



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“INCIDENCIA DE *Salmonella spp* EN CANALES DE POLLO PROVENIENTES DE UN RASTRO Y DISTRIBUIDORAS DE AVES, DETECTADA MEDIANTE CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y PCR”

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB. NANCY MAGALY NONOAL ZACAMO

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. FABIOLA AVELINO FLORES

ASESOR INTERNO:

M.C. OSCAR PÉREZ TORIZ

DICIEMBRE 2016

AGRADECIMIENTOS



Quiero expresar mi agradecimiento:

A las Dras. del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP, BUAP; D.C. Edith Chávez Bravo por las lecciones, apoyo, y ánimos que siempre ha estado dispuesta a compartir., D.C. Elsa Iracena Castañeda Roldan por siempre recibirme con la sonrisa y amabilidad que la caracteriza. Y de manera muy especial a la D.C Fabiola Avelino Flores bajo cuya dirección se ha realizado este trabajo, por sus enseñanzas, su paciencia, la confianza depositada en mí, por haberme dado la oportunidad de desarrollarme en el campo de la microbiología de los alimentos y por poder contar con su cariño... Gracias por haber creído en mí desde el primer momento.

A mi asesor de tesis M.C. Oscar Pérez Toriz, mil gracias por todo su apoyo, sugerencias y sobre todo por su disposición para sacar adelante este trabajo; gracias por haber confiado en mis capacidades, esperando haber podido estar a la altura; así también le agradezco el haberme brindado su tiempo para recibirme durante el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales D.C. Elsa Iracena Castañeda Roldan, M.C. Alejandro Ruiz Tagle y M.C. Patricia Suarez Albores por todas sus correcciones, sugerencias y por cada una de sus valiosas lecciones, mil gracias por todo su tiempo para la revisión de esta tesis.

A Sthephany, Gisela y Jorge, por ser mis mejores amigos y parte importante en las diferentes etapas de mi vida, por estar para mí cada vez que los necesitaba, por apoyarme, animarme y creer siempre en que podía dar más, por soportar mis locuras, ocurrencias y malas ideas, simplemente gracias por nunca dejarme caer.

A Karen Báez Moreno por toda su ayuda, apoyo y tiempo brindados en este proyecto, por acompañarme hasta el último momento, por cubrirme las espaldas siempre que fuera necesario y ser de las pocas personas que logran entender.

A Clau, Katherine, Erika, Less y al resto de mis compañeros del Laboratorio de Patogenicidad, que siempre me han dado una mano cuando ha sido necesario y con los que tan divertidos momentos, cumpleaños y celebraciones hemos tenido.

A Edson, por estar siempre ahí, haber formado parte importante de esta historia, y haberme acompañado y animado a siempre seguir adelante.

A los buenos amigos, José Antonio, Andrea, Laura, Irene, Renato por su compañía, su apoyo, ayuda y a su infinita paciencia para estar en las buenas y en las malas. Hector, gracias por ser como eres y haber de hecho de este último año uno de los más divertidos. Erica por apoyarme en los momentos más difíciles y haberme motivado a seguir.

A todos y cada uno de mis profesores quienes dejaron plasmado en mi un poco de sus conocimientos y lecciones de vida.

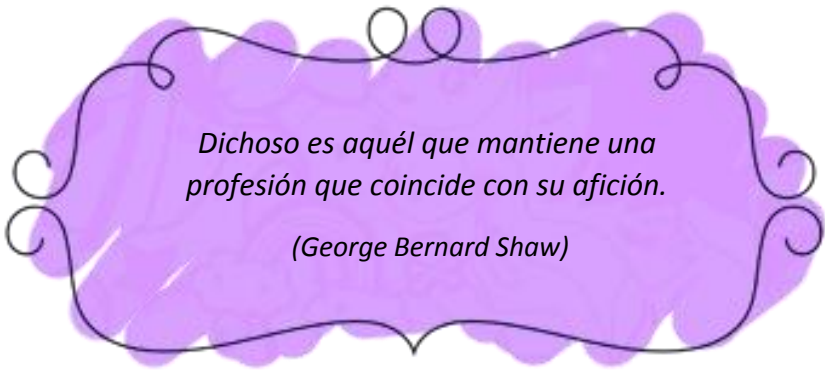
A todos aquellos compañeros con los que he compartido, me han recibido de la mejor forma y han dejado enseñanzas valiosas en mi persona.

A mi familia, por creer en que podía lograrlo.

Final y principalmente, a mis padres, por ser mi mayor apoyo.

A todos sencillamente gracias.

El presente trabajo ha sido financiado gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por su apoyo al proyecto “INCIDENCIA DE *Salmonella spp* EN CANALES DE POLLO PROVENIENTES DE UN RASTRO Y DISTRIBUIDORAS DE AVES, DETECTADA MEDIANTE CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y PCR (II parte)”.



*Dichoso es aquél que mantiene una
profesión que coincide con su afición.*

(George Bernard Shaw)

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	10
2	INTRODUCCIÓN.....	11
3	MARCO TEÓRICO	12
3.1	El pollo como alimento	12
3.2	Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	13
3.3	Inocuidad Alimentaria.....	13
3.4	Microorganismos indicadores de calidad	14
3.4.1	Bacterias mesofílicas aerobias	14
3.4.2	Coliformes totales.....	15
3.4.3	Coliformes fecales.....	15
3.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.5	Microorganismos patógenos	16
3.5.1	Género <i>Salmonella</i>	16
3.5.2	Características de <i>Salmonella</i>	16
3.5.3	Hábitat y Reservorios.....	17
3.5.4	Estructura antigénica y determinantes de virulencia.....	17
3.5.5	Transmisión por alimentos	18
3.6	Gen <i>inv A</i>	18
3.7	PCR.....	19
3.8	Electroforesis en gel de agarosa	20
3.8.1	Gel de agarosa	21
3.8.2	Factores que afectan la electroforesis.....	21
4	MARCO REFERENCIAL	23
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
6	JUSTIFICACIÓN	26
7	OBJETIVOS.....	28
7.1	General.....	28
7.2	Particulares	28
8	METODOLOGÍA	29
8.1	Cepa control y medios de cultivos.....	29
8.2	Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen <i>inv A</i>	29

8.3	Selección de distribuidoras muestreadas	29
8.4	Toma de muestra	32
8.5	Extracción de ADN bacteriano de la muestra	32
8.5.1	Obtención del botón directo de la muestra	32
8.5.2	Extracción de ADN con el kit.....	33
8.5.3	Electroforesis en gel de agarosa y visualización de ADN extraído con el kit	34
8.5.4	PCR punto final: amplificación del gen <i>inv A</i>	35
8.5.5	Visualización de los amplicones.....	36
8.6	Procesamiento microbiológico	36
8.6.1	Determinación de microorganismos indicadores en pollo por método microbiológico 36	
8.6.2	Detección de <i>Salmonella</i> mediante el kit “ <i>Salmonella</i> detection” (Mississippi State University).....	38
8.6.3	Determinación de <i>Salmonella spp</i> en pollo por método microbiológico	39
8.6.4	Identificación bioquímica.....	39
8.6.5	PCR de colonia (prueba confirmatoria)	39
9	RESULTADOS.....	40
9.1	Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen <i>inv A</i>	40
9.2	Extracción de ADN bacteriano de la muestra	40
9.2.1	Obtención del botón directo de la muestra	40
9.2.2	Extracción de ADN con el kit.....	40
9.2.3	PCR punto final: amplificación del gen <i>inv A</i>	41
9.3	Análisis microbiológico	43
9.3.1	Determinación de microorganismos indicadores en pollo por método microbiológico 43	
9.3.2	Detección de <i>Salmonella</i> mediante el kit “ <i>Salmonella</i> detection” (Mississippi State University).....	49
9.3.3	Determinación de <i>Salmonella spp</i> en pollo por método microbiológico	49
9.3.4	Comparación de los indicadores de calidad entre las muestras de pollo obtenidas del rastros y de las distribuidoras	50
10	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
11	CONCLUSIONES.....	55
12	BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación de la SPI1 en <i>S. enterica</i>	19
FIGURA 2. Componentes implicados en una PCR.....	20
FIGURA 3. Mapa de la ciudad de Puebla, donde se muestra y se señala la ubicación de las distribuidoras muestreadas, observándose una mayor concentración en la Central de Abastos..	30
FIGURA 4. Mapa de la Central de Abastos en la ciudad de Puebla, donde se muestra la ubicación de las distribuidoras muestreadas.	30
FIGURA 5. Diagrama general de trabajo.....	31
FIGURA 6. a) Toma de trozos de carne y piel de las canales para la suspensión (25g de muestra de pollo en 225 mL de caldo BHI). b) Alícuota de 50 mL en tubo cónico, después de la incubación durante 3 horas a 37°C. c) Residuo de grasa de la alícuota después de la centrifugación.. ..	33
FIGURA 7. Procedimiento general de la extracción de ADN con el kit Quick-gDNA MiniPrep.	34
FIGURA 8. Diagrama modificado para la determinación del NMP de coliformes totales y fecales.	37
FIGURA 9. Kit “ <i>Salmonella</i> detection”, tubos pre-llenados con medio MB2 (10 mL).	38
FIGURA 10. Se observan los amplicones de 280-300 pb del gen <i>inv A</i> , L1) Marcador de ADN de 100 pb, L2) <i>S. enterica</i> Enteritidis, L3) <i>S. enterica</i> Typhimuirium 129, L4) <i>S. enterica</i> Typhi, L5) <i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC-14028, L6) <i>S. enterica</i> Montevideo, L7) <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, L8) <i>S. enterica</i> Anatum.	40
FIGURA 11. Verificación de la obtención de ADN de las muestras obtenidas por medio del kit Quick-gDNA MiniPrep.	41
FIGURA 12. Visualización de los amplicones obtenidos por reacción de PRC para el gen <i>inv A</i> a partir de ADN obtenido de la muestra directa. L1) Marcador, L2) Control positivo, L3-L8) Muestras 1 – 6, L9) Control negativo.	41
FIGURA 13. Se detectó molecularmente a <i>Salmonella</i> en el 8% (1/12) de las distribuidoras de carne de pollo.	42
FIGURA 14. Amplificación del gen <i>inv A</i> directamente del ADN extraído de las muestras de pollo. L1) Marcador de ADN de 100 pb, L2) Amplicón de <i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC-14028, L3-L9) amplicones de muestras provenientes de las distribuidoras, L10) control negativo.	42

FIGURA 15. Gráfica de los promedios y desviaciones estándar de las muestras obtenidas del rastro para BMA.	43
FIGURA 16. Gráfica de los promedios y desviaciones estándar de las muestras de pollo obtenidas de las distribuidoras de la ciudad de Puebla de la cuantificación de BMA.	44
FIGURA 17. Resultados de la determinación de coliformes totales y fecales en el rastro de Zacatlán de todas las muestras analizadas en los tres muestreos.....	45
FIGURA 18. Resultados de la determinación de coliformes totales y fecales en las distribuidoras de la ciudad de Puebla de todas las muestras analizadas.	45
FIGURA 19. a) Crecimiento de colonias características de <i>S. aureus</i> en agar Baird Parker, después de 48 horas de incubación a 35°C. b) Confirmación de <i>S. aureus</i> coagulasa (+).	46
FIGURA 20. Gráfica de los promedios de las muestras obtenidas del rastro para <i>S. aureus</i>	47
FIGURA 21. Gráfica de los promedios de las muestras obtenidas de las distribuidoras de la ciudad de Puebla para <i>S. aureus</i>	47
FIGURA 22. Gráfica las distribuidoras muestreadas que cumplieron con los tres parámetros establecidos por las normas.	48
FIGURA 23. a) Tubos del kit “ <i>Salmonella</i> detection” que presentan resultado negativo. b) Tubos del Kit “ <i>Salmonella</i> detection” que presentan fondo amarillo: resultado positivo.....	49
FIGURA 24. Visualización de los amplicones obtenidos por reacción de PCR de colonia para el gen inv A a partir de ADN obtenido de las colonias presuntivas de <i>Salmonella</i> por el método microbiológico. L1) Marcador, 2) Control positivo, L3-L9) 1VB. 1SB. 2SB. 3VB. 3SB. 4SB. 6SB, L10) Control negativo.	50
FIGURA 25. Comparación de los porcentajes de las muestras dentro y fuera de norma entre el rastro y las distribuidoras.	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Iniciadores empleados para la identificación de especies de <i>Salmonella spp</i>	35
TABLA 2. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR punto final para la amplificación del gen <i>inv A</i>	35

1 RESUMEN

La gastroenteritis causada por *Salmonella* se denomina salmonelosis. La salmonelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica causada por bacterias del género *Salmonella* que tiene como principal reservorio aparato gastrointestinal de las aves. El alto consumo de carne de pollo en el estado de Puebla representa un importante vehículo de transmisión de la salmonelosis, que debe ser monitoreado de forma rápida y eficaz, características ofrecidas por la PCR, por ello, el objetivo general de este trabajo fue determinar la incidencia de *Salmonella spp* en canales de pollo provenientes de un rastro y distribuidoras de aves, mediante cultivo microbiológico y PCR de punto final.

Para la estandarización de la PCR se utilizaron 12 cepas de *Salmonella enterica* de diferentes serovariedades, dos cepas de *Escherichia coli* (EHEC y EPEC), una de *Enterobacter cloacae* y otra de *Citrobacter*, para garantizar la exclusividad del amplicón. Se analizó un total de 51 canales de pollo, 15 provenientes del rastro ubicado en Zacatlán de las Manzanas y 36 de las distribuidoras de la ciudad de Puebla. Mediante suspensión de trozos de carne y piel, en caldo BHI; incubándose por 3 horas, se alicuotó y centrifugó 50 mL a 1500 rpm por 5 minutos, se decantó y repitió hasta eliminar la grasa. El sobrenadante se separó y centrifugó a 7000 rpm/10 minutos, del botón restante se extrajo ADN, y una vez comprobada su existencia por medio de electroforesis en gel de agarosa, se realizó la PCR amplificándose el gen *inv A*, empleando reacciones de PCR de 25 µL. Se visualizaron los amplicones por electroforesis en gel de agarosa, el marcador molecular de ADN fue de 100 pb y como control positivo ADN de la cepa *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028. Para la parte microbiológica se realizaron las pruebas en base a las normas oficiales mexicanas para; bacterias mesofilicas aerobias, *S. aureus*, coliformes totales y fecales, así como *Salmonella* para su aislamiento y posterior confirmación por PCR.

