

Técnica de PCR estandarizada para la detección de *Salmonella* Typhimurium en carne de cerdo, res y pollo

Rosas-Espejel, Monzerrat¹; Hernández-Sánchez, David^{1*}; Miranda-Jiménez, Leonor¹,
Ramírez-Guzmán, Martha Elva²; Pinto-Ruiz, René³; Leyva-Ruelas, Gabriel⁴

¹ Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, CP 56264, Estado de México, México.

² Programa de Estadística, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, CP 56264, Estado de México, México.

³ Facultad Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma de Chiapas, Villaflores, 30470, Chiapas, México.

⁴ Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, 56227, Estado de México, México.

* Autor de correspondencia: sanchezd@colpos.mx

Problema

Los productos cárnicos se encuentran entre los alimentos de origen pecuario que implican alto riesgo para la salud humana. De los patógenos más conocidos y de gran importancia en las enfermedades asociadas a los alimentos, es el serotipo *Salmonella* Typhimurium, responsable de alrededor de un tercio de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos de etiología bacteriana en el mundo, y uno de los patógenos relacionado con brotes en carne de cerdo, res y pollo. La identificación de esta bacteria en los alimentos se realiza por métodos microbiológicos convencionales (Figura 1) que requieren de 2 a 3 días para la identificación preliminar y más de una semana para la confirmación del patógeno. Por lo anterior, es necesario implementar métodos alternativos que proporcionen ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección, con el fin de prevenir la ocurrencia de enfermedades transmitidas por alimentos en los consumidores.

Solución planteada

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) permite detectar con rapidez y exactitud la presencia de microorganismos patógenos en la carne. Por lo anterior, se estandarizó la técnica de PCR para el diagnóstico rápido y sensible de *S. Typhimurium*, para determinar la presencia/ausencia en muestras de cerdo, res y pollo comercializadas en el municipio de Texcoco.

Cómo citar: Rosas-Espejel, M., Hernández-Sánchez, D., Miranda-Jiménez, L., Ramírez-Guzmán, M. E., Pinto-Ruiz, R., & Leyva-Ruelas, G. (2024). Técnica de PCR estandarizada para la detección de *Salmonella* Typhimurium en carne de cerdo, res y pollo. *Agro-Divulgación*, 4(6). <https://doi.org/10.54767/ad.v4i6.388>

Editores académicos: Dra. Ma. de Lourdes C. Arévalo Galarza y Dr. Jorge Cadena Iñiguez.

Publicado en línea: Octubre 2024.

Agro-Divulgación, 4(6). Suplemento. 2024. pp: 23-26.

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International



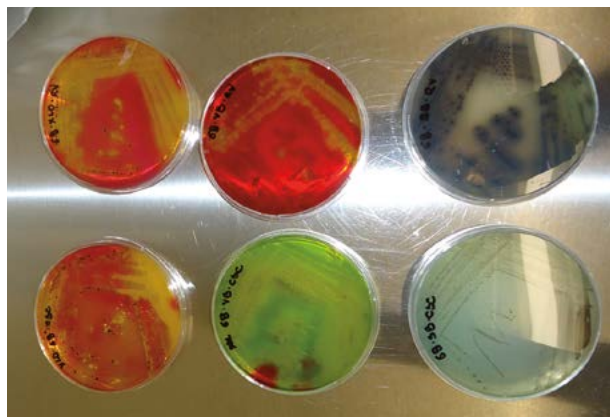


Figura 1. Método microbiológico para determinar *Salmonella* Typhimurium.

Se recolectaron un total de 60 muestras en puntos de venta de la ciudad de Texcoco, estado de México. El muestreo se repitió tres veces en cada punto de venta, a intervalos de 15 días. La detección de *Salmonella* por el método microbiológico convencional se realizó conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014; y para la técnica de PCR, la extracción de ADN de las muestras se hizo con el kit comercial Wizard® Genomic ADN Purification (Promega®, USA), posteriormente, se realizaron ensayos de PCR para la amplificación de los genes *invA* y *fliC* (Figura 2), para lo cual se llevó a cabo un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min, 30 ciclos a 95 °C durante 1 min de desnaturalización, 1 min a 60 °C de hibridación-extensión y un ciclo final de extensión de 1 min a 72 °C. Finalmente, se realizó un gradiente de disociación desde 55 °C hasta 95 °C, por un periodo de 30 s. En todas las pruebas, los productos amplificados se evaluaron en un gel de agarosa al 2%, usando el digesto ϕ X174 como marcador de peso molecular.

Los resultados de la comparación del método microbiológico y el de la PCR para detectar *S. Typhimurium* en muestras de carne de cerdo, res y pollo, se presentan en el Cuadro

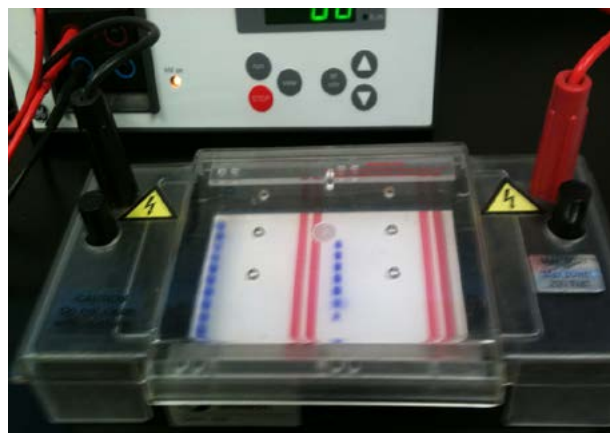


Figura 2. Amplificación de los genes *invA* y *fliC* para la detección *Salmonella* Typhimurium mediante reacción en cadena de la polimerasa.

