

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Inocuidad bacteriológica en camarón para exportación en México

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.medigraphic.com

Inocuidad bacteriológica en camarón para exportación en México*

Bacteriological harmlessness in mexican export shrimp

Lisette Pérez Casas** José Fernando Núñez Espinosa** Daniel A. Villagómez Zavala***
Mireya Nicoli Tolosa** María Salud Rubio Lozano†

Abstract

The objective of this work was to investigate the safety of export shrimp in Mexico detecting simultaneously *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1 using the PCR-RFLP and standard microbiological methods. Segments of DNA localized in the *inv A* gene of *Salmonella* spp and *ctx AB* gene of *Vibrio cholerae* O1, were amplified in the PCR reaction. Samples of raw, frozen and headless shrimp from two certified exportation packing plants from Sinaloa, Mexico, were collected from October to December of 1999. Both microbes were detected under the following conditions: one cycle for denaturalization at 94°C for 5 min, thirty cycles for alignment (94°C for 30 sec; 58°C for 30 sec and 72°C for 30 sec); and 72°C for 5 min was used for final extension. From the 60 samples analyzed for both methods, none of them were positive to either one of these microorganisms.

Key words: PCR, SHRIMP, SALMONELLA SPP, VIBRIO CHOLERAЕ O1.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue conocer la inocuidad en camarón de exportación en México, al detectar de manera simultánea *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1 mediante la técnica PCR-RFLP, conjuntamente con métodos microbiológicos convencionales. Para la reacción de PCR se ampliaron segmentos de ADN localizados en el gen *inv A* de *Salmonella* spp y el gen *ctx AB* de *Vibrio cholerae* O1. Las muestras de camarón crudo, sin cabeza y congelado, se colectaron de dos empacadoras certificadas para exportación, ubicadas en Sinaloa, México, durante octubre a diciembre de 1999. Las condiciones para la detección de ambos microbios fueron: un ciclo a 94°C durante 5 min para la desnaturalización, para la alineación temperatura de 94°C por 30 seg; 58°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, durante 30 ciclos; para la extensión final la temperatura fue de 72°C por 5 min. De las 60 muestras analizadas, por ambos métodos, ninguna fue positiva para los microorganismos estudiados.

Palabras clave: PCR, CAMARÓN, SALMONELLA SPP, VIBRIO CHOLERAЕ O1.

Recibido el 23 de septiembre de 2004 y aceptado el 30 de marzo de 2005.

*Este trabajo es resultado de la tesis de maestría del primer autor.

**Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Centro de Biotecnología Animal, Rancho Cofradía, Universidad de Guadalajara, Carretera a San Isidro Mazatepec, km 7.5, Tlajomulco de Zúñiga, 45140, Jalisco, México.

Autor responsable: José Fernando Núñez Espinosa, Tel. (55) 5622-5858, Fax: (55) 5622-5931, fer@fmvz.unam.mx

†Laboratorio de Ciencia de la Carne, Centro de Enseñanza Práctica, Investigación en Producción y Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cruz Blanca 241, San Miguel Topilejo, 14500, México, D. F.

Nota: Este trabajo fue financiado por el PAPIIT y la OIEA.

Introduction

In Mexico, the consumption of fishing products in 1997 was that of 1 227 919 tons, of which 36 857 (5.66%) were shrimps.^{1,2} The contamination of this product by pathogen microorganisms turned it to an important source of food transmitted diseases (FTD). In 1999,^{3,4} there were 163 outbreaks of FTD, in which 2 427 persons were determined sick and 9 died; in 2000⁵ there were 191 outbreaks notified with 4,771 sick and 17 dead. The analysis of this report indicated that the outbreaks associated with fish and shellfish was of 6.3%, which meant fourth place among food involve in outbreaks of FTD.⁵ In relation to the ethological agents, only in 53% of the outbreaks, the nature or type of sickness were identified; 12.9 % were bacteria origin, and 1.1% represented gastroenteritis of unknown origin.⁵

For its implication in public health, *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1 are found among the principle pathogen microorganisms as harmless indicators of export sea products, their specific control is required in frozen shrimp commerce.^{1,2} The *Salmonella* spp was the casual infectious agent that occupied third place with ten outbreaks.⁵ Specifically, the paratyphoid incidences and other salmonellosis in 1996-2000 had variances in their tendency, presenting 163.01 cases per one hundred thousands habitants in 1996; 203.70 in 1997; 223.53 in 1998; 186.15 in 1999; and 95.07 in 2000 with 93, 738 notified cases in this last year.⁶

The seventh cholera epidemic caused by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, affected the American continent and was initiated in 1961. In Peru, it presented in January of 1991 and was rapidly diffused to Central America. Mexico was affected in June of 1991; many cases of cholera have occurred in the United States until 1999 among travelers to that country, from the affected areas where they have consumed contaminated food.⁷ In Mexico, from 1996 to 2000, the incidence of cholera has diminished; thus, there are 1.17 cases per one hundred thousand habitants in 1996; 2.49 in 1997; 0.07 in 1998; 0.01 in 1999; and 0.01 in 2000 with five cases described in that year.⁶

The pathogen microorganisms associated with this type of food are identified with cultured methods and biochemical tests, which normally takes five to seven days.⁸ The DNA amplifications based on PCR have increased the velocity in which these pathogens are detected.⁹⁻¹¹ Besides, the simultaneous amplification in only one reaction of DNA of various food pathogens has made more efficient the process of detection.^{12, 13} The objective of this study was to apply a molecular protocol (PCR) for the simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1 in samples of frozen

Introducción

En México el consumo de productos pesqueros en 1997 fue de 1 227 919 toneladas, de las cuales 36 857 (5.66%) fueron de consumo de camarón.^{1,2} La contaminación de éste por diversos microorganismos patógenos lo convierten en fuente importante de enfermedades transmitidas mediante los alimentos (ETA). En 1999^{3,4} se notificaron 163 brotes de ETA, en ellos se determinaron 2 427 personas enfermas y nueve defunciones; en 2000⁵ se informó de 191 brotes con 4 771 enfermos y 17 muertes. El análisis de estos informes indicó que el número de brotes asociados con el consumo de pescados y mariscos fue de 6.3%, lo que significó el cuarto lugar entre los alimentos más involucrados con brotes de ETA.⁵ En relación con los agentes etiológicos, sólo en 53% de los brotes se identificó su naturaleza o el tipo de padecimiento; 12.9% fueron de origen bacteriano y 1.1% representó gastroenteritis de origen desconocido.⁵

Por su implicación en la salud pública, *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1 se encuentran entre los principales microorganismos patógenos como indicadores de inocuidad en productos marinos de exportación, específicamente su control es requerido en el comercio de camarón congelado.^{1,2} La *Salmonella* spp fue el agente causal infeccioso que ocupó el tercer lugar con diez brotes.⁵ De manera especial, las incidencias de paratifoidea y otras salmonelosis en 1996-2000 tuvieron variación en su tendencia, presentando 163.01 casos por cien mil habitantes en 1996; 203.70 en 1997; 223.53 en 1998; 186.15 en 1999; y 95.07 en 2000 con 93 738 casos notificados en este último año.⁶