Se estandarizó la técnica de PCR para la detección de *Salmonella spp* en carne de pollo. La incidencia de *Salmonella spp* determinada en canales de pollo provenientes del rastro y distribuidoras de aves por medio de PCR punto final fue de 3.92% mientras que por cultivo microbiológico fue de 0%.

2 INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis causada por *Salmonella* se denomina salmonelosis. La salmonelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica que afecta a seres humanos y animales, es causada por bacterias de la especie *Salmonella*. Esta enfermedad se encuentra en todo el mundo y es considerada un importante problema de salud pública. Las aves están involucradas en la transmisión, debido a que una vez que están infectadas con el microorganismo en su sistema digestivo, pueden eliminarlo y contaminar los huevos cuando pasan a través de la cloaca, así también, la carne durante la manipulación (Herrera, 2015).

La falta de conocimiento sobre las Buenas Prácticas Higiénicas, así como la escasa disponibilidad de información sobre las ETA repercute negativamente en la manipulación y preparación de los alimentos, tanto a nivel familiar como comercial. Esta carencia de conocimientos técnicos básicos sobre la inocuidad por parte de quienes preparan alimentos, se puede considerar como uno de los factores que más contribuyen a la contaminación alimentaria, donde de manera indirecta se ven mayormente afectados los grupos más vulnerables a enfermarse como los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Kopper *et al.*, 2009).

Algunos de los síntomas de esta enfermedad son náuseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea, fiebre y cefalea. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre seis y 72 horas (generalmente 12 a 36 horas) después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre dos y siete días (OMS, 2013). Los alimentos relacionados son carnes crudas, pollo, huevos, leche, derivados lácteos, pescados, salsas, cacao y chocolate (Muñoz, 2014).

El alto consumo de carne de pollo en el estado de Puebla representa un importante vehículo de transmisión de la salmonelosis de los reservorios al hombre, debido a ello, en este trabajo fueron muestreados un rastro y distribuidoras de aves, para el estudio de canales de pollo y detección de especies de *Salmonella* por cultivo microbiológico y PCR, esto con la finalidad de tener una noción de la calidad microbiológica de las aves destinadas al consumo humano y potenciales transmisores de la enfermedad a otros animales.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 EL POLLO COMO ALIMENTO

En nuestros días se ha evidenciado la importancia de una alimentación balanceada para mantener nuestra salud y prevenir enfermedades, en lo cual la calidad de los alimentos, su cantidad, así como los hábitos higiénicos durante la preparación para su consumo, tienen un gran impacto en beneficio del consumidor.

La carne de pollo forma parte de la alimentación humana al contar con los nutrientes necesarios para el crecimiento, desarrollo y funcionamiento óptimo de nuestro organismo.

Actualmente la conservación del pollo se realiza de dos maneras (NMX-FF-080-SCFI-2006):

- Pollo fresco: Es aquel que ha sido procesado y mantenido a una temperatura entre 0°C y 4°C durante 1 a 3 días posteriores a su sacrificio.
- Pollo congelado: Es aquel que ha sido procesado, sometido a congelación y mantenido a una temperatura de -18°C o por debajo de esta.

Mientras que para su comercialización puede tratarse como (NMX-FF-080-SCFI-2006):

- Pollo entero: El cual fue sacrificado, desangrado y desplumado que aún mantiene todas sus partes, incluyendo vísceras.
- Pollo en canal: Es el que ha sido sacrificado, desangrado y desplumado al cual se le ha quitado la cabeza, el pescuezo, el buche, las patas y las vísceras abdominales y torácicas, a excepción del corazón y riñones.
- Pollo troceado: El cual fue sacrificado, desangrado, desplumado y eviscerado para finalmente ser dividido en piezas para su venta.

El pollo es susceptible a contaminación directa o cruzada desde su sacrificio, procesamiento y punto de venta, e inclusive durante la manipulación para su preparación final, por lo tanto, este producto puede llegar a representar un importante problema para la salud de los consumidores al ser uno de los principales medios transmisores de las enfermedades transmitidas por alimentos.

3.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

A nivel mundial *Campylobacter spp* y *Salmonella spp* son las causas más comunes de enfermedades de transmisión alimentaria bacteriana en varios países, y los productos avícolas son los principales vehículos de transmisión a los seres humanos (Ellingson *et al.* 2004).

Estas enfermedades se originan por ingestión de alimentos contaminados en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Kooper *et al.*, 2009). Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido y por lo general no son graves y se resuelven espontáneamente en un plazo de dos a cinco días. Los signos más comunes son vómitos y diarreas pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble entre otros (Muñoz, 2014).

Ciertas ETA son capaces de generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte; se pueden manifestar de diversas formas y se debe distinguir entre infección alimentaria e intoxicación (Kooper *et al.*, 2009).

Frecuentemente se asocia a *Salmonella* con enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo unas de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos.

Por todo lo expuesto anteriormente se requiere que los alimentos cubran las expectativas de inocuidad alimentaria para no constituir un riesgo para la salud.

3.3 INOCUIDAD ALIMENTARIA

De manera muy sencilla, puede referirse a la inocuidad alimentaria como el conjunto de condiciones y medidas necesarias tomadas que van desde la producción de un alimento hasta su consumo, cuyo objetivo es producir alimentos seguros o inocuos, por lo que estos deben estar libres de contaminación por bacterias, virus, parásitos, hongos, sustancias químicas o agentes físicos externos (OMS, 2015).

Como es imposible hacer la determinación de todos los microorganismos presentes en los alimentos, se busca una estrategia para poder hacer un análisis microbiológico representativo de la carga microbiana presente en el alimento, por lo que se recurre a las determinaciones de los grupos de microorganismos indicadores.

3.4 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD

En este grupo, se utiliza no solo a los microorganismos, sino también a los productos de su metabolismo, y se califican como tal a aquellos que sugieren o se asocian con un antecedente que compromete la calidad sanitaria (Fernández, 2000), por lo que advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementa el riesgo de presencia de microorganismos patógenos en alimentos.

Entre sus aplicaciones incluye la evidencia o posibilidad de estar asociados con (Fernández, 2000):

- La frescura de un producto.
- La presencia de patógenos o sus toxinas.
- La idoneidad de una materia prima.
- La vida de anaquel de un producto.
- Una contaminación humana.
- La eficiencia de procesos antimicrobianos.
- Violaciones a prácticas sanitarias de operación o distribución.

Los grupos microbianos indicadores de mayor aplicación en los alimentos son las bacterias mesofílicas aerobias, los organismos coliformes totales y fecales, *E. coli*, hongos y levaduras, bacterias psicrótrofas, termodúricos, termófilos, proteolíticos y lipolíticos, osmotolerantes y acidúricos (Fernández, 2000).

3.4.1 Bacterias mesofílicas aerobias

Dentro de este grupo puede encontrarse al número mayoritario de bacterias, tomando en cuenta que no se trata del número total de microorganismos presentes, abarcando así

microorganismos que pueden ser o no patógenos, con temperaturas de crecimiento entre $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 48 ± 2 h en presencia de oxígeno (Fernández, 2000).

3.4.2 Coliformes totales

Los organismos coliformes se definen como bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las primeras 48 h de incubación a 35°C (Fernández, 2000).

En los alimentos, los coliformes adquieren un significado diferente a cuando se encuentran presentes en agua (contaminación fecal reciente), debido a ciertos factores que los afectan, como lo son:

Su capacidad de multiplicarse en los alimentos, la operación de fuentes no fecales de contaminación y a la presencia de coliformes residuales en el equipo y utensilios higienizados incorrectamente en plantas y servicios de alimentos (Fernández, 2000).

3.4.3 Coliformes fecales

Este grupo de bacterias está definido por bacilos Gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas dentro de las primeras 48 h de incubación y que tienen la capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas a temperaturas de $44 \pm 2^\circ\text{C}$ (44.5°C) (Fernández, 2000).

3.4.4 *Staphylococcus aureus*

Células esféricas Grampositivas de 0.8 a 1.2 μm de diámetro. No esporulado e inmóvil, catalasa positiva y otras enzimas relacionadas con la patogenicidad: lipasa, fibrolisina, hemolisina, gelatinasa, coagulasa, fosfatasa, lecitinasa, termonucleasa, leucocidina, colagenasa, estafiloquinasa y hialuronidasa. Se recupera fácilmente a partir de alimentos de origen animal crudos o cocinados, especialmente entre aquellos que requieren manipulación estrecha para su preparación. Se trata de una bacteria exotoxigénica; es decir, que la toxina que provoca la enfermedad se genera y libera en el alimento como consecuencia del desarrollo del microorganismo, cabe mencionar que no todas las cepas de *S. aureus* parecen ser capaces de producir la enterotoxina, por lo que el hallazgo de la bacteria en el alimento

no implica el mismo tipo de riesgo que con los microorganismos patógenos. (Fernández, 2000).

3.5 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Son aquellos microorganismos que se encuentran presentes en el alimento y que son capaces de producir daño al consumidor (Madigan *et al.*, 2009), entre los principales se encuentran a *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* (*E. coli*) patogénica, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* y bacterias del género *Salmonella* (Fernández, 2000).

3.5.1 Género *Salmonella*

El género *Salmonella* se compone de dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*.

Salmonella enterica se subdivide, a su vez, en seis subespecies: Enterica (I), Salamae (II), Arizonae (IIIa), Diarizonae (IIIb), Houenae (IV), e Indica (VI). Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente. En la actualidad se conocen más de 2500 serovares (Levin R. *et al.* 2009; Figueroa *et al.* 2005).

Al hablar de *Salmonella* como posible riesgo de infección por el consumo de productos de origen animal, se debe hacer referencia a *S. enterica* Typhimurium y *S. enterica* Enteritidis, los cuales causan la mayoría de los brotes que afectan a las personas, y constituyen uno de los principales problemas en muchos países (Jarquin *et al.* 2009).

Las subespecies de *S. enterica* son consideradas de importancia clínica y en esta subespecie se incluye a los patógenos asociados con la fiebre tifoidea: *S. enterica* serovar Typhi, siendo la única que tiene como reservorio específico al hombre.

S. bongori se asocia generalmente con el medio ambiente o los reptiles y no se consideran clínicamente importante.

3.5.2 Características de *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos, Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Su tamaño oscila de 0,3 a 1 µm

x 1,0 a 6,0 μm . Son bacterias móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. enterica* Gallinarum y *S. entérica* Pullorum (Linder, 1995) con una diversa composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, más recientemente designados como serovares (Fernández, 2000).

Capaces de producir ácido sulfhídrico (H_2S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada (fermentadoras de glucosa), pero no lactosa, no producen ureasa, son también catalasa positivo y oxidasa negativo. Crecen bien a temperatura ambiente, si bien su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 37°C , su intervalo de pH de crecimiento se haya comprendido entre los valores 4.1 y 9.0 multiplicándose, por lo tanto, en alimentos de baja acidez (Frazier, 1993).

3.5.3 Hábitat y Reservorios

Su hábitat natural es el aparato gastrointestinal de los animales, incluyendo el hombre, nunca como microbiota normal (Fernández, 2008). El principal reservorio de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado vacuno y el porcino; por lo tanto, son fuentes de infección importantes las carnes de estos animales y los huevos (Arias *et al.* 1996).

Es una bacteria que se libera al medio ambiente cuando se le expulsa por las heces, propagándose de un animal a otro. Puede sobrevivir y multiplicarse en materiales con los que está en contacto. Fuera del cuerpo humano y de los animales se ve afectada por la humedad ambiental, la temperatura, agentes germicidas y la composición de los materiales en que se encuentra (Murray *et al.*, 2006; Koneman *et al.*, 2001; Fernández, 2008).

3.5.4 Estructura antigénica y determinantes de virulencia

El género *Salmonella* tiene una estructura antigénica similar al resto de enterobacterias, con tres tipos de antígenos:

1. Antígeno somático (O, de naturaleza lipopolisacarida).
2. Antígeno flagelar (H, proteínas).
3. Antígeno capsular o de envoltura Vi o K (Específico para *Salmonella typhi*, *dublin*, y *paratyphi C*) (García, 2014).

3.5.5 Transmisión por alimentos

Salmonella puede llegar al alimento por contaminación fecal de manipuladores de alimentos o por contaminación cruzada por medio de superficies contaminadas. Los animales para producción de alimentos como pollos, cerdos y vacas, pueden contener *Salmonella* y transmitir la bacteria a alimentos frescos como huevo, carne y productos lácteos.

Es común encontrar *Salmonella* en cremas, pasteles, merengues, tartas y otros productos hechos con huevo sin cocinar. Alimentos cárnicos como pasteles de carne, salchichas curadas pero crudas, derivados de carne de pollo y leche (Madigan *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2006). Así también, en los rastros y obradores de carne de especies de aves y animales mayores, es inevitable (aunque reducible) la contaminación por *Salmonella* de las canales y el producto fraccionado (Fernández, 2000).

3.6 GEN *INV A*

Salmonella spp ha desarrollado una gran variedad de mecanismos con el objetivo de colonizar, invadir, replicar y sobrevivir dentro del hospedero. La capacidad que tiene esta bacteria para adherirse y entrar a las células del epitelio intestinal es de vital importancia para su supervivencia, esta propiedad determina la virulencia, y se encuentra localizada en un grupo de genes dentro del cromosoma bacteriano y a estas agrupaciones se les conoce como islas de patogenicidad.