1. Para estimar el grado de concordancia (similitud) entre ambas metodologías se calculó el Índice Kappa (κ), una vez removida la similitud debido al azar. No existió diferencia ($p>0.05$) entre los métodos evaluados para las muestras de carne de cerdo, res y pollo positivas a *Salmonella*, al existir un nivel de concordancia (similitud) entre los resultados de ambas metodologías de 88% (Cuadro 1). De acuerdo con los valores de “ κ ”, se obtuvo un grado de concordancia entre los métodos “casi perfecto”, indicando la similitud entre el método microbiológico y el de PCR para la detección de *S. Typhimurium*.

Posteriormente, se procedió a calcular la probabilidad *a posteriori* de la detección de PCR, en función de la detección del método microbiológico, mediante el teorema de Bayes (Cuadro 2). Las probabilidades condicionales de Bayes indican que cuando el método microbiológico detectó *Salmonella*, el método de PCR la detectó al 100%, mientras que cuando no hubo detección por el método microbiológico, la PCR alcanzó a detectar *Salmonella* en 1.79%. Lo anterior, revela que el método de PCR resultó más eficaz al detectar muestras con *S. Typhimurium*, no detectadas con el método microbiológico. Esto, se debe a la mayor sensibilidad y especificidad de la PCR al detectar muestras positivas, reportadas como negativas con los métodos microbiológicos convencionales.

Existen varias razones que explican porque una muestra se detecta positiva mediante PCR y negativa por el método microbiológico. Entre estas, es posible que las células bacterianas presentes en las muestras de carne se encuentren dañadas por el uso de productos de saneamiento o las condiciones de almacenamiento (cadena de frío), ocasionando la muerte celular de *Salmonella*, y a su vez la incapacidad de detectar el crecimiento del patógeno al

Cuadro 1. Índice de kappa (κ) para la detección de *Salmonella Typhimurium* en muestras de carne de cerdo, res y pollo ($n=60$).

	PCR	Microbiológico		Total
		Presencia	Ausencia	
PCR	Presencia	4 (a)	1 (b)	5 ($r=a+b$)
	Ausencia	0 (c)	55 (d)	55 ($s=c+d$)
	Total	4	56	60 ($N=a+b+c+d$)
		($t=a+c$)	($u=b+d$)	$k=0.88$

Cuadro 2. Probabilidad condicional de una detección positiva por PCR (PCR+) dado un resultado positivo del método microbiológico (M+) y de una PCR+ dado un resultado microbiológico negativo (M-).

	PCR	Probabilidad conjunta		
		Microbiológico		
		M+	M–	
PCR	PCR +	0.0667	0.0167	0.0833
	PCR –	0.0000	0.9167	0.9167
		0.0667	0.9333	1.0000
		Probabilidad condicional		
	P(PCR + /M+)=P(PCR + Ç M+)/P(M+)=			1.0000
	P(PCR + /M–)=P(PCR + Ç M–)/M–)=			0.0179

utilizar el método microbiológico; por el contrario, la PCR sólo requiere la presencia de ADN. Otro factor implícito en el grado de concordancia entre los métodos evaluados es la baja selectividad de los medios de cultivo utilizados en la técnica microbiológica convencional, lo cual afecta la sensibilidad y especificidad. Para mejorar la efectividad de esta técnica, en el caso de *Salmonella*, se ha introducido el medio Rappaport-Vassiliadis Modificado semisólido (MRSV), como medio de enriquecimiento, demostrando más sensibilidad que el caldo Rappaport-Vassiliadis, utilizado en el método estándar, debido a que diluye las sustancias inhibitoras de la PCR y reduce la carga bacteriana competitiva en la muestra. Actualmente, el MRSV es recomendado por el laboratorio de referencia de USA y la Autoridad Europea de Inocuidad Alimentaria (EFSA), para la detección de *Salmonella*. En México, la norma NOM-210-SSA1-2014, en la cual se basó el presente estudio, contempla el medio Rappaport-Vassiliadis Algunos laboratorios de referencia de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) incluyen el uso de MRSV para el aislamiento e identificación de *Salmonella* en carne, aves de corral y productos de huevo.

Retribución social

Esta técnica de PCR estandarizada para la detección de *Salmonella* Typhimurium en carne de cerdo, res y pollo, se encuentra a disposición y uso de productores y comercializadores de carne. Se agradece el apoyo de la LGAC “Ganadería eficiente, bienestar sustentable y cambio climático” del Colegio de Postgraduados.

Agradecimientos

A la LGAC: Ganadería Eficiente, Bienestar Sustentable y Cambio Climático (PREGEP-Ganadería, Campus Montecillo), del Colegio de Postgraduados.

Innovaciones, impactos e indicadores

Nivel de innovación	Descripción	Transferido	Impacto		Indicador general de políticas públicas	Indicadores específicos	Subindicador
			Sector	Ámbito			
Procesos	Implementación de una nueva o significativa mejora de un método de producción o de suministro. La técnica de PCR permite detectar con mayor rapidez, eficiencia y sensibilidad la presencia de Salmonella Typhimurium en la carne.	Asociaciones de Productores Gobierno de los Estados Productores independientes	Primario: Agricultura, Ganadería, Pesca, Explotación forestal, Minería Procesos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+I)	Social Económico	Ciencia y Tecnología Salud Pública	Competitividad Comercio	Transferencias tecnológicas Desarrollo de productos y servicios para la sociedad Exportación incremento (%) Aplicación de técnicas y conocimientos tecnológicos para el desarrollo social y económico Reducción de mortalidad