La séptima pandemia del cólera causada por *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor, afectó al continente americano e inició en 1961. En Perú se presentó en enero de 1991 y se propagó rápidamente hasta América Central. En Norteamérica, México se vio afectado en junio de 1991; muchos casos de cólera han ocurrido en Estados Unidos hasta 1999 entre viajeros a ese país, desde las áreas afectadas en donde han consumido alimentos contaminados.⁷ En México, de 1996 a 2000, las incidencias del cólera han disminuido; así, hay 1.17 casos por cien mil habitantes en 1996; 2.49 en 1997; 0.07 en 1998; 0.01 en 1999; y 0.01 en 2000 con cinco casos descritos en ese año.⁶

Los microorganismos patógenos asociados a este tipo de alimentos son identificados con métodos de cultivo y pruebas bioquímicas, lo cual regularmente toma de cinco a siete días.⁸ Las amplificaciones de ADN basadas en PCR han aumentado la velocidad con que estos patógenos son detectados.⁹⁻¹¹ Además, la amplificación simultánea en una sola reacción de ADN de varios patógenos de estos alimentos ha hecho

shrimp lots for the exportation of two Sinaloa, Mexico enterprises.

Material and methods

The study was done in two stages: the first experimental one was done with pure bacterial cultures, typified strains that were donated by the Laboratorio Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud, for the obtainment of DNA of both microorganisms. The conditions of cycles, times, and temperatures were determined for the PCR technique, using purified DNA, for the simultaneous replication of *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1. The second stage consisted of samples taken from shrimp plants and their analysis by PCR and standard microbiological methods.

Stage 1. PCR Method

Extraction of PCR crude genomic

For the extraction of crude DNA, pure strains of *Vibrio cholerae* O1 were cultivated in TINI agar and blood agar for *Salmonella* spp. After 24 hours various colonies were obtained; one was taken by throbbing the surface of the culture with the point of a micropipette (100 μ L), the cells were washed in a Eppendorf tube of 1.5 mL with 100 μ L of D buffer that contained : KCl, 50 mM; HCl tris; 10 mM; MgCl₂, 2.5 mM; NP 40, 0.45% and tween at 0.45% with K proteinase in a concentration of 8 mg/mL. The sample was incubated for an hour at 50°C and the enzyme was inactivated while incubating it at 90°C during ten minutes; later on, 1.5 μ L were obtained for the PCR technique (Figure 1).^{14,15}

más eficiente, el proceso de detección.^{12,13} El propósito de este trabajo fue aplicar un protocolo molecular (PCR) para la detección simultánea de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1 en muestras de lotes de camarón congelado para exportación de dos empresas de Sinaloa, México.

Material y métodos

El estudio se realizó en dos etapas; una primera de experimentación en que se trabajó con cultivos bacterianos puros, cepas tipificadas que fueron donadas por el Laboratorio Nacional de Salud Pública, de la Secretaría de Salud, para la obtención de ADN de ambos microorganismos. Se determinaron las condiciones de ciclos, tiempos y temperaturas para la técnica de PCR, empleando ADN purificado, para la replicación simultánea de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1. La segunda consistió en toma de muestras en plantas camaroneras y análisis de dichas muestras, mediante PCR y los métodos microbiológicos estándares.

Etapas 1. Método PCR

Extracción de ADN genómico crudo

Para la extracción de ADN crudo se sembraron cepas puras de las bacterias *Vibrio cholerae* O1 en agar TINI y agar sangre para *Salmonella* spp. Después de 24 horas se obtuvieron varias colonias; se tomó una haciendo pasar por la superficie del cultivo la punta de una puntilla de micropipeta (100 μ L), se lavaron las células en tubo eppendorf de 1.5 mL con 100 μ L de amortiguador D que contenía: KCL, 50 mM; tris HCl, 10 mM; MgCl₂, 2.5 mM; NP 40, 0.45% y tween al 0.45% con proteinasa K a una concentración de 8 mg/ml. Se

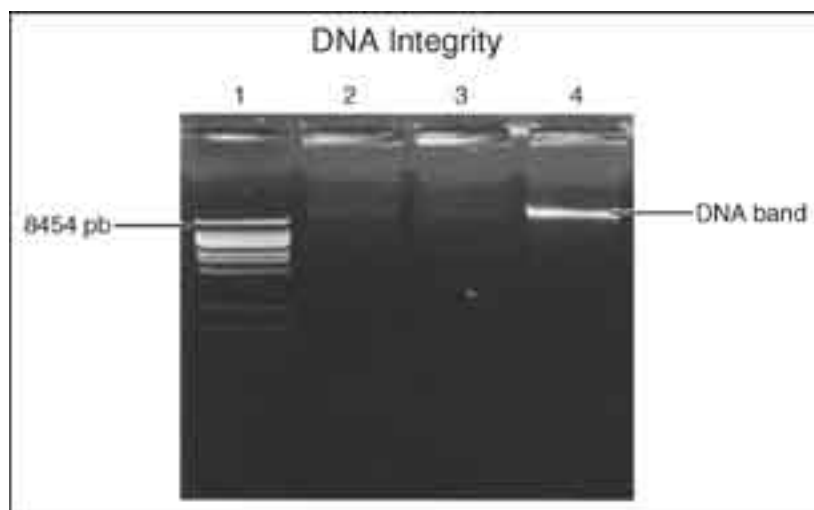


Figura 1. Integridad de ADN en gel de agarosa (1%), donde se observa una banda nítida de peso molecular alto (8 454 pb). Carril 1, marcador de peso molecular (Lambda DNA-BstE II Digest); carriles 2 y 3, ADN de *Vibrio cholerae* O1; columna 4, ADN de *Salmonella* spp.

Figure 1. DNA integrity in agarose gel (1%), where a clear band of high molecular weight (8454 pb) is observed. Lane 1, molecular weight marker (Lambda DNA-BstE II Digest); lanes 2 and 3, *Vibrio cholerae* O1's DNA; column 4, *Salmonella* spp's DNA.

PCR Technique

Proven initiators were used for the amplification of *inv A* gene of *Salmonella* spp¹⁶ and of the *ctx AB* gene of *Vibrio cholerae* O1,¹⁷ and tested in a combined or multiple PCR.

The PCR was done in standard conditions of volumes and concentrations of each of the reactors; once the DNA was obtained and quantified from each microorganism, the correspondent dilutions were made to reach a final concentration of 25 ng/μL; this was used for all the effectuated reactions.