Un gen importante en la virulencia de *Salmonella spp* es el gen *inv A*. Este gen, es un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal y utilizado por otros enteropatógenos como *Shigella spp* durante el proceso de infección. El gen *inv A* es común en todas las variedades invasoras y se encuentra codificado en el cromosoma bacteriano, lo que le confiere mayor estabilidad, en una región conocida como isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1) (Chacón *et al.*, 2010). Esta isla contiene, al menos, 29 genes (figura 1) que codifican, entre otros, a proteínas del sistema de secreción tipo III (Martínez, N., 2007). El gen *inv A* ha sido ampliamente utilizado en estudios para la detección

de *Salmonella spp* en muestras de alimentos, debido principalmente a la estabilidad que presenta desde el punto de vista genético (Chacón *et al.*, 2010).

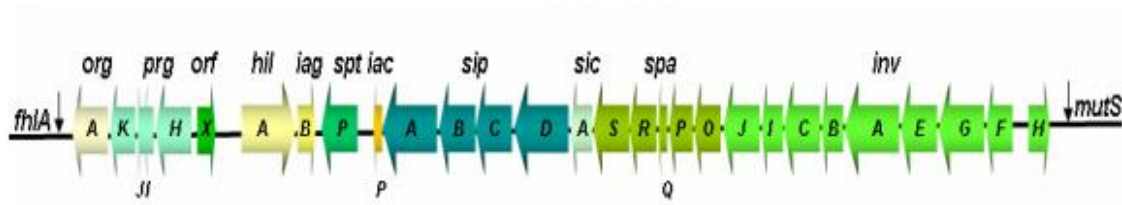


Figura 1. Representación de la SPI1 en *S. enterica*. Tomado de: Martínez, N., 2007.

El gen *inv A* es un blanco ideal para la aplicación de métodos moleculares basados en la PCR, que permiten detectarlo en aguas y alimentos y distinguir entre aislamientos bacterianos patogénicos y no patogénicos. Este gen se encuentra en serotipos de *Salmonella* y puede estar ausente en muestras ambientales con una virulencia reducida que no está asociada con enfermedad.

3.7 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentran directamente influenciadas por los diversos componentes que integran la técnica:

1. Mezcla de reacción: Entre sus elementos principales encontramos
 - ADN molde: Contiene la región de ADN que se va a amplificar.
 - Primers (cebadores, oligonucleótidos): Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos.
 - Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs): Los cuatro dNTPs son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de ADN, por lo que las variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad.

2. Régimen de ciclaje: Tres son los pasos necesarios a seguir y repetir por cada ciclo de la PCR. Comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización (generalmente a 94°C) para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos.
3. ADN polimerasa: Las ADN polimerasa utilizadas en PCR incluyen un grupo de enzimas termoestables aisladas de microorganismos termófilos, de calidad suficiente que evitan pérdidas en especificidad, eficiencia, fidelidad y rendimiento, que de esta forma generara copias complementarias a la secuencia de interés utilizando como materia prima los cuatro nucleótidos que constituyen el ADN (Bolivar *et al.*, 2014) (figura 2).

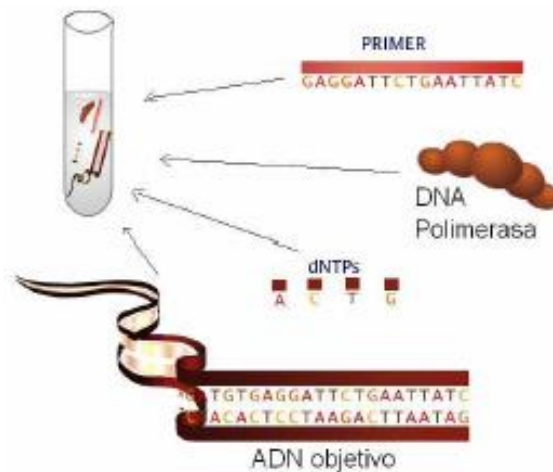


Figura 2. Componentes implicados en una PCR. Tomado de: García, C., 2014.

Al final de la PCR, para saber si la reacción logró la amplificación de la secuencia de ADN, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa a través del cual se visualizan los amplicones obtenidos.

3.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia

de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Morales et. al., 2006).

Por electroforesis se pueden separar fragmentos de ADN y ARN en función a su tamaño y visualizarlos mediante tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de integridad.

3.8.1 Gel de agarosa

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 °C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Los geles de agarosa poseen grandes poros y se emplean fundamentalmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos (variando las concentraciones de agarosa) (Morales *et. al.*, 2006).

El tamaño del poro del gel puede ser predeterminado ajustando su concentración en el gel; entonces a mayor concentración menor tamaño de poro. El rango de trabajo es aproximadamente entre 0,7% y 2% p/v. Con un gel 0,7% se obtiene una buena separación (resolución) de grandes fragmentos de ADN (5–10kb) y con uno 2% se resuelven mejor los fragmentos pequeños (0.2–1kb). Hay que tener en cuenta que los geles de bajo porcentaje son muy frágiles y se pueden romper al intentar levantarlos, y los de alto porcentaje suelen opacarse mucho, disminuyendo la visibilidad de las bandas. En líneas generales, 1% es una concentración estándar (Farina et. al., 2012).

3.8.2 Factores que afectan la electroforesis

El ADN esta homogéneamente cargado de forma negativa a pH neutro, por lo que la relación carga:masa es constante. Su velocidad de migración del ADN en la matriz de agarosa está determinada por una serie de parámetros:

- » Tamaño del ADN
- » Concentración de agarosa

» Conformación del ADN. Las distintas conformaciones de las moléculas de ADN circular del mismo peso molecular migran a distinta velocidad.

» Voltaje aplicado. A bajo voltaje la velocidad de migración de un fragmento lineal de ADN es proporcional al voltaje aplicado, así el rango efectivo de separación decrece a medida que el voltaje se incrementa.

» Presencia de colorante intercalante. El Bromuro de Etidio o Syber green reduce la movilidad electroforética del ADN lineal ya que el intercalante se introduce entre las bases, extendiendo la longitud del ADN lineal haciéndolo más rígido (Farina et. al., 2012).

4 MARCO REFERENCIAL

Los métodos microbiológicos convencionales para la detección de *Salmonella* son métodos tardados y tienen ciertas desventajas, debido que su recuperación se dificulta porque no es detectable en alimentos que tienen un bajo número de células, y por otra parte, los métodos tradicionales para la recuperación del microorganismo, aislamiento en medios selectivos, posterior identificación bioquímica y caracterización serológica tienen baja especificidad, sensibilidad y consumen mucho tiempo, por lo que la implementación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha facilitado el diagnóstico de estos patógenos en alimentos (Acosta *et al.*, 2013).

En la ciudad de Toluca, México, se determinó la frecuencia de aislamientos de cuatro mercados para *Salmonella spp* en hígados de pollo para venta. Se realizó la prueba de ERIC-PCR para determinar la variedad genética de las cepas de *Salmonella* aisladas. De un total de 520 muestras incluidas en el estudio, 7 (1.34 %) resultaron positivas a *Salmonella enterica* serogrupo B (Typhimurium). Determinaron que el manejo que se les da a las canales y vísceras es de suma importancia, además que la presencia en hígados de pollo para consumo humano debe ser considerada como una fuente importante de infección, ya que cualquier serovariedad de esta bacteria representa un potencial de infección para el humano (Talavera *et al.*, 2011).

En 2012 Alves *et al.*, desarrollaron un ensayo de PCR múltiple para la detección rápida de *Campylobacter spp* y *Salmonella spp* en carne de pollo cruda. La especificidad del ensayo fue de 100% y determinaron que era capaz de detectar 102 UFC/mL de *Campylobacter spp* después del enriquecimiento selectivo y 1 UFC/mL de *Salmonella spp* después del pre-enriquecimiento. Se analizaron cincuenta muestras de carne de pollo cruda; 4% estaban contaminados con *Salmonella spp* y el 56% con resultados positivos a *Campylobacter spp* Los resultados obtenidos mediante PCR coincidieron con los métodos de cultivo convencionales (Alves *et al.*, 2012).

Mientras que en un estudio realizado para comparar los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado VIDAS, (Vitek Immunodiagnostic Assay System), y el análisis

molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar *Salmonella spp* en expendios de la ciudad de Santa Marta (Colombia), a partir de 65 muestras de alimento, entre ellas pollo: 7(10.8 %), con una PCR previamente estandarizada para la amplificación de una banda de 284 pb correspondientes al gen *inv A*, reportaron que por inmunoensayo enzimático hallaron un 3.1 % (2/7) de muestras positivas pero al confirmar con la PCR el porcentaje se elevó a 6.2 % (4/7) de positividad, demostrando la sensibilidad de la PCR contra otro tipo de métodos (Acosta *et al.*, 2013).

Por otra parte Saeki *et al.*, llevaron a cabo una PCR múltiple para la detección de *Salmonella spp* y la diferenciación entre serovares Typhimurium y Enteritidis en carne de pollo. Su objetivo fue desarrollar una nueva PCR múltiple (mPCR) para la detección simultánea y diferenciación de *Salmonella spp*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en carne de pollo. Los ensayos mPCR mostraron una alta especificidad con la identificación de *S. Typhimurium* diferenciada de 22 serotipos de *Salmonella* probados, incluyendo *S. Kentucky*. Ellos detectaron la amplificación del gen STM4492, el cual exhibió una alta especificidad para detectar *S. enterica* Typhimurium después de 24 horas de enriquecimiento (Saeki *et al.*, 2013).

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades diarreicas causan más de la mitad de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria, con 550 millones de personas que enferman y 230.000 que mueren cada año. Los niños corren un riesgo especial de padecer enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos: 220 millones enferman y 96.000 mueren cada año. La diarrea suele deberse a la ingestión de carne y huevos crudos o mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos, contaminados por norovirus, *Campylobacter*, *Salmonella* no tifoídica y *Escherichia coli* patógena (OMS, 2015).

La salmonelosis es una de las zoonosis de mayor prevalencia en países tanto desarrollados como subdesarrollados; donde la fuente más frecuente de infección son los alimentos, principalmente la carne de aves, si ésta se consume mal cocida o cuando no se cubren las Buenas Prácticas Higiénicas tanto por parte de los manipuladores de alimentos como en los utensilios empleados, por lo que lleva a plantear la siguiente pregunta:

¿Cuál es la incidencia de *Salmonella spp* en canales de pollo provenientes de un rastro y distribuidoras de aves de Puebla?

6 JUSTIFICACIÓN

En México aproximadamente: 57'730,590 toneladas de pollo son procesadas en los rastros de pollo, de los cuales 52'247,420 toneladas (90.50%) de la producción se procesa en rastros Tipo Inspección Federal (TIF) (Castañeda *et al.*, 2013). Pero también es importante destacar que la mayoría de este producto es de exportación y sólo un bajo porcentaje se queda para cubrir la demanda Nacional. Aproximadamente el 10% de la matanza de pollo se lleva a cabo en rastros estatales y privados y éste producto es el que cubre el mercado Nacional.

Aunque en México no existen mediciones oficiales sobre la distribución del mercado, se estima que Bachoco es el líder, con 32% del mercado, Tyson Foods y Pilgrim's Pride suman 25%. Bachoco tiene la mayor escala y presencia nacional mientras que el resto de los competidores en el mercado son las empresas regionales medianas y algunos pequeños productores del sureste del país: Jalisco, Puebla y Veracruz, principalmente. Bachoco participa en todos los canales de distribución de la industria avícola. La comercialización de pollos se realiza a través de seis categorías:

- Rosticero, Supermercado, Partes de Pollo y Productos de valor agregado.
- Pollo vivo: Se comercializa a clientes mayoristas y se distribuye en el sureste del país.
- Mercado público: Este producto se entrega, entero y sin eviscerar, comercializándose enhielado en contenedores con 150 pollos, en un máximo plazo de 48 horas posterior a su sacrificio. Se vende en todo el país, particularmente en la zona centro, sin empaques ni identificación de marca (Núñez, 2012).

Una característica clave del mercado mexicano, que lo diferencia de otros países, es que el pollo fresco representa entre 75% y 85% del consumo total de pollo y se canaliza de manera principal a través de los distribuidores y pequeños detallistas. Menos de 15 % se canaliza a través de los grandes supermercados como Wal-Mart de México, Comercial Mexicana y Soriana (Alonso, 2009).

La importancia de estos datos, es reconocer el impacto del manejo del pollo en la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), ya que durante el proceso de matanza de las aves, se puede producir contaminación cruzada por contacto con material no-procesado, con aves, o utensilios de proceso, aun teniendo las medidas de manipulación e higiene adecuadas, por lo que es de gran importancia la detección de esta bacteria antes de que sea adquirida por el consumidor (Castañeda *et al.*, 2013), sin embargo, los métodos microbiológicos para la identificación de las diferentes especies patógenas toman demasiado tiempo en ofrecer una respuesta, lo que hace que los productores no puedan valerse de ellos para sacar a la venta un producto con garantía microbiológica, al tratarse de un alimento perecedero. De ahí la importancia de la implementación de nuevas técnicas para la detección de patógenos, por lo que el método de PCR para el diagnóstico molecular rápido y preciso de *Salmonella spp* en carne de pollo es de gran valor, no sólo para los productores y distribuidores, sino también para los consumidores.

7 OBJETIVOS

7.1 GENERAL

Determinar la incidencia de *Salmonella spp* en canales de pollo provenientes de un rastro y distribuidoras de aves, mediante cultivo microbiológico y PCR de punto final.

7.2 PARTICULARES

- Determinar la calidad microbiológica de pollos, provenientes de un rastro y distribuidoras de aves.
- Aislar mediante cultivo microbiológico a *Salmonella* de canales de pollo muestreados.
- Estandarizar y aplicar la técnica de PCR para la detección de *Salmonella spp* en carne de pollo.
- Detectar *Salmonella* mediante el kit “*Salmonella detection*” (Mississippi State University) para corroborar su utilidad.

