prof. Donato Gallegos Malacara y María Guadalupe Robles Zuñiga.

Educación: egresado de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, grado obtenido Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en 1987 con carta de felicitación, Maestro en Ciencias en Fitomejoramiento por la misma Universidad en 1990 con mención honorífica, Maestro en Ciencias en Agricultura Orgánica Sustentable por la Universidad Juárez del Estado de Durango en el 2000 con mención honorífica y primer lugar en aprovechamiento académico de la generación.

Experiencia profesional: Maestro a nivel Licenciatura del Instituto de Ciencia y Cultura A.C. División de Biología, Saltillo, Coahuila, México, enero-diciembre de 1990. Maestro-Investigador de la Facultad de Agricultura y Zootecnia-Universidad Juárez del Estado de Durango, de febrero de 1991 a la fecha.

Artículos Aceptados

Artículo enviado a: JOURNAL OF FOOD PROTECTION

RV: Journal of Food Protection Decision for Manuscript # JFP-08-107R

De: Alberto Morales-Loredo (alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx)



Enviado:

domingo, 01 de junio de 2008 09:09:02 a.m.

Para:

Miguel Angel Gallegos (magallegos@gmail.com); MIGUEL ANGEL GALLEGOS

ROBLES (garoma64@hotmail.com); Fratamico, Pina

(Pina.Fratamico@ARS.USDA.GOV); genoveva alvarez (genovevaa@hotmail.com)

Mensaje reenviado

De: <dloynachan@foodprotection.org>

Responder a: <john.sofos@colostate.edu>

Fecha: Sat, 31 May 2008 20:44:10 UT

Para: <alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx>

CC: <alberto_morales@hotmail.com>

Asunto: Journal of Food Protection Decision for Manuscript # JFP-08-107R

Dear Dr. Morales-Loredo,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal of Food Protection. We will likely make some minor changes in wording, but otherwise plan to publish the revised manuscript as submitted. You will next hear from our printer, Allen Press, regarding galley proofs and other issues in processing.

Information regarding payment of manuscript page charges and ordering reprints will be sent with the galley proofs. Manuscript charges are \$90 for Members of the International Association for Food Protection and \$120 for nonmembers. Review and General Interest papers are \$45 regardless of membership status. The page charge fee is based on the number of typeset pages.

Any additional charges, not normally incurred during publication, such as color figure reproduction, will be charged to the author. Reproduction in color must be requested prior to typesetting. Please contact Didi Loynachan at dloynachan@foodprotection.org regarding color publication or with questions regarding page charges.

IAFP would like to draw your attention to the public database ComBase (www.combase.cc) where peer reviewed data are made accessible to the microbiology research community. ComBase is a free web-based resource containing thousands of data sets that describe microbial responses to food

environments. Much like public databases of gene sequences, the goal of ComBase is to provide the scientific community with an organized repository of relevant data, permitting rapid data retrieval, analysis and model development, thus reducing unwanted redundancy in research efforts.

If your manuscript contains new kinetic or probabilistic data describing microbial responses to the food environment, please go to the ComBase website (www.combase.cc/datasubmission) to determine if they are appropriate for donation and to receive instructions on how to submit your data. The website also provides you with technical assistance.

Thank you for submitting this manuscript to the Journal of Food Protection.

If you did not already do so after submission, please access the copyright form via the following link and return it to the IAFP Office by mail or fax within 24 hours. You may fax the form to 515.276.8655. If faxed, it is not necessary to mail the original.

<<http://foodprotection.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?el=A5CD2yl2B1DAB3G7E9DCmA8MX9XbZdbUIKWcrNAZ>>

Very sincerely,
John N. Sofos
Scientific Editor
john.sofos@colostate.edu

----- Fin del mensaje reenviado

Identification of *Salmonella* Serotypes Isolated from Cantaloupe and Chile Pepper Production Systems in Mexico by PCR–Restriction Fragment Length Polymorphism

MIGUEL A. GALLEGOS-ROBLES,¹ ALBERTO MORALES-LOREDO,^{2*} GENOVEVA ALVAREZ-OJEDA,³ ADRIAN VEGA-P.,⁴ YAZMIN CHEW-M.,⁴ SIXTO VELARDE,⁵ AND PINA FRATAMICO⁶

¹Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Venecia, Gomez Palacio, Durango, C.P. 35000, México; ²INIFAP, Campo Experimental General Terán, Carretera Montemorelos-China Km. 31, General Terán, Nuevo León, México C.P. 67400, México; ³INIFAP, Campo Experimental Sur de Tamaulipas, Carretera Tampico-Mante Km. 55, Estación Cuauhtémoc, México; ⁴INIFAP, Campo Experimental La Laguna, Blvd. Jose Santos Valdez No. 1200, Col. Mariano Matamoros, C.P. 27440, México; ⁵INIFAP, Campo Experimental Valle de Culiacán, Carretera Culiacán-El dorado Km. 17.5 Culiacán, Sinaloa, México; and ⁶U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Microbial Food Safety Research Unit, Eastern Regional Research Center, 600 E. Mermaid Lane, Wyndmoor, Pennsylvania 19038, USA