The *inv A* gene, specific of the *Salmonella* gender, permits the enter of the bacteria into the epithelial cells of the host's intestine.^{16, 18} For the amplification of the *inv A* gene of *Salmonella* spp^{19,21} the following initiators were used: amplificatory gene, *inv A*; size of the PCR product, 285 pars of bases (pb); designation of the initiator; sequence of the initiator; INV A1, 5'-gTg AAA TTA TCg CCA CgT TCg ggC AA-3'; INV A2, 5'-TCA TCg CAC CgT CAA Agg AACC-3'.

For *Salmonella*, the temperature conditions and cycles in the thermocycler were of one cycle for denaturalization at 94°C for 5 min.; 30 cycles for the alignment at 94°C per 30 seconds, 53°C per one minute and 72°C per 30 seconds, and one final extension of one cycle in 72°C per 5 minutes.

For *Vibrio cholerae* O1 initiators of gene *ctx AB*^{22,24} were used, promoting the production of the choleric toxin that actuates over the mucous of the small intestine, provoking the characteristic diarrhea disease. This gene is a compound protein of a subunit A and five B, responsible of the fixation of the toxin to the receptor. Subunit B binds to the receptor GM1 in the cellular membrane of the small intestine epithelium. Likewise, the A is responsible for the activation of the adenylate-cyclase, which provokes the hypersecretion of salts and water.^{17,25} amplified Gene, *ctx AB*; and size of the product of PCR, 777 pb. Next, the designation of the initiator is described, as well as its sequence: *Vibrio* P1, 5'-TgA AAT AAA gCA gTC Agg Tg-3'; *Vibrio* P3, 5'-ggT ATT CTg CAC ACA AAT Cag-3'.

In relation to *Vibrio*, the temperature and cycle conditions, so the reaction takes place in the thermocycler, were of one cycle for the denaturalization at 94°C per 30 seconds, 55°C per 30 seconds, and 72°C per 30 seconds, and a final extension at 72°C per 5 minutes.

These sets of initiators were tested together to obtain a combined or multiple reaction, with the possibility to detect the DNA of whichever the cited microorganisms, from a unique reaction using the PCR technique. This is possible because the expected PCR products, for each microorganism, have different

incubó la muestra durante una hora a 50°C y se inactivó la enzima al incubar la muestra a 90°C durante diez minutos; posteriormente se tomaron 1.5 μl para la técnica de PCR (Figura 1).^{14,15}

Técnica de PCR

Se utilizaron iniciadores ya probados para la amplificación del gen *inv A* de *Salmonella* spp¹⁶ y del gen *ctx AB* de *Vibrio cholerae* O1,¹⁷ que fueron ensayados juntos en una PCR combinada o múltiple.

La PCR se realizó en condiciones estándares de volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos; una vez cuantificado el ADN obtenido proveniente de cada microorganismo, se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar una concentración final de 25 ng/μl; ésta se usó para todas las reacciones que se efectuaron.

El gen *inv A*, específico del género *Salmonella*, permite que la bacteria penetre en las células epiteliales del intestino del portador.^{16,18} Para la amplificación del gen *inv A* de *Salmonella* spp¹⁹⁻²¹ se emplearon los siguientes iniciadores: Gen amplificado, *inv A*; tamaño del producto de PCR, 285 pares de bases (pb); designación del iniciador, secuencia del iniciador; INV A1, 5'-gTg AAA TTA TCg CCA CgT TCg ggC AA-3'; INV A2, 5'-TCA TCg CAC CgT CAA Agg AACC-3'.

Para *Salmonella*, las condiciones de temperatura y ciclos en el termociclador fueron de un ciclo para la desnaturalización a 94°C por 5 min; de 30 ciclos para el alineamiento a 94°C por 30 seg, 53°C por un min y 72 C por 30 seg, y una extensión final de un ciclo a 72°C por 5 min.^{20,21}

Para *Vibrio cholerae* O1 se usaron los iniciadores del gen *ctx AB*,²²⁻²⁴ que promueve la producción de la toxina colérica que actúa sobre la mucosa del intestino delgado, provocando la diarrea característica de la enfermedad. Este gen es una proteína compuesta de una subunidad A y cinco B, responsables de la fijación de la toxina al receptor. La subunidad B se une al receptor GM1 en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. Por su parte, la A es responsable de la activación del adenilato-ciclasa, que provoca la hipersecreción de sales y agua.^{17,25} Gen amplificado, *ctx AB*; y tamaño del producto de PCR, 777 pb. Enseguida se describe la designación del iniciador, así como su secuencia: *Vibrio* P1, 5'-TgA AAT AAA gCA gTC Agg Tg-3'; *Vibrio* P3, 5'-ggT ATT CTg CAC ACA AAT Cag-3'.

Respecto de *Vibrio* las condiciones de temperatura y ciclos para que se realice la reacción en el termociclador, fueron de un ciclo, para la desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos para una alineación a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, y una extensión final a 72°C por 5 min.

molecular sizes (pb). The number of cycles, temperatures and times for the reaction in the thermocycler, were adjusted in such a way that the initiators of *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* functioned in the same reaction and in only one microtube, standardizing the amplification in 28 hours (24 hours of pre-enrichment and four hours for the PCR). This reaction was done in a final volume of 18.25 μ L with the following reactors: buffer solution of PCR (1.0 mM tris-Cl, 1.5 mM $MgCl_2$ and 50 mM KCl, pH 8.3), 100 μ M of each dNTP, 1.4 pM of each initiator, 2 U of taq-polymerase,* 1 μ g of DNA and sterile water.¹⁴

In order to observe the resultant products of the PCR, agarose gels at 1% were elaborated in a solution of TBE at 0.5x.

An important factor was evaluated in this study was the specificity of the selected genomic sequences of both microorganisms (Figure 2 and 3), due to different bacteria species that have been described as possessors of the toxin or protein which causes the disease. Rahn *et al.*²¹ had great success amplifying the A inv gene in 626 different *Salmonellas* by the PCR

Estos juegos de iniciadores fueron ensayados juntos para lograr una reacción combinada o múltiple, con la posibilidad de detectar el ADN de cualesquiera de los microorganismos mencionados, a partir de una reacción única con la técnica de PCR. Esto último es posible debido a que los productos del PCR esperados, para cada microorganismo, tienen tamaños moleculares diferentes (pb). El número de ciclos, temperaturas y tiempos para la reacción en el termociclador, se ajustaron de manera que los iniciadores de *Salmonella* spp y los de *Vibrio cholerae* funcionaron en la misma reacción y en un solo microtubo, estandarizando así la amplificación en 28 horas (24 horas de preenriquecimiento y cuatro horas para la PCR). La reacción de ésta se realizó en un volumen final de 18.25 μ l con los siguientes reactivos: Solución amortiguadora de PCR (1.0 mM tris-Cl, 1.5 mM $MgCl_2$ y 50 mM KCl, pH 8.3), 100 μ M de cada dNTP, 1.4 pM de cada iniciador, 2 U de taq-polimerasa,* 1 μ g de ADN y agua estéril.¹⁴

Para observar los productos resultantes de la PCR se elaboraron geles de agarosa al 1% en una solución de TBE al 0.5x.