8 METODOLOGÍA

8.1 CEPA CONTROL Y MEDIOS DE CULTIVOS

La cepa control empleada, *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028 fue donada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

La cepa que se encontraba guardada a -70 °C fue descongelada lentamente en hielo y se activó en agar LB, fue incubada a 37°C de 18 a 24 horas, para llevar a cabo la extracción de ADN, para la amplificación del gen *inv A* en la PCR punto final o en PCR de colonia.

Los medios empleados en el desarrollo del trabajo fueron LB para las pruebas relacionadas a PCR y los específicos para cada una de las determinaciones de los diferentes indicadores sanitarios.

8.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *INV A*

La estandarización de la técnica de PCR para la amplificación del gen *inv A* se llevó a cabo utilizando 12 cepas de *Salmonella entérica* de diferentes serovariedades, dos cepas de *Escherichia coli* (EHEC y EPEC), una de *Enterobacter cloacae* y otra de *Citrobacter*, para garantizar que el amplicón obtenido fuera exclusivo de *Salmonella*, se buscaron las condiciones de la reacción de PCR y del programa de amplificación.

8.3 SELECCIÓN DE DISTRIBUIDORAS MUESTREADAS

Se muestreó un rastro ubicado en Zacatlán de las Manzanas, la Central de Abastos y distribuidoras aledañas de la ciudad de Puebla (figura 3 y 4), obteniéndose un total de 51 canales de pollo, las cuales debían cumplir con 3 criterios de inclusión:

1. Ser pollo fresco.
2. Provenir de una de las distribuidoras o rastro previamente seleccionados.
3. No tener evidencias físicas de descomposición notorias.

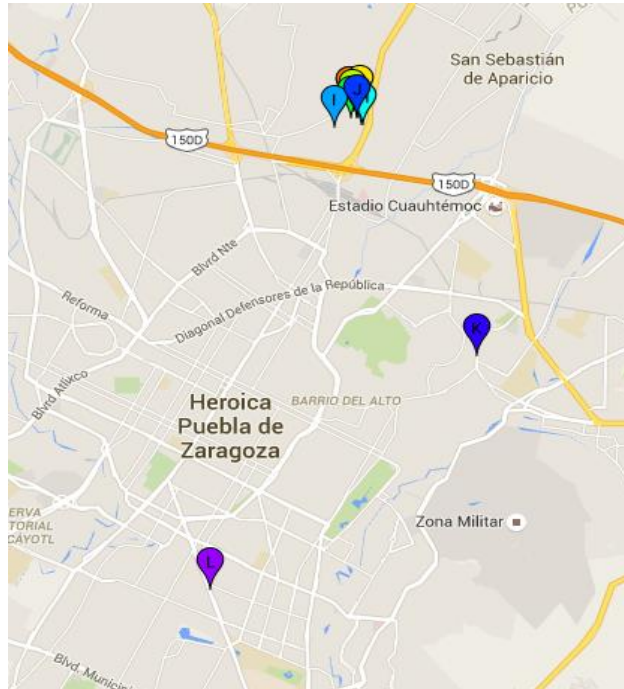


Figura 3. Mapa de la ciudad de Puebla, donde se muestra y se señala la ubicación de las distribuidoras muestreadas, observándose una mayor concentración en la Central de Abastos. Tomado de: Google Maps, 2016.

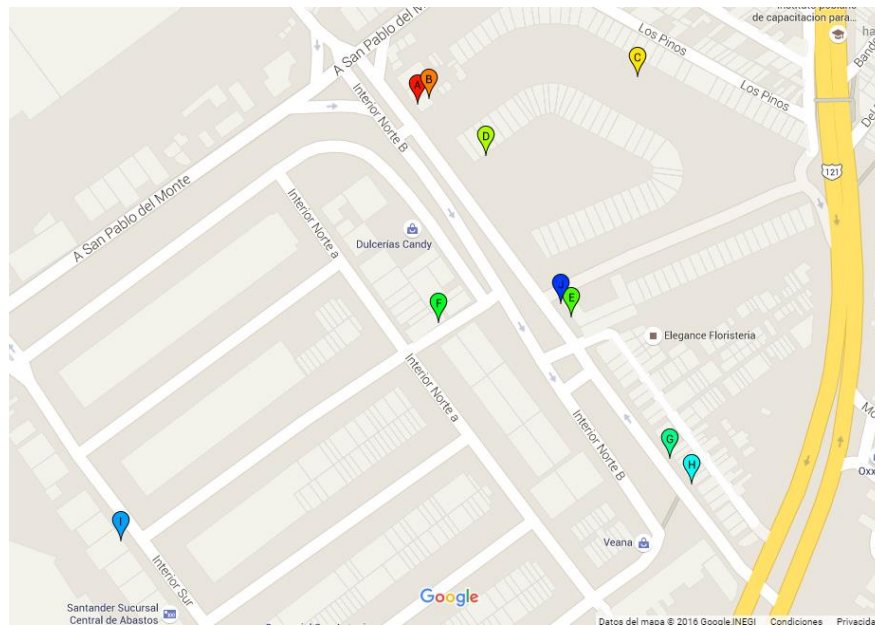


Figura 4. Mapa de la Central de Abastos en la ciudad de Puebla, donde se muestra la ubicación de las distribuidoras muestreadas. Tomado de: Google Maps, 2016.

Posteriormente se llevó a cabo su procesamiento de acuerdo al diagrama de trabajo planteado en la figura 5.

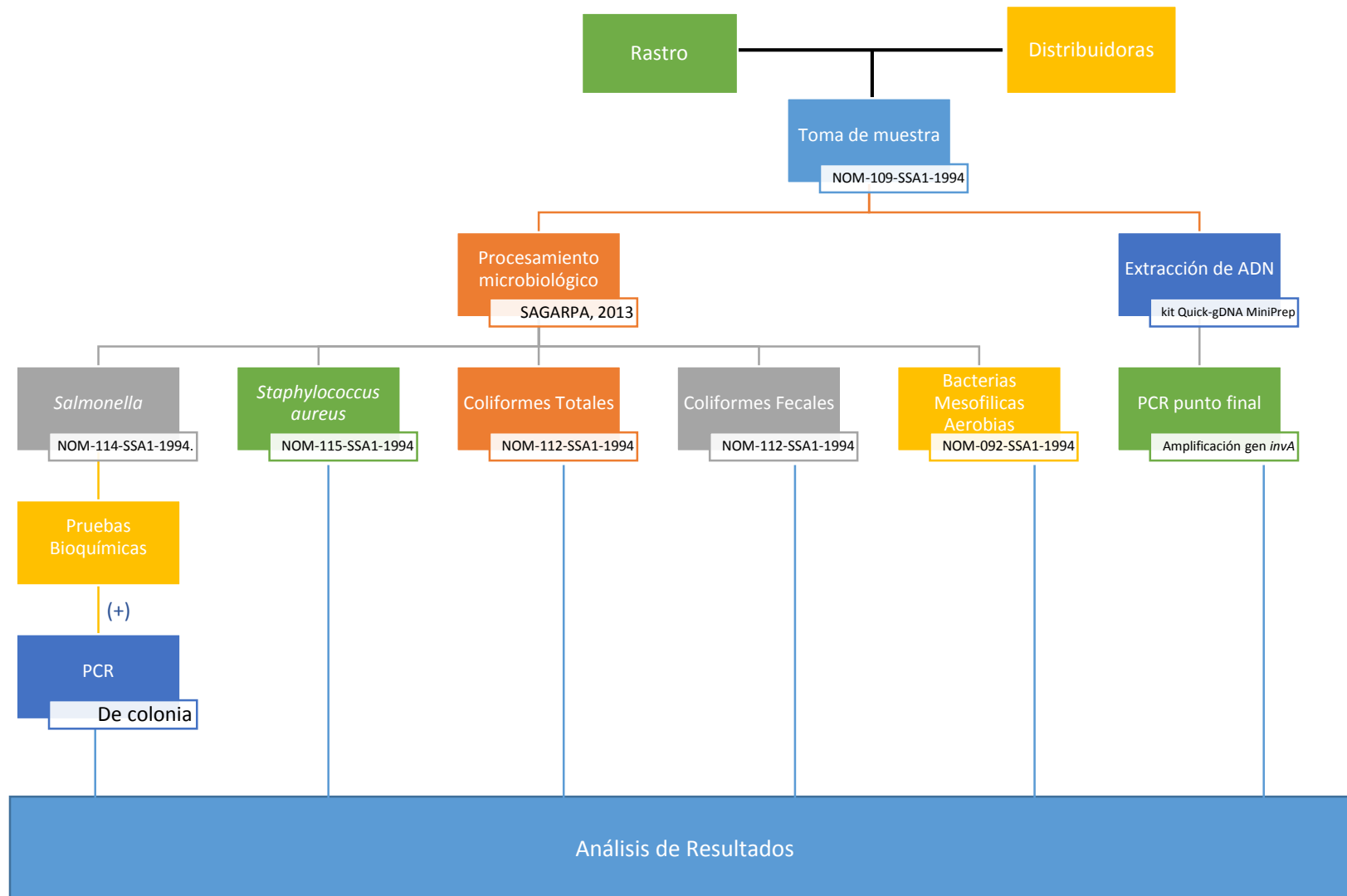


Figura 5. Diagrama general de trabajo

8.4 TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra fue realizada conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA, MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO, en un rastro y distribuidoras de aves en Puebla, durante un día de proceso normal, y transportadas al Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP, BUAP; en cadena de frío para evitar así, lo más posible, la variación de la carga microbiana, en donde eran procesadas.

8.5 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO DE LA MUESTRA

8.5.1 Obtención del botón directo de la muestra

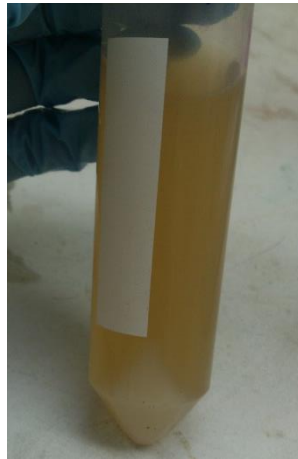
La extracción de ADN a partir de pollos sometidos al proceso de matanza, provenientes del rastro y las distribuidoras de aves se llevó a cabo haciendo una suspensión de trozos de carne y piel de diferentes zonas del cuerpo de animal, exceptuando patas y cabeza, dilución 1:10 en caldo BHI (25 g de carne de pollo en 225 mL de caldo), se incubó durante 3 horas a 37°C y se tomó una alícuota de 50 mL en tubo cónico previamente esterilizado, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó en un tubo cónico estéril para la repetición del proceso de centrifugación y decantación las veces necesarias hasta que se consiguió que la mayor cantidad de grasa se desprendiera de la suspensión (figura 6). El sobrenadante ya libre de grasa fue decantado en otro tubo cónico estéril, para volver a centrifugar a 7000 rpm durante 10 minutos, al final de la centrifugación, el sobrenadante fue desechado y el botón obtenido, se transvasó a un tubo Eppendorf estéril.



a)



b)



c)

Figura 6. a) Toma de trozos de carne y piel de las canales para la suspensión (25g de muestra de pollo en 225 mL de caldo BHI). b) Alícuota de 50 mL en tubo cónico, después de la incubación durante 3 horas a 37°C. c) Residuo de grasa de la alícuota después de la centrifugación. Fotografías propias, 2016.

8.5.2 Extracción de ADN con el kit

La extracción de ADN bacteriano de canales de pollo se realizó una vez obtenido el botón directamente de la muestra; el proceso se llevó a cabo con el kit Quick-gDNA MiniPrep, para extraer y purificar el ADN.

Se llevó a cabo por medio de una lisis al botón obtenido con anterioridad para permitir que los ácidos nucleicos se liberasen con la solución “Genomic Lysis Buffer”. Posteriormente mediante centrifugaciones en una columna de extracción se separó el material genético y este quedó atrapado en la columna, se realizaron los lavados correspondientes para que al final todo el ADN extraído fuera nuevamente resuspendido en agua estéril (figura 7).

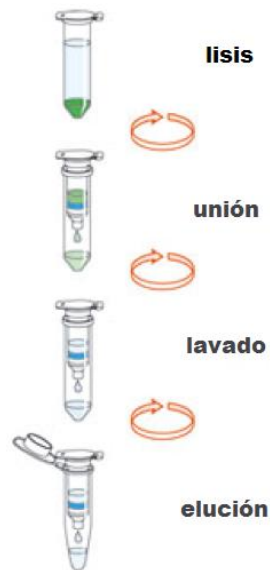


Figura 7. Procedimiento general de la extracción de ADN con el kit Quick-gDNA MiniPrep. Tomado de Inserto del kit Quick-gDNA MiniPrep modificado, 2015.

8.5.3 Electroforesis en gel de agarosa y visualización de ADN extraído con el kit

Los productos de extracción fueron analizados mezclando 5 μ L de ADN bacteriano con 2 μ L de buffer de ADN 5X, los cuales eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%, a un voltaje de 90 volts durante un tiempo de 50 min a 1 hora, en buffer TAE IX (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA pH 8.0). Para hacer la estimación de la longitud de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb). La tinción del gel de agarosa se realizó en bromuro de Etidio a una concentración de 0.5 μ g/mL por 10 minutos y posteriormente se visualizó en el transiluminador UV.

8.5.4 PCR punto final: amplificación del gen *inv A*

Para la identificación de *Salmonella* por PCR se amplificó el gen *inv A* que es característico de género, los oligonucleótidos que se usaron se muestran en la tabla 1, las reacciones de PCR fueron de 25 µL y se realizaron empleando la mezcla de reacción comercial GoTaq®Green Master Mix 2X, de PROMEGA (tabla 2). La mezcla de reacción final se sometió a un proceso de amplificación en un termociclador (Mastercycler Personal, EPPENDORF). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos, seguido de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación de 58°C por 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos, este ciclo fue repetido 30 veces y finalizado con una etapa de extensión final a 72°C por 15 minutos.

