

11661  
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DETECCION DE *Salmonella spp.*, Y *Escherichia coli* EN CANALES  
DE BOVINO USANDO UN INICIADOR MULTIPLE CON LA  
TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS, AREA EN MICROBIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
ESPERANZA GARCIA LOPEZ

DIRECTORA: DRA. MARIA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

ASESORES: DR. ROGELIO ALONSO MORALES

M. en C. PATRICIA SUSANA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 1 JULIO DE 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES-Cuautitlán  
Presente.

Por medio de este conducto nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "Detección de *Salmonella spp.*, y *Escherichia coli* en canales de bovino usando un iniciador múltiple con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)" que presenta la alumna ESPERANZA GARCIA LOPEZ con número de cuenta 8606551-9 y número de expediente 100981005 para obtener el grado de Maestra en Microbiología. Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

\_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

Vocal: DR. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ

Secretario: DR. GERARDO GARCIA TOVAR

Primer Suplente: M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

Segundo Suplente: DRA. MARIA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

*A Dra. María de la Salud Rubio Lozano, M. en C. Patricia Susana Miranda Castro, Dr. Rogelio Alonso Morales, por la ayuda brindada y ser mi luz guía a través de este sendero.*

*A la QFB. Mireya Nicolí Tolosa, por su conocimiento, espacio, tiempo, aliento, redirección del camino, cariño, apoyo desinteresado y ser una persona tan especial en mi vida. Muchas gracias, incluso por todo aquello que no se menciona.*

*Al M. en C. Fernando Núñez Espinosa, por su cariño, aliento, apoyo, consejos y amistad brindados.*

*A mi jurado por sus consejos, por compartir con sus alumnos conocimientos y experiencia, por su capacitación y actualización constante, por su entrega a la excelencia académica, y por la nobleza de su labor. Por todo lo que me han brindado.*

*A la UNAM, en especial a la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán con profundo respeto y agradecimiento por permitirme formar parte de la comunidad universitaria y haber brindado todos los elementos necesarios para lograr la formación académica.*

*A CONACyT por permitirme ser becaria y financiar mi formación académica, además, mediante el proyecto 27706 B realizar mi trabajo de investigación.*

*A Amanda Gayosso Vázquez, Jesus Refugio Cortés Fernández, Belem de Jesús Huerta Lozano, Noe Reyes Gutiérrez, Claudia Dolores Alcazar M., Silvia Reyes Maya, y todos los integrantes del grupo de trabajo de del Laboratorio de Genética Molecular, Ciudad Universitaria, UNAM.*

*A JG por su valor, espontaneidad, y hacerme sentir.*

*A mis compañeros de trabajo y amigos de Medicina Preventiva de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, gracias por su apoyo, amistad, consejo, guía, aliento y todo aquello que en este momento se escapa de mi mente. Gracias por dejarme aprender de ustedes.*

*Al MVZ. Linares y a Sebastian Santillan por su apoyo y amistad. Sin olvidar a las autoridades del Rastro Municipal de Tlalnepantla.*

*A IA. Marielena Osorio, por su confianza, amistad, apoyo y hospitalidad. Gracias amiga. Sin olvidar a las autoridades de la Empacadora Unidad Ganadera de Aguascalientes S. A. de C. V.*

*Al Dr. Fernando Osnaya, por su apoyo y amistad.*

*A todos y cada uno de mis amigos, sin mencionar ningún nombre para evitar omitir alguno. Gracias por el aliento, apoyo y amistad.*

*A todos así mis familiares, gracias.*

*Dedico mi tesis, mi trabajo y esfuerzo a  
Concepción López Navarro  
Mi madre  
Natividad García López  
Mi hermana*

*En memoria de mi amigo  
Canek Picaso Rodríguez*

“... el horror en sí continua resonando en la mente del lector, pues subsiste la tenebrosa intuición de que *podría* haber algo más que un vampiro, un fantasma ó algún otro arquetipo de la literatura de horror... *porque la monstruosidad no se encuentra del todo en los personajes del cuento, sino posiblemente en el interior de nosotros mismos.*”

Del libro de Nancy Kilpatrick

## ÍNDICE

Contenido		Página
I.	Índice de Figuras	4
II.	Resumen	6
1.	Introducción	7
1.1	Antecedentes	9
	1.1.1 Situación sanitaria en México en cuanto a la manipulación de carne	9
	1.1.2 Problemas microbiológicos asociados al consumo de alimentos	11
	1.1.3 Gérmenes involucrados en las ETAs	12
	1.1.4 Utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de microorganismos	16
2.	Objetivo general, objetivo particular e hipótesis	19
3.	Metodología, cuadro metodológico	20
3.1	Obtener y acondicionar cepas de los microorganismos	21
3.2	Estandarizar la minipreparación de DNA con modificación de tiempo de lisis celular, tiempo y temperatura de incubación de lisozima, uso de RNAsa y concentración de NaCl	22
3.3	Seleccionar y probar los iniciadores para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple	23
3.4	Acondicionamiento de PCR múltiple en cuanto a: tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio	24
3.5	Prueba de especificidad de los iniciadores contra otros géneros bacterianos	25
3.6	Determinar sensibilidad de la técnica de PCR múltiple con DNA puro	26
3.7	Determinación del inoculo de <i>Salmonella spp</i> a utilizar para la contaminación de la carne	26
3.8	Determinación del inoculo de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 a utilizar para la contaminación de la carne	26
3.9	Determinar eficiencia de la técnica de PCR con alimentos	27
3.10	Muestreo de las canales	28
	3.10.1 Localización de las superficies de muestreo de las canales	28
	3.10.2 Toma de las muestras microbiológicas de las superficies de la canal con hisopos	29
3.11	Técnicas microbiológicas convencionales oficiales	29
	3.11.1 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp</i>	29
	3.11.2 Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	31
3.12	Realización de PCR múltiple con las muestras obtenidas de los diferentes rastros	34
	3.12.1 Rastro Municipal	34
	3.12.2 Rastro Tipo Inspección Federal	34
3.13	Determinar el tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales	34
3.14	Comparar los niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y los métodos microbiológicos oficiales	34
4.	Resultados y Discusión	35
4.1	Obtención y acondicionamiento de las cepas bacterianas	35