Figura 2. Especificidad de *Salmonella* spp. Resultados negativos con ADN de varios microorganismos. Carriles 1 y 8, marcador de peso molecular (Lambda DNA-BstE II Digest); carril 2, ADN de *E. coli*; carril 3, ADN de *Vibrio cholerae* O1; carril 4, ADN de *Yersinia* spp; carril 5, ADN de *Shigella* spp; carriles 6 y 7, ADN de *Salmonella* spp.

Figure 2. *Salmonella* spp's specificity. Negative results with DNA from various microorganisms. Lane 1 and 8, molecular weight marker (Lambda DNA-BstE II Digest); lane 2, *E.coli*'s DNA; lane 3, *Vibrio cholerae* O1's DNA; lane 4, *Yersinia* spp's DNA; lane 5, *Shigella* spp's DNA; lanes 6 and 7, *Salmonella* spp's DNA.

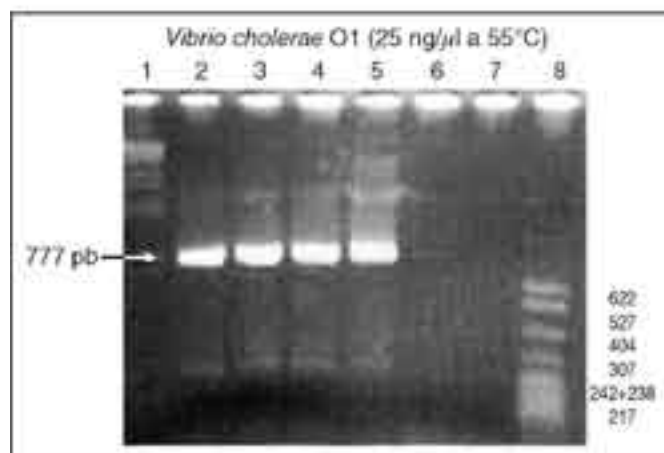


Figura 3. Especificidad de *Vibrio cholerae* O1. Resultados negativos con ADN de otros microorganismos. Carriles 1 y 8, marcador de peso molecular (Lambda DNA-BstE II Digest); carriles 2, 3, 4 y 5, ADN de *Vibrio cholerae* O1; carril 6, ADN de *Yersinia* spp; carril 7, ADN de *Salmonella* spp.

Figure 3. *Vibrio cholerae*'s specificity. Negative results with DNA of other microorganisms. Lanes 1 and 8, molecular weight marker (Lambda DNA-BstE II Digest); lanes 2, 3, 4, 5, *Vibrio cholerae* O1's DNA; lane 6, *Yersinia* spp's DNA; lane 7, *Salmonella* spp's DNA.

technique, as well as Chen *et al.*²⁶ who amplified this gene with 164 different species of *Salmonella*. In this study, the initiators were proven with other bacteria like *E.coli*, *Yersinia* spp, *Shigella* spp, and *Vibrio cholerae* O1, obtaining a negative result in every case, indicating the specificity of PCR.

Polymorphism of restriction fragments (RFLP)

To confirm if the product of amplification is the expected, it was digested with an enzyme of restriction that recognizes a sequence of specific nucleotides within the amplified gene of each microorganism. It was taken into account that this enzymes did not accomplished more than two cuts to obtain an adequate lecture and that they were not homologous between the genomic sequences of *Salmonella* spp and those of *Vibrio cholerae* O1.²⁷

In *Salmonella* spp, the amplification of *inv A* gene was digested with the Hha 1 enzyme, this recognizes the following four pairs of bases in the sequence 5'-GCG C-3'. In the case of *Vibrio cholerae* O1, the product of amplification *ctx AB* gene was digested by the enzyme Cla 1, which cuts when recognizes 5'-AT CGAT-3'.

For the restriction analysis, 8.5 µL of the sample of PCR were obtained, and 0.5 l of the enzyme and 1 µL of buffer were added; afterwards, it was homogenized and it was set at 37°C during one hour, the cut was observed in an agarose gel at 3%.⁸

Stage 2. Microbiological analysis

Sampling

The characteristics of the selected samples were: headless, raw and frozen shrimp designated for exportation. The samples were recollected in two packing plants located in Culiacan and Mazatlan, Sinaloa, Mexico, next to the northeast Pacific.

The criterion of inclusion for the selection of shrimp plants were: that the plant had to be certified for exportation; that it was capable of having a production capacity between two and 20 tons per week ; that its product denomination for its commerce presentation was: "headless frozen shrimp"; that the process was object of a regular sanitary control;^{28,29} and that the product proceeding came from maritime zones of production (bay or high seas) of the northeast Pacific coast of Mexico.

For the obtainment of a representative lot in each packing plant, the sanitary establishment conditions and hygienic manipulation practices done by the personal during the process, were verified. As result, it

Para este estudio un factor importante que se evaluó es la especificidad de las secuencias genómicas seleccionadas de ambos microorganismos (Figuras 2 y 3), debido a que diferentes especies bacterianas han sido descritas como poseedoras de la toxina o proteína causante de la enfermedad. Rahn *et al.*²¹ tuvieron éxito amplificando el gen *inv A* en 626 *Salmonelas* diferentes por la técnica de PCR, al igual que Chen *et al.*²⁶ al amplificar este gen con 164 especies diferentes de *Salmonella*. En este trabajo se probaron los iniciadores con otras bacterias como *E. coli*, *Yersinia* spp, *Shigella* spp, y *Vibrio cholerae* O1, dando un resultado negativo en todos los casos, indicando con ello la especificidad del PCR.

Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

Para confirmar si el producto de amplificación es el esperado, se digirió con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de nucleótidos específica dentro del gen amplificado de cada microorganismo. Se tomó en cuenta que estas enzimas no realizaran más de dos cortes para tener una adecuada lectura y que no fueran homólogas entre las secuencias genómicas de *Salmonella* spp y las de *Vibrio cholerae* O1.²⁷

En *Salmonella* spp la amplificación del gen *inv A* se digirió con la enzima Hha 1, ésta reconoce en la secuencia los siguientes cuatro pares de bases 5'-GCG C-3'. Para el caso de *Vibrio cholerae* O1, el producto de amplificación del gen *ctx AB* fue digerido por la enzima Cla 1, que corta cuando reconoce de 5'-AT CGAT-3'.

Para el análisis de la restricción se tomaron 8.5 µL de muestra de PCR, se le adicionaron 0.5 µL de enzima y 1 µL de amortiguador; posteriormente se homogeneizó y se dejó a 37°C durante una hora, el corte se observó en un gel de agarosa al 3%.⁸

Etap 2. Análisis microbiológico

Muestreo

Las características de las muestras seleccionadas fueron: camarón crudo descabezado y congelado, destinado a exportación. Las muestras se recolectaron en dos empacadoras localizadas en Culiacán y Mazatlán, Sinaloa, México, próximas al litoral del Pacífico noroeste.