TABLA 1. Iniciadores empleados para la identificación de especies de <i>Salmonella spp</i>		
Iniciador	Secuencia 5'-3'	Gen Blanco
INVAF	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	<i>inv A</i>
INVAR	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	

TABLA 2. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR punto final para la amplificación del gen <i>inv A</i>		
Componente	Volumen	Concentración final
GoTaq® (Geen Master Mix, 2X)	12.5µL	1 X
Iniciadores	0.25 – 2.5 µL de c/u	0.1–1.0µL
ADN (muestra y cepa control)	1 - 5µL	<250ng
Agua estéril	Se ajustará a 25 µL	N.A
Volumen final	25µL	25µL

8.5.5 Visualización de los amplicones

La visualización de los amplicones obtenidos en la reacción de PCR para el gen *inv A* a partir del ADN obtenido de la muestra directa, se realizó de igual forma a lo ya explicado en el punto 7.5.3, empleando como control positivo ADN bacteriano de *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028.

8.6 PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO

8.6.1 Determinación de microorganismos indicadores en pollo por método microbiológico

La muestra de canal de pollo se procesó en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

De acuerdo a esta, la preparación primaria se realizó con 10 gramos de carne y piel de diferentes zonas de la canal en 90 mL de agua peptonada (dilución 1:10), se homogeneizó en licuadora a velocidad máxima durante 1 minuto y a partir de esta suspensión fueron tomadas las diluciones siguientes para cada una de las pruebas con la excepción de la prueba para la búsqueda de *Salmonella*, para la cual se procesaron 25 g de carne de pollo.

8.6.1.1 Bacterias Mesofílicas Aerobias

Para la detección de Bacterias Mesofílicas aerobias se llevó cabo en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

La prueba fue realizada a partir de las dos diluciones decimales realizadas a partir de la dilución primaria (1:100 y 1:1000), se sembraron dos placas por cada una de las diluciones con 100 μ L. Se realizó la incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 48 ± 2 h. Pasado el tiempo de incubación, se procedió al conteo de las placas, en caso de que el resultado de las placas fuera incontable, se realizaba nuevamente la prueba, realizando nuevas diluciones decimales (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , etc.) según el resultado de las placas.

8.6.1.2 Coliformes totales y fecales

La detección de bacterias coliformes totales y fecales se llevó a cabo en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NUMERO MÁS PROBABLE.

En la figura 8 se representa el diagrama de trabajo para la prueba de coliformes totales y fecales, donde a partir de la dilución primaria se realizaron dos diluciones más, para posteriormente sembrar por triplicado cada dilución en tubos de caldo lauril sulfato de sodio (1X), después de incubar 48 h, se procedió a la siembra de 100 µL de los tubos positivos, es decir que presentaban gas, a caldo verde brillante bilis 2% y caldo EC-MUG, para incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y $44 \pm 2^\circ\text{C}$ (44.5°C) de 24 a 48 h, para la determinación de coliformes totales y fecales, respectivamente.

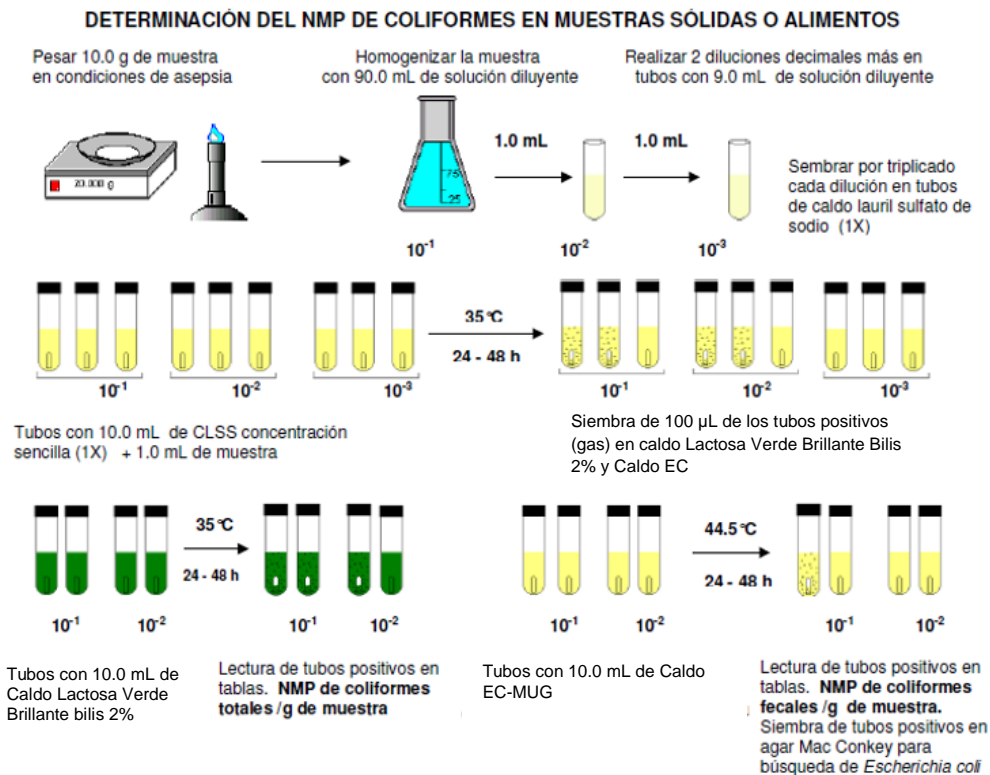


Figura 8. Diagrama modificado para la determinación del NMP de coliformes totales y fecales. Tomado de apuntes de clase de MC Martínez, L., 2016.

8.6.1.3 *Staphylococcus aureus*

La detección de *S. aureus* fue llevada a cabo en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

A partir de la dilución primaria se realizaron dos diluciones decimales más en tubos con 9 mL de agua peptonada. Posteriormente, se tomaron 100 μ L de cada dilución y se sembraron en placas por extensión en superficie con varilla de vidrio, metiéndose a incubación de 45 a 48 h a 35 °C, para posteriormente realizar su conteo, resiembra y confirmación por medio de la prueba de coagulasa.

8.6.2 Detección de *Salmonella* mediante el kit “*Salmonella detection*” (Mississippi State University)

Se hizo una suspensión de trozos de carne y piel de diferentes zonas del cuerpo de animal, exceptuando patas y cabeza, dilución 1:10 en agua peptonada (25 g de muestra de pollo en 225 mL de agua peptonada), se incubó a 41.5 °C de 24 \pm 2 horas y se transfirió 1 mL de la suspensión al kit pre-llenado con MB2 tal como se observa en la figura 9 y se incubó a 41.5 °C durante 24 \pm 2 horas.

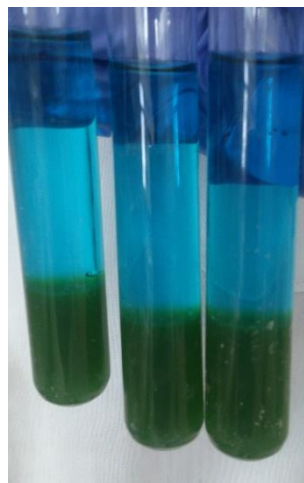


Figura 9. Kit “*Salmonella detection*”, tubos pre-llenados con medio MB2 (10 mL).
Fotografía propia, 2016.

Para la preparación del medio MB2 que se utilizó en el kit, se agregó 19 g de medio MB2 por cada litro de agua destilada, se mezcló hasta disolver completamente y se llevó a esterilización a 121 °C por 15 min, una vez que este se enfrió, se agregó a los tubos preparados para este.

8.6.3 Determinación de *Salmonella spp* en pollo por método microbiológico

Se llevó a cabo la determinación de *Salmonella spp* en la muestra de canal de pollos sometidos al proceso de matanza provenientes de un rastro y distribuidoras de aves, por el método microbiológico de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS.

8.6.4 Identificación bioquímica

Una vez realizado el proceso para la recuperación de *Salmonella spp*, se procedió a la realización de pruebas bioquímicas para así poder aislar e identificar las posibles colonias positivas a *Salmonella* del alimento.

8.6.5 PCR de colonia (prueba confirmatoria)

Para comprobar la veracidad de los resultados obtenidos en la PCR punto final realizada directamente de la muestra, se llevó a cabo otra PCR a partir de las colonias confirmadas bioquímicamente obtenidas por el método microbiológico, las cuales también se confirmaron genéticamente mediante la identificación del gen *inv A* por PCR.

Se hizo un cultivo de las colonias en medio LB con la finalidad de aislarlas y así garantizar su pureza para posteriormente realizar la PCR de colonia. De las placas de cultivo crecidas, se seleccionó 1 colonia aislada y con una punta de micropipeta estéril se tomó cuidadosamente y se homogeneizó en la reacción de PCR previamente mezclada.

Fue empleado como control positivo a *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028.

9 RESULTADOS

9.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *INV A*

Se estandarizaron las condiciones y el programa de amplificación del gen *inv A* obteniéndose un amplicón de 284 pb, el cual se envió a secuenciar obteniéndose un 99% de homología (figura 10).

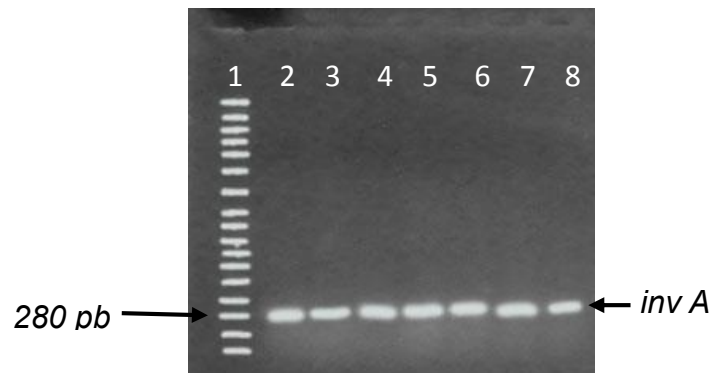


Figura 10. Se observan los amplicones de 280-300 pb del gen *inv A*, L1) Marcador de ADN de 100 pb, L2) *S. enterica* Enteritidis, L3) *S. enterica* Typhimurium 129, L4) *S. enterica* Typhi, L5) *S. enterica* Typhimurium ATTC-14028, L6) *S. enterica* Montevideo, L7) *S. enterica* serovar Typhimurium, L8) *S. enterica* Anatum. Fotografía Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP, BUAP, 2015.

9.2 EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO DE LA MUESTRA

9.2.1 Obtención del botón directo de la muestra

Se llevó a cabo la obtención del botón directamente de la muestra de igual forma a lo ya explicado en el punto 8.5.1, obteniéndose de esta manera 1 botón de aproximadamente 1.5 mL para cada una de las muestras procesadas.

9.2.2 Extracción de ADN con el kit

La extracción de ADN directamente de la muestra, se realizó a partir de los botones obtenidos, el material utilizado fue nuevo y estéril, la extracción se realizó con el kit Quick-gDNA MiniPrep y con la metodología descrita en el desarrollo experimental.

9.2.2.1 Electroforesis en gel de agarosa y visualización de ADN extraído con el kit

Los productos de extracción fueron analizados para confirmar la existencia de ADN en la muestra. Obteniendo ADN en todas las muestras (figura 11).

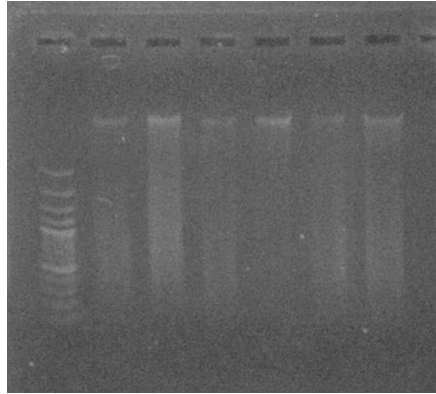


Figura 11. Verificación de la obtención de ADN de las muestras obtenidas por medio del kit *Quick-gDNA MiniPrep*. Fotografía propia, 2016.

9.2.3 PCR punto final: amplificación del gen *inv A*

Para la identificación de *Salmonella* por PCR se amplificó el gen *inv A* que es característico de género, bajo las condiciones de reacción ya estandarizadas.

9.2.3.1 Visualización de los amplicones

Se llevó a cabo la visualización de los amplicones obtenidos en la reacción de PCR para el gen *inv A* a partir del ADN obtenido de la muestra directa, empleando como control positivo ADN bacteriano de *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028, confirmando su ausencia en las 15 canales muestreadas del rastro de Zacatlán (figura 12).

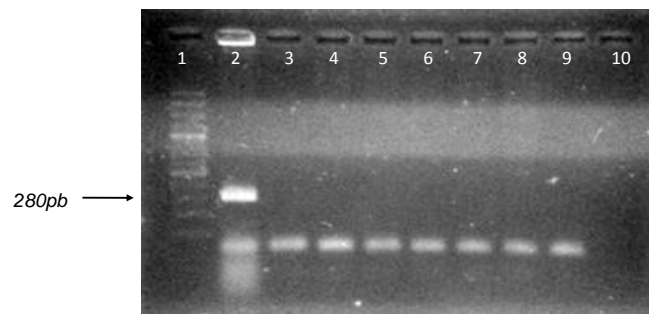


Figura 12. Visualización de los amplicones obtenidos por reacción de PRC para el gen *inv A* a partir de ADN obtenido de la muestra directa. L1) Marcador, L2) Control positivo, L3-L8) Muestras 1 – 6, L9) Control negativo. Fotografía propia, 2016.

Así también, fueron analizadas 36 canales de pollo, provenientes de 12 distribuidoras de la Central de Abastos y ciudad de Puebla, de las cuales en el 8 % (1/12) se detectó a *Salmonella* (figura 13) por la amplificación del gen *inv A* en dos muestras (figura 14).