MS 08-107: Received 28 May 2008/Accepted 31 May 2008

ABSTRACT

A study was conducted in 2006 to determine the prevalence of *Salmonella* spp. on three cantaloupe farms in Matamoros, Coahuila, Mexico, and on one farm that cultivates chile peppers var. Bell in Culiacán, Sinaloa, Mexico. Samples from cantaloupe farms consisted of cantaloupe rinses, irrigation water, water from furrows in the field, and workers' hands. Samples from the chile pepper farm consisted of rinses of chile peppers obtained at the field, pepper rinses obtained at the packing house, and irrigation water from the field. A total of 55 samples were obtained from both production systems. Twelve and 10 samples from the cantaloupe and chile pepper production systems, respectively, tested positive for *Salmonella* according to a traditional culture method. The difference between the proportion of *Salmonella*-positive samples from the cantaloupe production system (12 of 28 = 0.43) and the chile pepper production system (10 of 27 = 0.37) was not statistically significant ($P > 0.05$). Results from a PCR–restriction fragment length polymorphism (RFLP) method based on the *fliC* gene to determine the serotype of the isolates showed that *Salmonella* Typhimurium was the only serotype found associated with the cantaloupe production system, whereas both *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis serotypes were found associated with the chile pepper production system. Results showed that 91 (20 of 22) and 9% (2 of 22) of the isolates from both agricultural systems matched with the *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis reference strain restriction profiles, respectively. This study demonstrates the utility of the PCR-RFLP technique for determining the serotypes of *Salmonella* isolates obtained from cantaloupe and chile pepper production systems.

**Artículo enviado a: REVISTA CIENTÍFICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA,
VENEZUELA**



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Revista Científica



RC-144/2007

Maracaibo 20 noviembre 2007

Ciudadanos
Miguel Gallegos
Alberto Morales
Genoveva Álvarez
Jesús Vásquez
Lilia Morales
Irma Martínez
Jesús Maldonado
INIFAP

Por medio de la presente, nos dirigimos a Uds. Con el objeto de remitirles en anexo, el Informe del Editor, sobre el Trabajo Intitulado:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Escherichia coli*
O157:H7 OBTENIDOS DE CANALES DE BOVINOS Y PORCINOS**

Tomando en consideración el resultado de los arbitrajes practicados, el referido trabajo, es **PUBLICABLE CON LIGERAS MODIFICACIONES**, según los argumentos emitidos por los árbitros seleccionados y el Editor, que sustentan dicha decisión y que se encuentran descritas en el texto e Informe anexo.

Sin más a que hacer referencia.

Atentamente.

Prof. Mario Pérez Barrientos
Jefe Editor



c.c.
Archivo

“60 años siendo ciencia y conciencia de la sociedad”

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* O157:H7 EN
CANALES DE BOVINOS Y PORCINOS MEDIANTE PCR**
**Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates Obtained from Bovine and
Porcine Carcasses.**

**Miguel Gallegos¹, Alberto Morales², Genoveva Álvarez², Jesús Vásquez³, Lilia Morales⁴, Irma
Martínez⁴, Jesús Maldonado⁵**

¹ Facultad de Agricultura y Zootecnia-Universidad Juárez del Estado de Durango. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) hasta 31 de diciembre del 2007, actualmente Consorcio Técnico del Noreste, A. C. UGRNL. Teléfono y Fax: 01 81 83674487 Ext. 132. Correo-e: alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx. Km 4.5 carretera a Reynosa, Guadalupe, N. L. México ³ Facultad de Ciencias Químicas-UJED. ⁴ Facultad de Ciencias Biológicas UANL. ⁵ Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Núcleo “Héctor Ochoa Zuleta”, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Venezuela.

RESUMEN

Muchos de los brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7 se han asociado al consumo de carne bovina mal cocida, pero también se ha reportado su presencia en la carne de otros animales domésticos. En México existe poca información sobre la presencia de este patógeno en canales de res y de cerdo. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en canales de res y cerdo y su caracterización mediante PCR. De un total de 18 aislados, 12 fueron positivas por PCR para los genes *rfbE* y *fliC* que determinan el serotipo O157:H7. De estos 12, uno de canal de res y tres de canales de cerdo fueron positivos por PCR para los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, por lo que fueron considerados como enterohemorrágicos. Las diferencias encontradas en el número de canales positivas para los genes caracterizados no fueron estadísticamente significativas, y los resultados señalan que *E. coli* O157:H7 puede ser encontrada en ambos tipos de canal, representando un riesgo para la salud, por lo que se deben tomar medidas más estrictas de higiene y manejo para evitar que canales que no cumplan con el carácter de inocuidad lleguen a los consumidores finales.