Los criterios de inclusión para la selección de las plantas camaroneras fueron: que la planta estuviera certificada para exportación; que tuviera una capaci-

* Boheringer Mannheim.

was considered that the process was subjected to a regular sanitary control, which permitted to determine the sample size per lot and plant. The studied production lot was identified, its constituted units were enumerated and, with the alloyed table numbers, the sample units were randomly selected. Therefore, from one lot per packing plant, five boxes of 2.5 kg were obtained to complete ten boxes. Of each box, considering the bacteriological heterogeneous distribution, three analytic samples were taken.

The proceedings for the taking, management and transport of the samples, for the microbiological analysis of the shrimp, were done in accordance to the established in the Food Manual, of the Laboratorio Nacional de Salud Pública.³⁰

Microbiological cultured technique

The microbiological detection by culture means for *Salmonella* spp was done according to Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, "Consumer Services. Method for determination of *Salmonella* in food".³¹ For the *Salmonella* spp identification, cultures were made on Hektoen agar and xylosine-lysine desoxycholate (XLD), incubated during the same lapse of time and in the same temperature conditions as the liquid mediums.³¹

The suspicious colonies were biochemically tested in triple-sugar-iron agar (TSI) and lysine-iron agar (LIA), and their results were observed after 24 hours.

The microbiological test for *Vibrio cholerae* O1 was done as the established in the technical publication of the Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas (INDRE), using the TCBS and TINI mediums.^{32,33} The suspicious colonies were submitted to biochemical tests of triptone, oxidase and string (mucous thread) broth; and last, the positive colonies were serologically tested.

Results

As result of the experimental stage 1, a process was developed for the simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1 (Figure 4). The number of cycles, temperatures and times, for the thermocycler reaction, were adjusted so that the *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1 functioned in the same reaction and in one microtube. The conditions were that of one cycle for the denaturalization at 94°C during 5 minutes; for the alignment it was required a temperature of 94°C per 30 second, 58°C per 30 seconds, and 72°C per 30 seconds during 30 cycles; and for the final extension a temperature of 72°C per 5 minutes. With this multiple PCR methodology, there was no amplification fragments for *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1,

dad de producción de entre dos y 20 toneladas por semana; que la denominación del producto para su presentación comercial fuera: "camarón crudo, descabezado y congelado"; que el proceso estuviera sujeto a un control sanitario regular;^{28,29} y que la procedencia del producto fuera de zonas marítimas de producción (bahía o alta mar) del litoral Pacífico noroeste de México.

Para obtener una muestra representativa del lote en cada empacadora, se verificaron las condiciones sanitarias del establecimiento y las prácticas de manipulación higiénica realizadas por el personal durante el proceso. Como resultado, se consideró que el proceso estuvo sujeto a un control sanitario regular, que permitió determinar el tamaño de la muestra por lote y por planta. Se identificó el lote de producción sujeto de estudio, se enumeraron las unidades que lo constituían y, con la tabla de números aleatorios, se seleccionaron al azar las unidades muestrales. Así, de un lote por empacadora fueron tomadas cinco cajas de 2.5 kg, se obtuvieron diez cajas. De cada caja, considerando la distribución heterogénea de las bacterias, se tomaron tres muestras analíticas.

Los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras, para los análisis microbiológicos del camarón, se realizaron de acuerdo con lo establecido en el Manual para alimentos, del Laboratorio Nacional de Salud Pública.³⁰

Técnica de cultivo microbiológico

La detección microbiológica mediante cultivo para *Salmonella* spp se realizó conforme lo señala la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, "Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos".³¹ Para la identificación de *Salmonella* spp, transcurrido el tiempo, se procedió a sembrar en los medios agar Hektoen y en agar xilosina-lisina desoxicolato (XLD), siendo incubados durante el mismo lapso e iguales condiciones de temperatura que para los medios líquidos.³¹

A las colonias sospechosas se les realizaron pruebas bioquímicas en agar triple-azúcar-hierro (TSI) y agar lisina-hierro (LIA), cuyos resultados fueron observados luego de 24 horas.

El método de prueba microbiológico para *Vibrio cholerae* O1 se realizó conforme lo establecido en la publicación técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), utilizando los medios TCBS y TINI.^{32,33} A las colonias sospechosas se les realizaron pruebas bioquímicas de caldo tripton, oxidasa y *string* (hilo mucoso); por último, a las colonias positivas se les aplicaron pruebas serológicas.

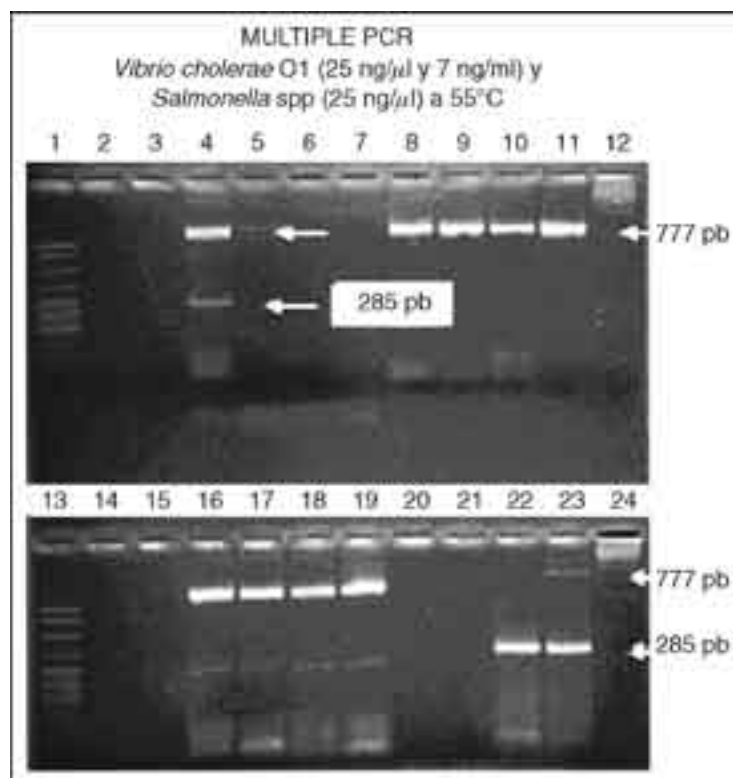


Figura 4. Amplificación simultánea de ADN de *Vibrio cholerae* O1 y *Salmonella* spp. Carriles 1, 12, 13 y 24, marcador de peso molecular (Lambda DNA-BstE II Digest). Carriles 4, 16, 17, 18 y 19, amplificación simultánea de ADN de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1; carriles 2 y 3, ADN de *E. coli*; carriles 5 y 14, testigo negativo; carriles 6 y 7, ADN de *Yersinia* spp; carriles 15 y 20, ADN de *Shigella* spp; carriles 8, 9, 10 y 11, ADN de *Vibrio cholerae* O1; carriles 22 y 23, ADN de *Salmonella* spp.