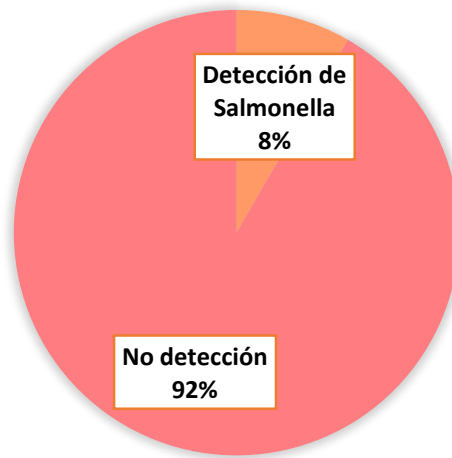


Figura 13. Se detectó molecularmente a *Salmonella* en el 8% (1/12) de las distribuidoras de carne de pollo.

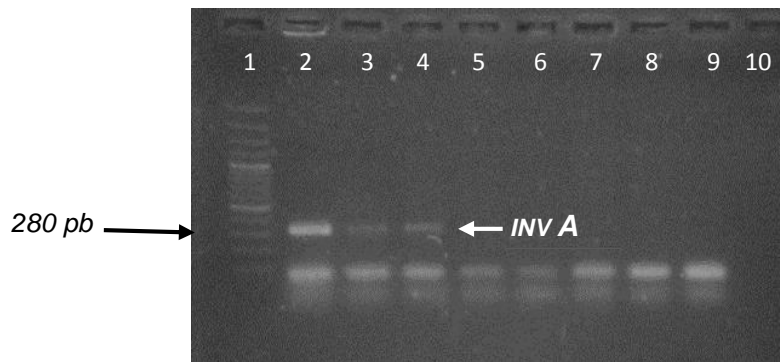


Figura 14. Amplificación del gen *inv A* directamente del ADN extraído de las muestras de pollo. L1) Marcador de ADN de 100 pb, L2) Amplicón de *S. enterica* Typhimurium ATCC-14028, L3-L9) amplicones de muestras provenientes de las distribuidoras, L10) control negativo. Fotografía propia, 2016.

9.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

9.3.1 Determinación de microorganismos indicadores en pollo por método microbiológico

9.3.1.1 Bacterias Mesofílicas Aerobias

Una vez llevada a cabo la determinación de BMA, se tomó como límite máximo 10 000 000 UFC/g de acuerdo al Proyecto de Norma Oficial, NOM-087-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. AVES FRESCAS REFRIGERADAS Y CONGELADAS ENTERAS Y TROCEADAS ENVASADAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

El promedio de los resultados obtenidos en los tres muestreos del rastro, indican que ninguna de las muestras de pollo estuvo fuera de norma, para la determinación de BMA (figura 15); por otro lado se observa claramente que dos de las 12 distribuidoras muestreadas se encontraron fuera de norma como se observa en la figura 16 (16.7%).

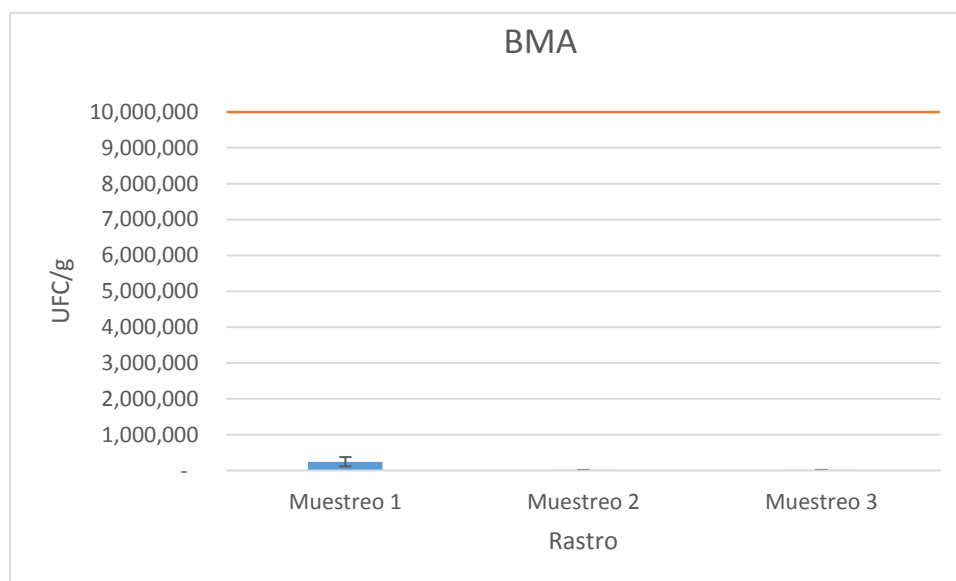


Figura 15. Gráfica de los promedios y desviaciones estándar de las muestras obtenidas del rastro para BMA.

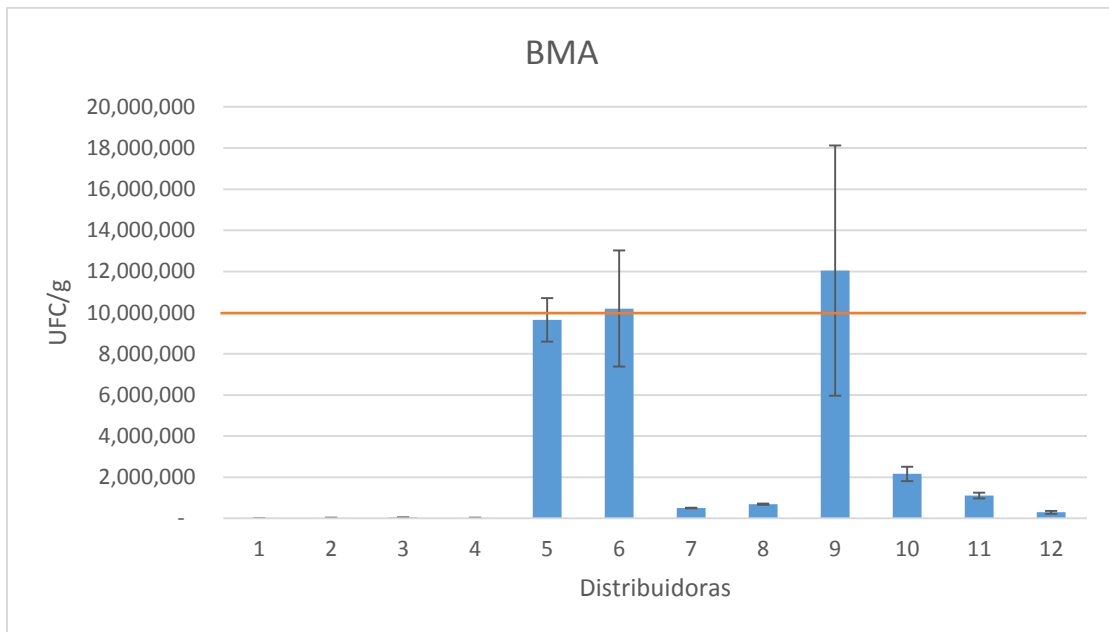


Figura 16. Gráfica de los promedios y desviaciones estándar de las muestras de pollo obtenidas de las distribuidoras de la ciudad de Puebla de la cuantificación de BMA.

9.3.1.2 Coliformes totales y fecales

La prueba de coliformes totales y fecales fue usada únicamente como indicador de buenas prácticas higiénicas, de la limpieza del lugar, así como del manipulador, respectivamente. En las figuras 17 y 18 se presentan los resultados de las determinaciones para el rastro y las distribuidoras en las muestras de pollo. Los resultados obtenidos indican que, independientemente del lugar de expendio del producto (rastro/distribuidoras), en todas las muestras los conteos obtenidos fueron altos, por lo que existen prácticas deficientes en los lugares.

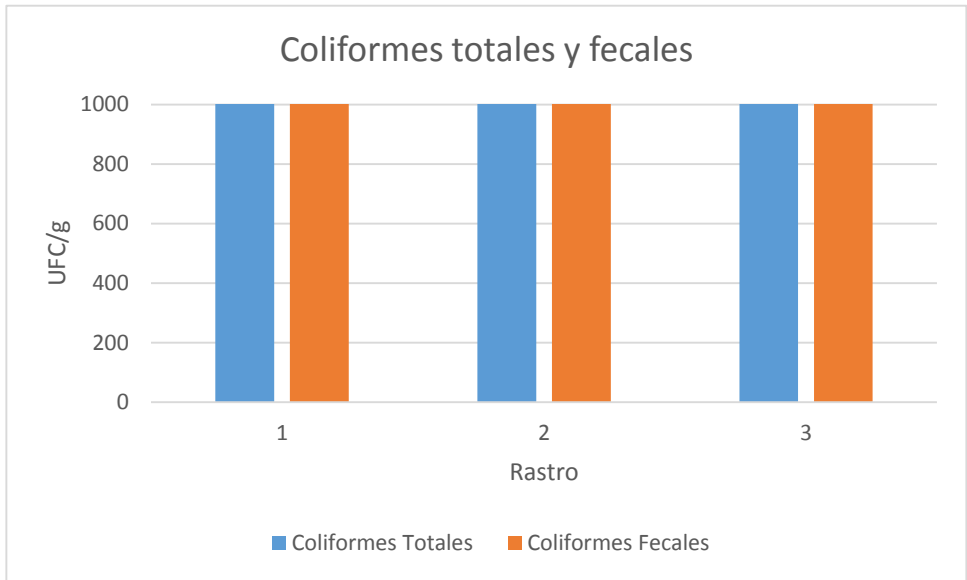


Figura 17. Resultados de la determinación de coliformes totales y fecales en el rastro de Zacatlán de todas las muestras analizadas en los tres muestreos.

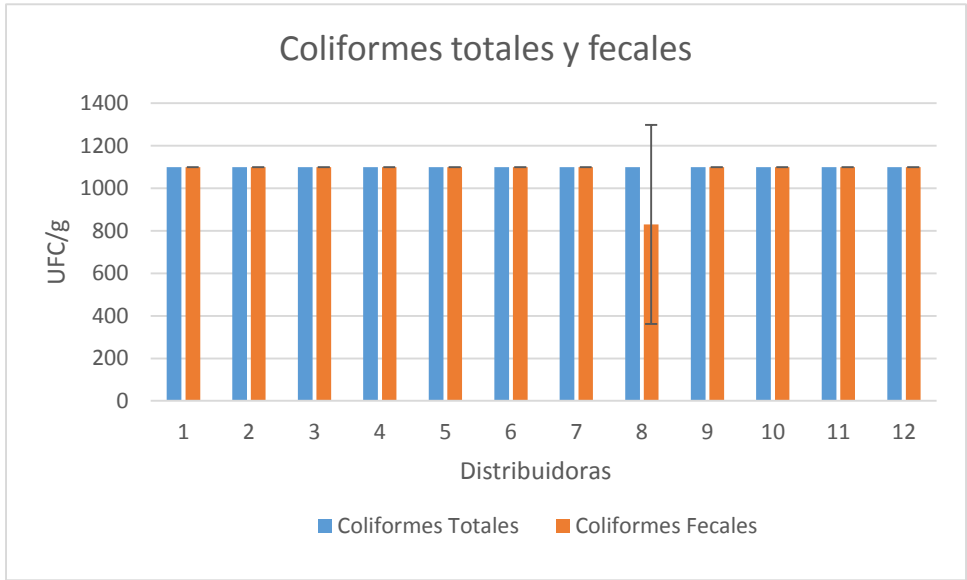


Figura 18. Resultados de la determinación de coliformes totales y fecales en las distribuidoras de la ciudad de Puebla de todas las muestras analizadas.

9.3.1.3 *Staphylococcus aureus*

Una vez realizada la extensión en superficie con varilla de vidrio en placas con agar Baird Parker y pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar el conteo de las colonias típicas de *S. aureus*, donde solamente eran tomadas en cuenta las colonias con las siguientes características: negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y que mostraban una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia (figura 17a). Posteriormente, se les realizó la prueba de confirmación en base a los criterios de la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, realizando la prueba de coagulasa (figura 19b).

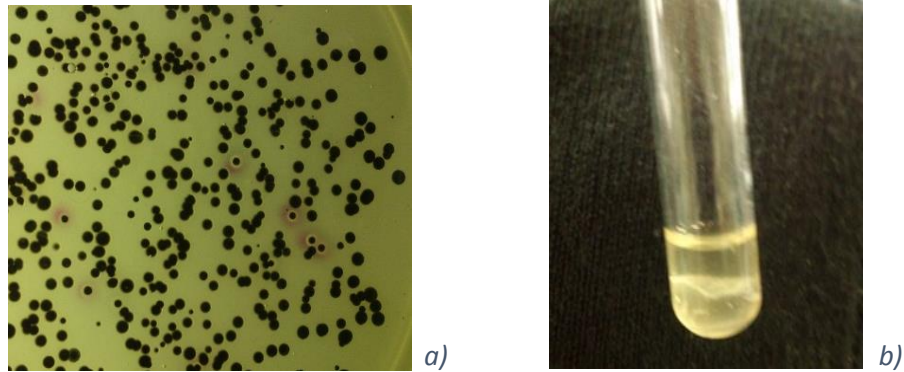


Figura 19. a) Crecimiento de colonias características de *S. aureus* en agar Baird Parker, después de 48 horas de incubación a 35°C. b) Confirmación de *S. aureus* coagulasa (+). Fotografías propias, 2016.

El promedio de los resultados de los tres muestreos del rastro indica que ninguna de las muestras de pollo estuvo por arriba de la norma para la determinación de *S. aureus* (figura 20) a diferencia de lo observado en las distribuidoras, donde las muestras de pollo obtenidas de las distribuidoras 3,4 y 9 (25%) no cumplieron la normatividad (figura 21).