Palabras clave: Bovinos, cerdos, *E. coli* O157:H7, enterohemorrágica, caracterización molecular, PCR

Artículo enviado a: JOURNAL OF FOOD SCIENCE

----- Mensaje reenviado

De: <catherine.donnelly@uvm.edu>

Fecha: Wed, 1 Oct 2008 14:11:01 -0400 (EDT)

Para: <alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx>, <alberto_morales@hotmail.com>

CC: <jfs@ift.org>

Asunto: Acceptance of Journal of Food Science MS # JFS-2008-0484.R1

01-Oct-2008

Dear Dr. Alberto Morales-Loredo:

We are pleased to inform you that your manuscript, "PCR Detection and Microbiological Isolation of Salmonella spp. From Fresh Beef and Cantaloupes," (JFS-2008-0484.R1) has been accepted for publication in the Journal of Food Science, PENDING:

(1.) You must completely fill out the Copyright Assignment Form, located in the "Instructions and Forms" resource page on Manuscript Central and fax to JFS Editorial Office at 312-596-5676 or email the scanned form as an attachment to jfs@ift.org.

JFS form:

<http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jfs/JFS%20New%20Copyright%20Assignment%20Form.pdf>

JFSE form:

<http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jfs/JFSE%20New%20Copyright%20Assignment%20Form.pdf>

CRFSFS form:

<http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jfs/CRFSFS%20New%20Copyright%20Assignment%20Form.pdf>

(2.) We will use the files you already uploaded for this accepted version of your manuscript for production, unless you send updated files before or on the same day as your copyright form. If there are any problems with your files, Amanda Ferguson will contact you.

IF *MINOR* CHANGES ARE TO BE MADE AFTER MANUSCRIPT HAS BEEN ACCEPTED, YOU MAY MAKE THE CHANGES WHEN YOU RECEIVE YOUR PAGE PROOFS.

A few comments of the Editor follow and, if applicable, please take appropriate action.

Editor's Comments to Author:

Associate Editor: Jackson, LeeAnne
Comments to the Author:
(There are no comments)

Please note that, to avoid delays in publication, it is YOUR responsibility to make sure that the complete text, and all figures and tables are submitted.

During the latter part of the production process -- which should take about 3 months -- you will receive an email with a link to download PDF files of your page proofs. After you approve the page proofs you will receive an email with your page charge invoice, if applicable. There are no page charges for IFT members.

We greatly appreciate your choice of the Journal of Food Science as an outlet for your fine work.

Sincerely,
Dr. Catherine Donnelly
Scientific Editor, Journal of Food Science

=====
This letter was generated automatically from
IFT's ManuscriptCentral™ by ScholarOne.
<http://mc.manuscriptcentral.com/jfs>

PCR Detection and Microbiological Isolation of *Salmonella* spp. From Fresh Beef and Cantaloupes

M. A. GALLEGOS-ROBLES¹, A. MORALES-LOREDO^{2*}, G. ÁLVAREZ OJEDA³, J. A. OSUNA-GARCÍA³, I. O. MARTÍNEZ-VÁZQUEZ⁴, L. H. MORALES-RAMOS⁴, P. FRATAMICO⁵

¹*Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Venecia, Gomez Palacio, Durango, México C. P. 35000,*

²*Consortio Técnico del Noreste de México, A. C.-UGRNL. C.P. 67100*

³*Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Guadalupe, Nuevo León, México. CP. 67100*

⁴*Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México*

⁵*USDA, Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, 600 E. Mermaid Lane, Wyndmoor, PA 19038 USA*

*Corresponding author: Tel. and Fax: 01 81 83674487 Ext. 132. E-mail: alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx.

Short Title: Detection of *Salmonella* spp. in food...

Journal section: Food Microbiology and Safety

**Journal of Food Science
For Peer Review**

ABSTRACT

Species belonging to the genus *Salmonella* are an important cause of enteric fevers, gastroenteritis, and septicemia, and the pathogens are commonly transmitted through contaminated food. In this study, PCR amplification of a 287-bp region of the *invA* gene was compared to a microbiological technique to determine the presence of *Salmonella* in retail beef and in cantaloupe rinse samples. Both methods showed the same level of sensitivity, detecting 1 CFU/25 g of meat after enrichment for 24 h at 42°C. The presence of *Salmonella* was determined in 50 commercial top sirloin beef samples that were not artificially inoculated. Three samples were positive by the microbiological method, and these same three samples and an additional sample were positive by the PCR. Both methods were also used to test surface rinses of cantaloupes collected from 4 farms in Nayarit, Mexico. *Salmonella* was detected by the microbiological method in nine of 20 samples (45%), whereas the pathogen was detected by the PCR in 11 samples (55%). This study demonstrates the utility of the PCR targeting the *invA* gene to determine the presence of *Salmonella* spp. in beef and cantaloupe samples.

Key words: *Salmonella*, detection, PCR, meat, cantaloupe

ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901