Figure 4. Simultaneous amplification of *Vibrio cholerae* O1's and *Salmonella* spp's DNA. Lanes 1, 12, 13 and 24, molecular weight marker (Lambda DNA-BstE II Digest). Lanes 4, 16, 17, 18 and 19, simultaneous amplification of *Salmonella* spp's and *Vibrio cholerae* O1's DNA; lanes 2 and 3, *E. coli*'s DNA; lanes 5 and 14, negative control; lanes 6 and 7, *Yersinia* spp's DNA; lanes 15 and 20, *Shigella* spp's DNA; lanes 8, 9, 10 and 11, *Vibrio cholerae* O1's DNA; lanes 22 and 23, *Salmonella* spp's DNA.

coinciding these results with the ones obtained from the official microbiological methods.

Table 1 shows the isolations of *Salmonella* spp in raw and frozen shrimp, originated from Culiacan and Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Of the isolations done in Culiacan, 18 suspicious colonies were selected from *Salmonella* spp. From the samples taken in Mazatlan, seven suspicious colonies of *Salmonella* spp were isolated. These colonies were biochemically tested for the identification of *Salmonella* spp. The isolated colonies of Culiacan were negative to *Salmonella* spp; nevertheless, they were positive to other coliforms, mainly to *Proteus* spp gender, which is important as an indicator of fecal contamination, probably originating toxic infections of food. For six of the seven suspicious colonies of *Salmonella* spp, of Mazatlan, the biochemical tests resulted negative. It can also be appreciated that out of box number four, a suspicious colony of *Salmonella* spp was isolate and resulted negative when serotyping. The results were positive for other coliforms, specially for *Acinetobacter* spp which is a steady aerobic bacteria and an important agent that alters seafood and poultry meat.³⁴

Table 2 shows the isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 in raw and frozen shrimp, originated from Culiacan and Mazatlan. In Culiacan samples it was observed that out of the five boxes, 22 (100%) suspicious *Vibrio* spp colonies were isolated from the TCBS medium. These were subjected to

Resultados

Como resultados de la etapa 1 de experimentación se desarrolló el procedimiento para la detección simultánea de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1 (Figura 4). El número de ciclos, temperaturas y tiempos, para la reacción en el termociclador, se ajustó de manera que los iniciadores de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1 funcionaron en la misma reacción y en un solo microtubo. Las condiciones fueron de un ciclo para la desnaturalización a 94°C durante 5 min; para la alineación se necesitó una temperatura de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 30 seg durante 30 ciclos; para la extensión final se utilizó una temperatura de 72°C por 5 min. Con esta metodología de PCR múltiple no se obtuvo amplificación de los fragmentos para *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por los métodos microbiológicos oficiales.

El Cuadro 1 muestra los aislamientos de *Salmonella* spp en camarón crudo y congelado, proveniente de Culiacán y Mazatlán, Sinaloa, México. De los aislamientos realizados en Culiacán se seleccionaron 18 colonias sospechosas de *Salmonella* spp. De las muestras tomadas en Mazatlán se aislaron siete colonias sospechosas de *Salmonella* spp. A estas colonias se les realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* spp. Las colonias aisladas de

Cuadro 1

ASLAMIENOS DE *Salmonella* spp. EN CAMARÓN CRUDO, CONGELADO, PROVENIENTE DE CULIACÁN Y MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO, 1999
ISOLATIONS OF *Salmonella* spp IN FROZEN RAW SHRIMP, ORIGINATED FROM CULIACAN AND MAZATLAN, SINALOA, MEXICO, 1999

Number of packs (analytic samples)	Enrichment Broths									
	Selected mediums					Biochemical Tests				
	Kauffman		Selenite-Cistine			Kauffman		Selenite-Cistine		
	XLD	HEKTOEN	SB	XLD	HEKTOEN	SB	LIA	TSI	LIA	TSI
1 (A-B-C)	1	3	0	0	0	0	-	-	-	-
2 (A-B-C)	0	2	0	0	0	0	-	-	-	-
3 (A-B-C)	2	2	0	1	2	0	-	-	-	-
4 (A-B-C)	1	2	0	0	1	0	-	-	-	-
5 (A-B-C)	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-
TOTAL	4	10	0	1	3	0				
1 (A-B-C)	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
2 (A-B-C)	0	0	0	1	1	0	-	-	-	-
3 (A-B-C)	0	1	0	1	1	0	+	+	+	+
4 (A-B-C)	1	2	0	1	1	0				
5 (A-B-C)	0	0	0	0	0	0				
TOTAL	1	3	0	3	3	0				

A-B-C Three analytic samples from a shrimp pack.

Numbers in each file represent the suspicious colonies of *Salmonella* spp and the zero at its absence in each of the cultivated selected mediums from the enrichment broths.

The negative (-) and positive (+) signs in each file correspond to the reactions of *Salmonella* spp. from the biochemical tests for its confirmation.

*While performing the serotyping with anti-serum *Salmonella* "O" poly A+VI factors 1-16, 19-25, 34 and VI, were negative.

biochemical tests (TINI, triptone, oxidase, string), finding that nine (41%) were *Vibrio* spp. While doing the serotyping for *Vibrio cholerae* O1, the samples were negative for this serotype. In the ones used for the detection of *Vibrio* in Mazatlan, out of 15 cultures made in TCBS,²⁴ (100%) suspicious colonies of *Vibrio* spp were isolated. While carrying out the biochemical tests (TINI, triptone, oxidase and string), for the identification of *Vibrio* spp, 19 (79%) were positive. But, while carrying out the serotyping, for the confirmation of *Vibrio cholerae* O1, all of them resulted negative.

Discussion

The results of the multiple PCR reaction coincide with the results obtained from the official microbiological methods. In a similar study carried out by Kumar *et al.*³⁵ on seafood (clams and shrimps) in a tropical zone of India, found that 20% of clams and 5% of shrimps were positive to *Salmonella* spp, as well as for bacteriological culture methods and PCR. This is related to

Culiacán resultaron negativas a *Salmonella* spp; sin embargo, fueron positivas a otros coliformes, principalmente del género *Proteus* spp, que es importante como indicador de contaminación fecal, pudiendo ocasionar toxiinfecciones alimentarias. Para seis de las siete colonias sospechosas de *Salmonella* spp, de Mazatlán, las pruebas bioquímicas resultaron negativas. También se puede apreciar que de la caja número cuatro se aisló una colonia sospechosa a *Salmonella* spp, que al realizarle la serotipificación resultó negativa. Los resultados fueron positivos para otros coliformes, principalmente *Acinetobacter* spp, que es una bacteria aerobia inmóvil y agente importante que altera la carne de mariscos y aves.³⁴

El Cuadro 2 muestra el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1 en camarón crudo y congelado proveniente de Culiacán y Mazatlán. En las muestras de Culiacán se observó que de las cinco cajas se aislaron 22 (100%) colonias sospechosas a *Vibrio* spp del medio TCBS. A éstas se les realizaron pruebas bioquímicas (TINI, triptona, oxidasa, *string*), encontrando que nueve (41%) fueron *Vibrio* spp. Al