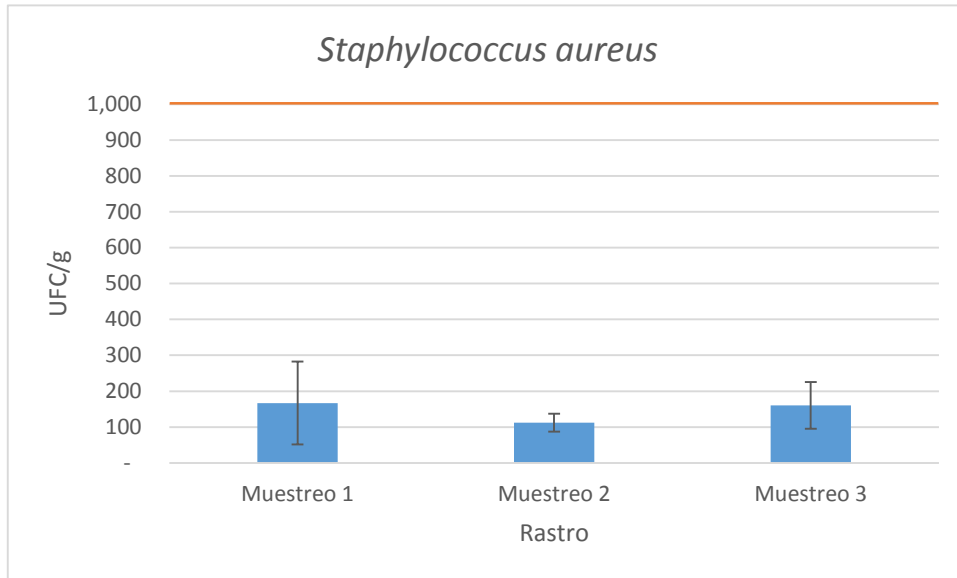


Figura 20. Gráfica de los promedios de las muestras obtenidas del rastro para *S. aureus*.

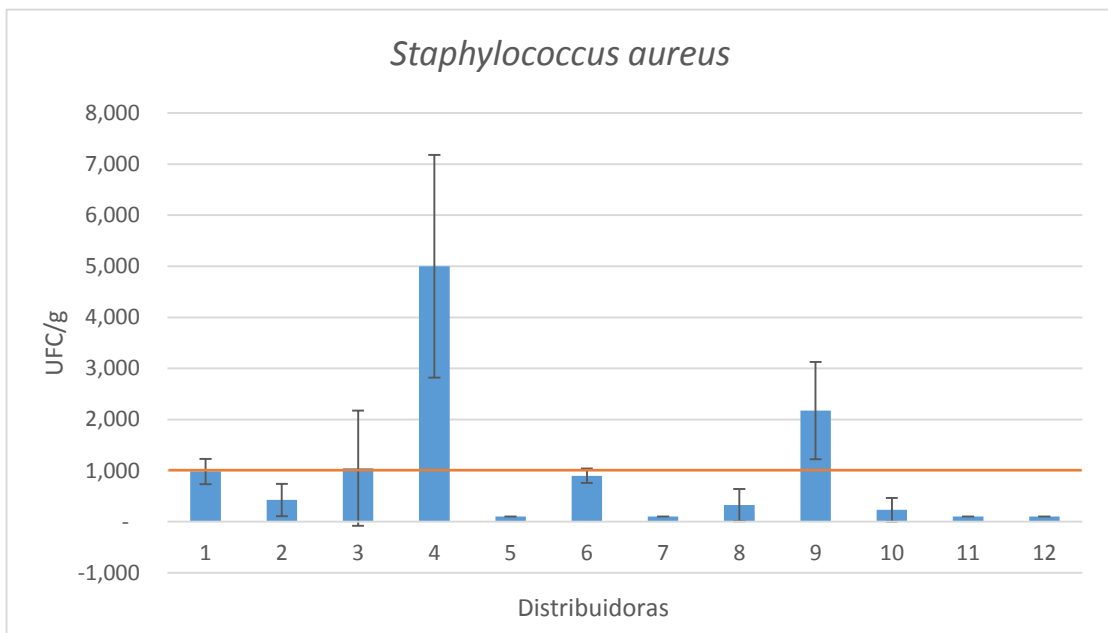


Figura 21. Gráfica de los promedios de las muestras obtenidas de las distribuidoras de la ciudad de Puebla para *S. aureus*.

Con los resultados obtenidos de los Indicadores, se analizó el número de distribuidoras que cumplían o no con la normatividad, de acuerdo a los parámetros analizados: bacterias mesofílicas aerobias (NOM-087-SSA1-1994), *S. aureus* (NOM-034-SSA-1993) y *Salmonella* (NOM-087-SSA1-1994) concluyendo que el 58% (7/12) de las distribuidoras cumplieron con los requerimientos establecidos por las normas (figura 22).

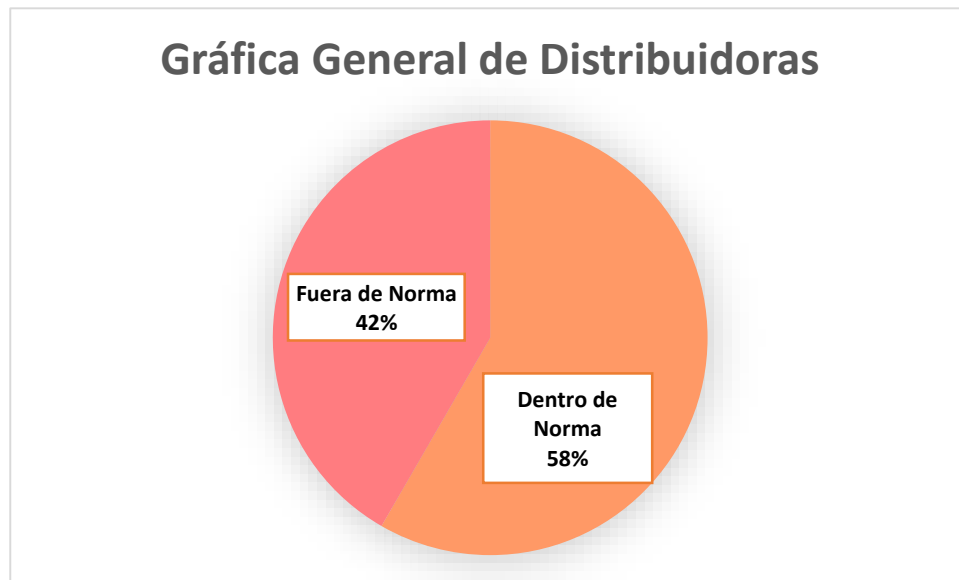


Figura 22. Gráfica las distribuidoras muestreadas que cumplieron con los tres parámetros establecidos por las normas.

9.3.2 Detección de *Salmonella* mediante el kit “*Salmonella* detection” (Mississippi State University)

El kit fue utilizado en 17 de 36 muestras de las distribuidoras, a partir del muestreo número 4. De acuerdo a las indicaciones del kit, se obtuvieron 6 resultados positivos y 11 negativos (figura 23a y 23b).

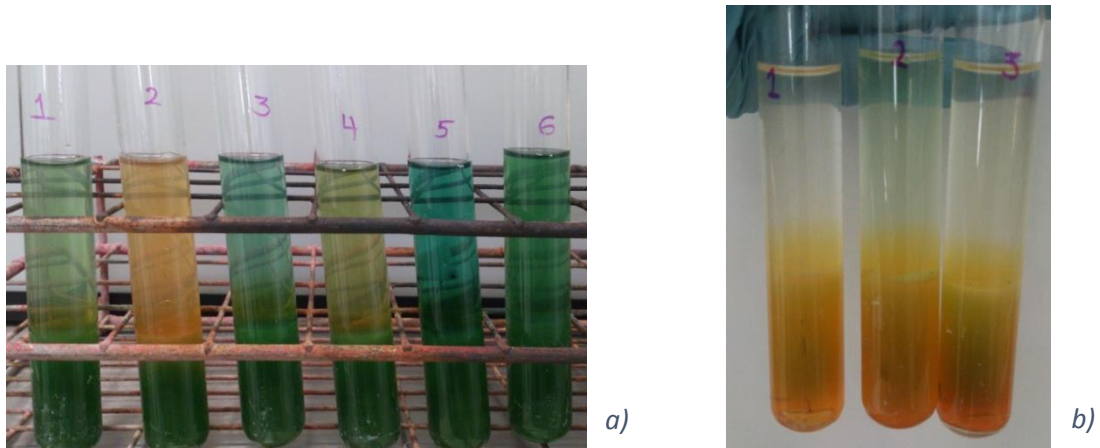


Figura 23. a) Tubos del kit “*Salmonella* detection” que presentan resultado negativo. b) Tubos del Kit “*Salmonella* detection” que presentan fondo amarillo: resultado positivo. Fotografías propias, 2016.

9.3.3 Determinación de *Salmonella* spp en pollo por método microbiológico

Después del enriquecimiento por el método microbiológico de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, los medios que se eligieron para el aislamiento fueron: Agar Verde Brillante, Agar MacConkey y Agar Sulfito de Bismuto, de donde se tomaron de una a dos colonias que cumplieran con las características de *Salmonella* en cada medio, para su identificación bioquímica. Después de la identificación bioquímica, se procedió a la confirmación por PCR de colonia, observándose que las cepas clasificadas

como presuntivas a *Salmonella* no se confirmaron por PCR ya que no se amplificó del gen *inv A* (figura 24).

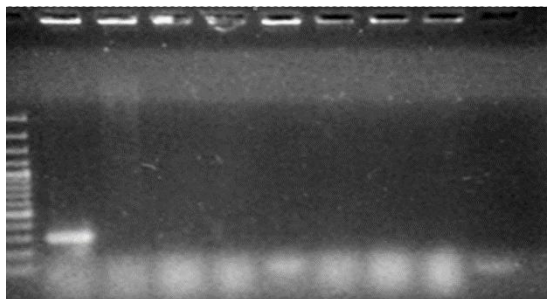


Figura 24. Visualización de los amplicones obtenidos por reacción de PCR de colonia para el gen inv A a partir de ADN obtenido de las colonias presuntivas de Salmonella por el método microbiológico. L1) Marcador, 2) Control positivo, L3-L9) 1VB. 1SB. 2SB. 3VB. 3SB. 4SB. 6SB, L10) Control negativo. Fotografía propia, 2016.

9.3.4 Comparación de los indicadores de calidad entre las muestras de pollo obtenidas del rastro y de las distribuidoras

Al comparar el porcentaje de muestras dentro y fuera de norma del rastro y las distribuidoras, pudo observarse que existe una gran diferencia entre los dos lugares, ya que las distribuidoras tuvieron un mayor porcentaje de muestras que incumplían con la normatividad (figura 25), por lo que se puede inferir que durante el transporte de las canales del rastro a las distribuidoras, así como la manipulación y almacenamiento en estas, se lleva a cabo de manera deficiente influyendo de manera importante en el incremento de la contaminación microbiana del producto.

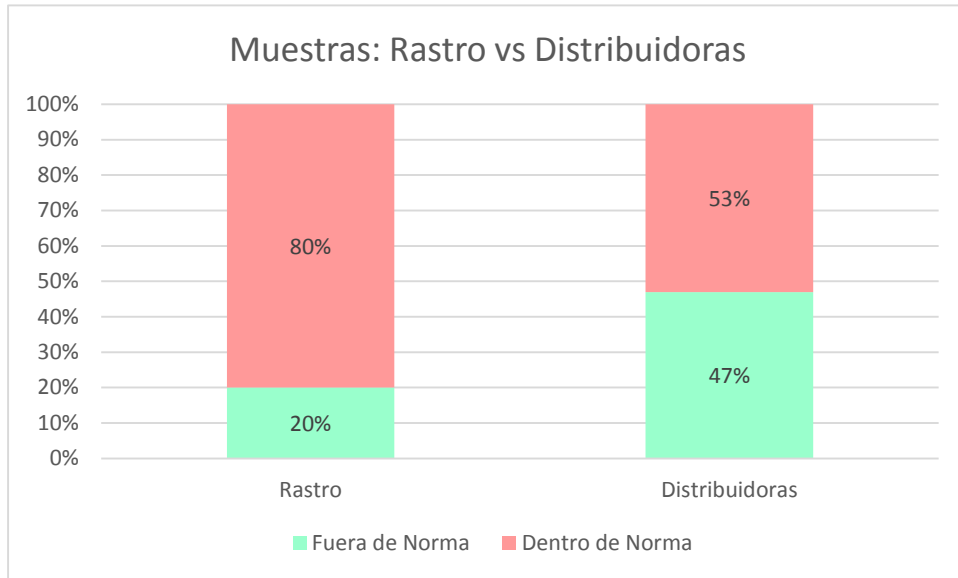


Figura 25. Comparación de los porcentajes de las muestras dentro y fuera de norma entre el rastro y las distribuidoras.

10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la estabilidad del gen *inv A*, que le confiere la capacidad de invasión al epitelio intestinal, y que se encuentra presente en el género, fue seleccionado como blanco para su detección en este estudio, lográndose la estandarización de las condiciones del programa de amplificación con un producto de 280 pb que ya secuenciado presentó un 99% de homología, demostrando que la técnica de PCR punto final obtenida es específica, sensible y sobre todo rápida, para la detección de esta bacteria sin complicaciones en cuanto a su reproducción en el laboratorio, a diferencia de lo obtenido por Chacón *et al.*, y Espinal *et al.*, quienes realizaron una PCR amplificando fragmentos de 389 y 378 pb, respectivamente, con métodos más tardados y complejos aunque igualmente exitosos para la detección de *Salmonella* en las muestras (Chacón *et al.*, 2010 y Espinal *et al.*, 2006).

Se analizó un total de 51 canales de pollo, 15 provenientes del rastro ubicado en Zacatlán de las Manzanas y 36 de las distribuidoras de la ciudad de Puebla, de los cuales el 3.92% (2/51) resultaron positivos a la presencia del gen *inv A* característico del género *Salmonella*, este porcentaje concuerda con lo encontrado por Abdel-Aziz, N., quien reporta un 6.6% en las canales de pollo en Egipto y Espinal *et al.*, quienes reportaron un 16.2% en pollos expendidos en mercados y ventas callejeras del caribe colombiano (Abdel-Aziz, N., 2016 y Espinal *et al.*, 2006).

Los resultados de la determinación de los indicadores microbiológicos indican que para la determinación de BMA en el rastro, ninguna de las muestras de pollo estuvo fuera de norma, por el contrario, en las distribuidoras el 16.7% de las muestras incumplía la normatividad de acuerdo con los valores de referencia descritos en el proyecto de Norma Oficial Mexicana 087, que indica como rango aceptable valores menores a 10 000 000 UFC/g, esto concuerda con lo descrito por Molina *et al.*, quienes en 2010 evaluaron la calidad sanitaria del pollo crudo que se expende en supermercados del área urbana de Mérida, Venezuela; donde separaron las muestras por industriales y no industriales, e indicaron que independientemente del lugar de expendio, casi todas las muestras no industriales fueron rechazadas, de acuerdo a los valores de referencia descritos en la normatividad venezolana

(COVENIN), la cual tiene como límite máximo, los mismos valores tomados que en la normatividad mexicana, mientras que en el estudio realizado en 5 mataderos del Estado Zulia (Venezuela) por Molero, G., se obtuvo un recuento de BMA, por encima de los valores permitidos, en el 40% de las canales; por lo que todo esto confirma la idea de que durante el transporte de las canales del rastro a las distribuidoras, así como la manipulación y almacenamiento en estas, existen puntos deficientes que influyen de manera importante en el incremento de la contaminación microbiana del producto. En el estudio de Molina *et al.*, también analizaron los recuentos de *S. aureus*, tomando como referencia la normatividad de otros países como Argentina, Nicaragua y Perú, debido a que no cuentan con criterios definidos para este indicador, sus resultados para pollos no industriales fueron consideradas como rechazados al comparar los recuentos con las normativas de esos países, en nuestro caso, los resultados del rastro indican que se encontraron en norma a diferencia de las distribuidoras, donde el 25% de las muestras no cumplieron la normatividad mexicana coincidiendo de manera parcial con su estudio. (Molero, 2012 y Molina *et al.*, 2010).

Para el caso de coliformes totales y fecales, estos superaron totalmente los valores contables para la prueba del NMP, debido a que en nuestro país aún no se encuentran definidos los valores para el conteo de coliformes en carne de pollo, se tomaron como referencia los valores emitidos en la Norma Técnica Nicaragüense 03 023-06, donde se establece como recuento máximo permitido valores de 1×10^3 NMP/g, y debido a que esta prueba fue usada como indicador de buenas prácticas higiénicas, se determinó que en todos los establecimientos existen prácticas deficientes. Lo anterior hace la diferencia en cuanto a los hallazgos por parte de Molina *et al.*, ya que describieron que una parte de las muestras no industriales se encontraban dentro de la normatividad de los países antes señalados. Como punto extra, en todas las muestras de pollo industrial se presentaron valores para bacterias mesofílicas aerobias, coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus* aceptables, independientemente de la norma con la cual se compararon, lo que efectivamente hace confirmar la deficiencia de buenas prácticas higiénicas tanto en el rastro como en las distribuidoras. (NTON 03 023-06, 2010 y Molina *et al.*, 2010).

En la detección de muestras positivas a *Salmonella* mediante el kit “*Salmonella detection*” (Mississippi State University), se determinó que reflejaban falsos positivos, ya que al ratificar la existencia de *Salmonella* por la PCR directa de las muestras, estos resultaron ser negativos.

Por otra parte, se corroboró por medio de la PCR de colonia, que las cepas presuntivas a *Salmonella* obtenidas por medio del método microbiológico fueron negativas a la presencia del gen, determinándose que no se aislaron cepas de *Salmonella*, totalmente contrario a lo reportado por Acosta *et al.*, que por inmunoensayo enzimático hallaron un 3.1 % de muestras positivas pero al confirmar con la PCR el porcentaje se elevó a 6.2 % de positividad, todo lo anterior concluye que la PCR es capaz de detectar células viables presentes en la muestra, así como células no cultivables por medio del ADN bacteriano (Acosta *et al.*, 2013).

11 CONCLUSIONES

1. La incidencia de *Salmonella spp* determinada en canales de pollo provenientes del rastro y distribuidoras de aves por medio de PCR punto final fue de 3.92%, mientras que por cultivo microbiológico fue de 0%.
2. Los pollos procedentes del rastro de aves cumplen con los requerimientos para estar dentro de norma, por el contrario, en las distribuidoras existen deficiencias que influyen en la contaminación del producto contribuyendo al incumplimiento de la normatividad.
3. Se lograron aislar cepas presuntivas a *Salmonella* por medio del método microbiológico, sin embargo, al confirmarlas fueron negativas.
4. Se estandarizó la técnica de PCR para la detección de *Salmonella spp* en carne de pollo.
5. No se detectaron resultados confiables mediante el kit "*Salmonella detection*" (Mississippi State University).
6. La técnica de PCR resultó ser útil para detectar *Salmonella* directamente de las muestras de carne de pollo con un corto periodo de enriquecimiento siendo más sensible, específica y confiable que el cultivo microbiológico con el cual se obtuvieron resultados negativos en cada una de las muestras.
7. La incidencia de *Salmonella* resultó ser baja, pero no debe menospreciarse su presencia en este producto, ya que representa un riesgo potencial como fuente de infección al consumidor si no se toman las medidas necesarias para su procesamiento y consumo.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera, B. y Jabib, R. (2015). Salmonellosis zoonosis of birds and a very particular pathogenesis. *Revista Electronica de Veterinaria*, 16: 39-50.
2. Kopper, G., Calderón G., Schneider S., Domínguez W. y Gutiérrez G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. FAO. Roma.
3. OMS. (2013). *Salmonella* (no tifoidea). Nota descriptiva N°139. Fecha de recuperación: 10 de enero 2016. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
4. Muñoz, F. (2014). Generalidades de las intoxicaciones, infecciones y toxiinfecciones producidas por alimentos contaminados en Costa Rica. FAO. Fecha de recuperación: 20 de diciembre 2015. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
5. Secretaría de Salud y Asistencia. (2006). NMX-FF-080-SCFI-2006. PRODUCTOS AVÍCOLAS – CARNE DE POLLO DE ENGORDA EN CANAL Y EN PIEZAS – CLASIFICACIÓN (CANCELA A LA NMX-FF- 080-1992). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 03 de abril 2006. Fecha de recuperación: 26 de agosto 2016. Recuperado de: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/87NOM.pdf>
6. Ellingson J.L.E., Anderson J.L., Carlson S.A. y Sharma V.K. (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol. Cell. Probes*, (18): 51–57.
7. OMS. (2015). Inocuidad de los alimentos. Nota descriptiva N°399. Fecha de recuperación: 16 de noviembre 2016. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
8. Fernández, E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. Primera Edición. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
9. Madigan, T., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. (2009). Brock. Biología de los microorganismos. Duodécima edición. España: Pearson.

10. Levin, R. (2009). The Use of Molecular Methods for Detecting and Discriminating *Salmonella* Associated with Foods. *Food Biotechnology*, (23): 313–367.
11. Figueroa, I. y Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol.*, 47 (1-2): 25-42.
12. Jarquin, R., Hanning, I., Ahn, S., y Ricke, S. (2009). Development of Rapid Detection and Genetic Characterization of *Salmonella* in Poultry Breeder Feeds. *Sensors*, (9): 5308-5323.
13. Linder, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. España: Acribia.
14. Frazier, W. y Westhoff, D. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Cuarta edición. España: Acribia.
15. Arias, M.L., Utzinger, D., Antillón, F. Y Glenn, E. (1996). Natural presence of the bacterium *Salmonella* sp. in hen eggs consumed in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 44(2): 891-893.
16. Murray, P., K. Rosenthal, M. Pfaller. (2006). *Microbiología médica*. Quinta edición. España: Elsevier.
17. Koneman, E., S. Allen, W. Janda, P. Schreckenberger, W. Winn. (2001). *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta edición. España: Editorial Médica Panamericana.
18. Fernández, E. 2008. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Segunda edición. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
19. García, C. (2014). Identificación de especies de *Brucella* mediante PCR múltiple en quesos artesanales no pasteurizados en mercados de la ciudad de Puebla. Tesis de Licenciatura en QFB, BUAP. Puebla. México. 21 p.
20. Madigan, M., J. Martinko, P. Dunlap, D. Clark, D. Brock. (2009). *Biología de los Microorganismos*. Doceava edición. España: Pearson.
21. Chacón, L., Barrantes, K., García, C., Achí, R. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen *inv A* de *Salmonella spp* en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Venezuela, 30(1): 18-23.
22. Martínez, A. N. (2007). Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella entérica*. Memoria de Doctorado.

Universidad de Oviedo. España.

23. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2): 70-78.
24. Bolivar, A., Rojas, A. y Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol). *Avances en Biomedicina: Instituto de Inmunología Clínica*, 3(1): 25-33.
25. Morales, D. y Gallo, L. (2006). Plataformas de proteómica. UNAM: Instituto de Biotecnología. México.
26. Farina H., Ripoll G. y Gasparri J. (2012). TP3: Electroforesis en gel de poliacrilamida. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.
27. Acosta, L., Pinedo, E. y Villarreal, J. (2013). Comparación de los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado (VIDAS) y PCR para la detección de *Salmonella spp* en expendios de la ciudad de Santa Marta (Colombia). *Salud Uninorte*, 29 (2): 174-182.
28. Talavera, M., Reyes, N., Lagunas, S., Fernández, P., Morales, V., y Soriano, E. (2011). Variabilidad genética de aislamientos de *Salmonella typhimurium* (grupo B) obtenidos de hígados de pollo destinados para consumo humano. *Rev Mex Cienc Pecu*, 2(4): 371-380.
29. Alves J., Vieira, V., Protasio Pereira L., Yoko Hirooka E. and Rocha Moreira C. (2012). Multiplex PCR for the detection of *Campylobacter spp* and *Salmonella spp* in chicken. *Journal of Food Safety*, (32): 345–350.
30. Saeki E.K., Alves J., Bonfante R.C., Hirooka E.Y., and De Oliveira T.C.R.M. (2013). Multiplex PCR (mPCR) for the Detection of *Salmonella spp* and the Differentiation of the Typhimurium and Enteritidis Serovars in Chicken Meat. *Journal of Food Safety*, 33(1): 25-29.
31. OMS. (2015). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión

- alimentaria. Comunicado de Prensa. Fecha de recuperación: 15 de enero 2016. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>
32. Castañeda Ma., Braña D., Rosario C. y Martínez W. (2013). Calidad Microbiológica de la Carne de Pollo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. SAGARPA- CONACYT.
33. Núñez, M. (2012). La Guerra del Pollo. CNN Expansión. Fecha de recuperación: 27 de enero 2016. Recuperado de: <http://www.cnnexpansion.com/expansion/2012/03/09/la-guerra-del-pollo>
34. Alonso, R. (2009). Ven agresiva competencia por el mercado del pollo. El Universal. Fecha de recuperación: 27 de enero 2016. Recuperado de: <http://archivo.eluniversal.com.mx/finanzas/73730.html>
35. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). NOM-109-SSA1-1994, PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA, MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 26 de mayo de 1994. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día. Fecha de recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>
36. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). NOM- 110-SSA1-1994. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 10 de mayo 1995. Fecha de recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
37. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 10 noviembre de 1995. Fecha de

- recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
38. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NUMERO MÁS PROBABLE. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 10 de mayo 1995. Fecha de recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html>
39. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 10 de mayo 1995. Fecha de recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html>
40. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). NOM-114-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Salmonella* EN ALIMENTOS. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 22 de septiembre 1995. Fecha de recuperación: 24 de agosto 2015. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>
41. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). Proyecto de Norma Oficial Mexicana. NOM-087-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. AVES FRESCAS REFRIGERADAS Y CONGELADAS ENTERAS Y TROCEADAS ENVASADAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 24 octubre 1994. Fecha de recuperación: 26 de agosto 2016. Recuperado de:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4754851&fecha=24/10/1994
42. Secretaría de Salud y Asistencia. (1994). NOM-034-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA CARNE. CARNE MOLIDA Y CARNE MOLIDA MOLDEADA. ENVASADAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 8 marzo 1995. Fecha de recuperación: 26 de agosto 2016. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/034ssa13.html>
43. Espinal, P., Prieto, E., Otero, V., y Máttar, S. (2006). Presencia del gen de invasividad *inv A* en cepas de *Salmonella spp*: aisladas de alimentos del Caribe Colombiano /

Presence of the invasive gene *inv A* in *Salmonella* spp: strains isolated from food in several cities of the Colombian Caribbean area. *Revista Cubana De Salud Pública*, (2), 0.

44. Abdel-Aziz, N. M. (2016). Detection of *Salmonella* species in chicken carcasses using genus specific primer belong to *inv A* gene in Sohag city, Egypt, *Veterinary World*, 9(10): 1125-1128.
45. Molina, N., Millán, B., y Araque, M. (2010). Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella enterica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela. *Infectio*, 14:174-185.
46. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Norma Venezolana. COVENIN 2343-86. Norma Obligatoria. Pollo Beneficiado. Publicada en 1986. Fecha de recuperación: 18 de noviembre de 2016. Recuperado de: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/action/normas-find>
47. Molero, G. (2012). Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos del estado Zulia, Venezuela. Tesis de para obtener el grado de Doctor en Veterinaria, IDEP. Córdoba. España.
48. Comité Técnico de Alimento. NORMA TÉCNICA OBLIGATORIA NICARAGÜENSE. NTON 03 023-06. POLLO BENEFICIADO LISTO PARA COCINAR (POLLO CRUDO) ENTERO Y EN CORTES, Y SUS MENUJOS. Publicada en La Gaceta No. 88 el día 12 de Mayo del 2010. Fecha de recuperación: 18 de noviembre de 2016. Recuperado de: [http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf/\(\\$All\)/03BAB53AC74D48060625773D005D8DA2?OpenDocument](http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf/($All)/03BAB53AC74D48060625773D005D8DA2?OpenDocument)