Cuadro 2

AISLAMIENTOS E IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae* O1 EN CAMARÓN CRUDO CONGELADO, PROVENIENTE DE CULIACÁN Y MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO, 1999

ISOLATIONS AND IDENTIFICATION OF *Vibrio cholerae* O1 IN FROZEN RAW SHRIMP, ORIGINATED FROM CULIACAN AND MAZATLAN, SINALOA, MEXICO, 1999

Pre-Enrichment medium		Biochemical tests				
Number of packs (analytic samples)	TCBS	TINI	Triptone	Oxidase	String	Anti-serum <i>V. cholerae</i> O1 *
CULIACAN						
1 (A-B-C)	0	0				
2 (A-B-C)	4	4	4	4	2	-
3 (A-B-C)	3	3	3	3	3	-
4 (A-B-C)	11	11	11	0		
5 (A-B-C)	4	4	4	4	4	-
TOTAL	22	22	22	11	9	0/9
MAZATLAN						
1 (A-B-C)	3	3	3	3	3	-
2 (A-B-C)	5	5	4	2	2	-
3 (A-B-C)	4	4	4	4	4	-
4 (A-B-C)	26	6	5	5	5	-
5 (A-B-C)	06	6	5	5	5	-
TOTAL	24	24	21	19	19	0/9

A-B-C Three analytic samples from a shrimp pack. String (mucoses thread)

* Polyvalent serum *Vibrio cholerae* O1

Numbers in first row represent the suspicious colonies of *Vibrio* spp, from the culture in the pre-enrichment medium; the ones from the second, third, fourth and fifth columns, correspond to the *Vibrio* spp reactions, from the biochemical tests for its confirmation; and the negative signs (-) in the last column, indicate that it is not *Vibrio cholerae* O1

the hygiene conditions of the packing plant where the study was carried out and the water origin of the shrimp.

The results of *Salmonella* coincide with those of Hatha *et al.*,³⁶ who carried out a study in India on the microbiological quality of shrimps that came from a shrimp packing plant, where they found a very low incidence of *Salmonella* (0.1%) in raw and peeled shrimps.

In relation to *Vibrio cholerae* O1, the results indicated that there were none in the analyzed samples; nevertheless, with the presence of *Vibrio* spp it is indirectly interpreted the possible potential threat for our health, since it is indicative that, in any moment, the product may be exposed to contamination with *Vibrio cholerae* O1, this one can survive for a long period of time in freezing stage at temperatures below 20°C, which only inhibits its growth, but it does not eliminate it. A study made in an artificial culture plant of shrimps in India proved that all the samples were positive to *Salmonella* and *Vibrio*,³⁷ which indicated that these microorganisms were part of the natural microflora in artificial culture environment of shrimps.

In a study carried out in Thailand, the presence of these bacteria in shrimps was investigated and it was found that 2% of the samples contained *Vibrio cholerae* O1 and 33% *Vibrio cholerae* non-O1. Nevertheless, there was not any positive sample to *Salmonella*.³⁸

The methodology developed in this study, allowed the simultaneous amplification of DNA fragments coming from *Salmonella* spp and *Vibrio cholerae* O1. Although non searched pathogens were found, the results of the analyzed samples indicate that the sampled plants do not use strict measures in relation to management hygiene practices and packing of shrimp, due to the presence of other vibrios and coliforms, especially the *Proteus* spp and *Acinetobacter* spp, from which the first one is an indicator of fecal contamination and can cause food-borne toxic infections, and the second one is an important agent which alters seafood and other meats. This last, guarantees the conventional microbiological techniques as fundamental for the detection of microorganisms as indicators of plants' contamination. The results show minimum risk for export shrimp selected in the northeast region of Sinaloa, the major exporter of the country, since none of these pathogens were found.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of the Agencia Internacional de Energía Atómica, of Conacyt and PAPIIT

realizar la serotipificación para *Vibrio cholerae* O1, las muestras fueron negativas para este serotipo. En las usadas para la detección de *Vibrio* en Mazatlán, se observa que de 15 siembras realizadas en TCBS, se aislaron 24 (100%) colonias sospechosas a *Vibrio* spp. Al realizar las pruebas bioquímicas (T1N1, triptona, oxidasa y *string*), para la identificación de *Vibrio* spp, 19 (79%) fueron positivas. Pero, al efectuar la serotipificación, para la confirmación de *Vibrio cholerae* O1, todas fueron negativas.

Discusión

Los resultados de la reacción de PCR múltiple coinciden con los resultados obtenidos por los métodos microbiológicos oficiales. En un estudio similar de Kumar *et al.*³⁵ en mariscos (almejas y camarones) en una zona tropical de India, encontraron que 20% de almejas y 5% de camarones fueron positivos a *Salmonella* spp, tanto por métodos de cultivo bacteriológico como por PCR. Esto último se relaciona con las condiciones higiénicas de la empresa donde se realizó el estudio y las aguas de origen del camarón.

Los resultados de *Salmonella* coinciden con los de Hatha *et al.*,³⁶ quienes realizaron un estudio en India sobre la calidad microbiológica de los camarones provenientes de una camaronera, donde encontraron incidencia muy baja de *Salmonella* (0.1%) en camarones crudos y pelados.

Respecto de *Vibrio cholerae* O1, los resultados indicaron que no se encontraron en ninguna de las muestras analizadas; sin embargo, con la presencia de *Vibrio* spp se interpreta de forma indirecta el posible riesgo potencial para la salud, ya que es indicativo de que en cualquier momento el producto puede quedar expuesto a la contaminación con *Vibrio cholerae* O1, éste puede sobrevivir por largo tiempo en estado de congelación a temperaturas por debajo de 20°C, lo cual sólo inhibe su crecimiento, pero no lo elimina. Un estudio realizado en una planta de cultivo artificial de camarones en India comprobó que todas las muestras eran positivas a *Salmonella* y *Vibrio*,³⁷ ello indicó que estos microorganismos eran parte de la microflora natural en ambientes de cultivo artificial de los camarones.

En un estudio en Tailandia se investigó la presencia de estas bacterias en camarones y se encontró que 2% de las muestras contenían *Vibrio cholerae* O1 y 33% *Vibrio cholerae* non-O1. Sin embargo, no se encontró ninguna muestra positiva a *Salmonella*.³⁸

La metodología desarrollada en este trabajo, permitió la amplificación simultánea de fragmentos de ADN provenientes de *Salmonella* spp y *Vibrio cholerae* O1. Aunque no se hayan encontrado los patógenos buscados, los resultados de las muestras analizadas

Referencias

1. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Anuario estadístico de pesca. México (DF): SIRVE-ETA, 1998.
2. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Anuario estadístico de pesca 1999. Dirección General de Política y Fomento Pesquero y Dirección General de Comunicación Social. México (DF): SEMARNAP, 2000.
3. Organización Panamericana de la Salud. Sistema regional de vigilancia epidemiológica de las enfermedades. Información trimestral sobre casos/brotes de ETAS. Información sobre casos/brotes de ETAS, México 31 de marzo, 30 de junio, 30 de septiembre y 31 de diciembre de 1999. OPS, SIRVE-ETA, 2000.
4. Parrilla CM, Vazquez CJ, Saldate CE, Nava FL. Food-borne toxic infection outbreaks of microbial and parasitic origin. Salud Pública Mexicana 1993;35:456-463.
5. Flores LJL. Estudio de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en México. Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 24 de septiembre de 2001. México (DF): DGCSBS, 2001.
6. Flores LJL. Modelo de análisis de riesgos sanitarios derivado del consumo de agua y alimentos para la determinación del contexto general. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, Secretaría de Salud. Food, Nutrition and Agriculture, Food and Agriculture. 2002;31:42-51.
7. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Office of Seafood. Food-borne Illness and Seafood. Food-borne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Washington (USA): FDA, 1995.
8. Bosch A, Xavier AF, Gajardo R, Pinto RM. Should shellfish be purified before public consumption? Lancet 1994;344: 1024-1025.
9. Jones DD, Bej AK. Applications of polymerase chain reaction (PCR) in food microbiology. In: Griffin H, Griffin A, editors. PCR Technology: Current Innovations. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994:341-365.
10. Kaysner CA, DePaola Jr. A. *Vibrio*. In: Downess FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbial examination of food. Washington, DC: American Public Health Association, 2001:405-420.
11. Gonzalez-Rodriguez MN, Santos JA, Otero A, Garcia Lopez ML. PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold-smoked freshwater fish. J Appl Microbiol 2002;93: 675-680.
12. Del Cerro A, Marquez I, Guijarro JA. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 2002;68:5177-5188.

indican que las plantas muestreadas no emplean medidas estrictas en lo que se refiere a las prácticas de higiene en el manejo y empaclado del camarón debido a presencia de otros vibrios y coliformes, principalmente los géneros *Proteus* spp y *Acinetobacter* spp, de los cuales el primero es indicador de contaminación fecal y puede ocasionar toxiinfecciones alimentarias, y el segundo es un agente importante que altera los mariscos y otras carnes. Esto último conduce a res-paldar las técnicas de microbiología convencionales como fundamentales para la oportuna detección de microorganismos indicadores de contaminación en las plantas. Los resultados muestran riesgo mínimo para el camarón de exportación seleccionado en la región noroeste en Sinaloa, la de mayor exportación del país, ya que no se encontraron a esos patógenos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero que obtuvo este proyecto de la Agencia Internacional de Energía Atómica, del Conacyt y del PAPIIT.

13. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA *et al*. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank mil and fecal samples from cull cows: a 12 month survey of dairy farms in east Tennessee. J Food Prot 2002;66:752-759.
14. Sánchez CDR. Comportamiento productivo de líneas genéticas terminales de cerdo con especial referencia en el gen halotano (tesis de maestría). Guadalajara (Jalisco) México: Univ. Guadalajara, 2000.
15. Roberger C, Pommier S, Houde A. Rapid DNA purification for Hal gene PCR diagnosis in porcine tissues and extension to other meat species. Meat Science 1997;45:17-22.
16. Galan JE, Curtiss IR. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Nat Acad Sci 1989;86:6383-6387.
17. Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GDN. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature 1983;306:551-557.
18. Galan JE, Curtiss IR. Distribution of the invA, -B, -C and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: inv A mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. Infect Immun 1991;59:2901-2908.
19. Kimura B, Kawasaki S, Fujii T, Kusonoki J, Itoh T, Flood S. Evaluation a TaqMan Assay for detect-

- ing *Salmonella* in raw meat and shrimp. J Food Prot 1999;62:329-335.
20. Sarawut J, Anchalee T, Vichai B, Suwit P, Sakol P. A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1995;9(6):375-382.
 21. Rahn K, De Grandis SA, Clark RC, McEwen SA, Galan JE, Ginoschio C, *et al.* Amplification of an *inv A* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *salmonella*. Mol Cell Probes 1992;6:271-279.
 22. Koch W, Payne W, Wentz B, Cebula T. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. Appl Environ Microbiol 1993;59: 556-560.
 23. Shirai H, Nishibuchi M, Ramarmurth E, Bhattacharya SK, Pail SC, Takeda Y. PCR for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol 1991;29:2517-2521.
 24. Fields P, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin America cholera epidemic. J Clin Microbiol 1992;30:2118-2121.
 25. Finkelstein RA. Cholera enterotoxin (choleragen): a historical perspective. In: D. Barua, W. B. Greenough, editors. Current topics in infectious disease: Cholera. New York, N.Y: Plenum Medical Book Company, 1992:155-187.
 26. Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, *et al.* The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. Int J Food Microbiol 1997;35:239-250.
 27. Smith CA, Wood EJ. Biología Molecular y Biotecnología. Wilmington: Addison-Wesley Longman, México, 1998.
 28. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2. Método de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2da ed. Zaragoza, España: Acribia, 1999.
 29. Wachter RC. Planes de muestreo y criterio micro-biológico. Memorias del III Curso de actualización en Higiene y Calidad de la Carne, 1998 agosto 10-22; Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. División de Educación continua, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Organización Panamericana de la Salud y Secretaría de Salud. México (DF) 1998.
 30. SSA. Manual de procedimientos para la toma y manejo de muestras de alimentos para análisis bacteriológico. Laboratorio Nacional de Salud Pública de referencia, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Secretaría de Salud. México (DF): SSA, 1992.
 31. SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México (DF). Secretaría de Salud y Asistencia 1995.
 32. Giono S, Gutiérrez L, Hinojosa A. Publicación técnica del INDRE número 10. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. México (DF): INDRE, 1991.
 33. De la Rosa GR, Núñez EJ, Nícoli TL. Aislamiento de *Vibrio* spp en pescado fresco del mercado de La Viga en México, D. F. Vet Mex 1995;26:45-50.
 34. Forsythe SJ, Hayes PR. Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP. 2ª edición. Zaragoza, España: Acribia, 2002.
 35. Kumar HS, Sunil R, Venugopal MN, Karunasagar I. Detection of *Salmonella* spp. in tropical seafood by polymerase chain reaction. Int Food Microbiol 2003;88: 91-95.
 36. Hatha AAM, Maqbool TK, Kumar SS. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. Int Food Microbiol 2003;82:213-221.
 37. Bhaskar N, Setty TM, Mondal S, Joseph MA, Raju CV, Raghunath BS, *et al.* Prevalence of bacteria of public health significance in the culture shrimp (*Penaeus monodon*). Food Microbiol 1998;15:511-519.
 38. Dalsgaard A, Huss HH, Kittikunn AH, Larsen JL. Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. Int Food Microbiol 1995;28:101-113.