4.2	Estandarización de la minipreparación de DNA con modificación de tiempo de lisis celular, tiempo y temperatura de incubación de lisozima, uso de RNAsa y concentración de NaCl	35
4.3	Prueba de los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple	36
4.4	Acondicionamiento de PCR múltiple en cuanto a tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio	41
4.5	Prueba de especificidad de los iniciadores contra otras especies bacterianas	43
4.6	Determinación de sensibilidad de la técnica de PCR múltiple con DNA puro	45
4.7	Determinación del inoculo de <i>Salmonella</i> sp a utilizar para contaminación de la carne	46
4.8	Determinación del inoculo de <i>E. coli</i> O157:H7 a utilizar para contaminación de la carne	46
4.9	Determinación de la eficiencia de la técnica de PCR con carne	48
4.10	Muestreo de las canales	52
4.11	Técnicas microbiológicas convencionales oficiales	53
	4.11.1 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> sp	53
	4.11.2 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> O157:H7	53
4.12	Realización de PCR múltiple con las muestras obtenidas	54
	4.12.1 Muestras del rastro Municipal	54
	4.12.2 Muestras del rastro Tipo Inspección Federal	61
4.13	Determinación de tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos oficiales convencionales	62
4.14	Comparación niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y los métodos microbiológicos oficiales	63
5.	Conclusiones	64
6.	Recomendaciones	65
7.	Referencias	66
8.	Anexo	69

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	Página
Figura 1	Corrimiento electroforético de muestras sometidas a extracción de DNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	35
Figura 2	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro <i>Escherichia coli</i> O157:H7 con 1.5 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	36
Figura 3	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro <i>Salmonella</i> con 1.5 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	37
Figura 4	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivos puros de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	38
Figura 5	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR del bacteriófago M13 con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Dilución de DNA de 0.20 ng/µl a 1.5 pg/µl.	38
Figura 6	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR del bacteriófago M13 con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Dilución de DNA de 6.25 pg/µl a 0.048 pg/µl.	39
Figura 7	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR del bacteriófago M13 con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Dilución de DNA de 3.125 pg/µl a 0.024 pg/µl.	39
Figura 8	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR del plásmido Bluescript con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Dilución de DNA de 3.125 pg/µl a 0.024 pg/µl.	40
Figura 9	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR múltiple de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> y plásmido Bluescript con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	40
Figura 10	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro <i>Escherichia coli</i> O157:H7 con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	42
Figura 11	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro <i>Salmonella</i> con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	42
Figura 12	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro de <i>Shigella</i> con 2 mM de Mg <sup>++</sup> en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	44
Figura 13	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR múltiple para determinar la sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	45
Figura 14	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR múltiple para determinar la sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	45
Figura 15	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR múltiple con <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y plásmido Bluescript de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res, con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	51
Figura 16	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR múltiple con <i>Salmonella</i> y plásmido Bluescript de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res, con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	51
Figura 17	Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR	51

	múltiple con <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> y plásmido Bluescript de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res, con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	
Figura 18	Corrimiento electroforético del producto de PCR de la carne de res no contaminada (lavada y sin lavar), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	52
Figura 19	Corrimiento electroforético del producto de PCR del control positivo y negativo de la contaminación de carne de res, con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml.	52
Figura 20	Corrimiento electroforético de alícuotas de muestras de rastro municipal sometidas a extracción de DNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 1 a 30	54
Figura 21	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 6 a 10.	56
Figura 22	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 11 a 15.	56
Figura 23	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 16 a 20.	57
Figura 24	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 26 a 30.	57
Figura 25	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 46 a 50.	57
Figura 26	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 51 a 55.	58
Figura 27	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras 56 a 60.	58
Figura 28	Corrimiento electroforético del productos amplificados por PCR de muestras de rastro tipo inspección federal (UGASA), con 2 mM de Mg <sup>++</sup> , en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. Muestras: 14 a 20.	61



## I. RESUMEN

Este estudio tiene como objeto principal la utilización de una técnica rápida y confiable como es la reacción en cadena de la polimerasa para detectar a través de un iniciador múltiple para *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovino. Para este estudio se realizó en primer lugar minipreparación de DNA bacteriano, luego se elaboraron los iniciadores específicos y se llevó a cabo la técnica de PCR múltiple con DNA puro de las bacterias en estudio. Dentro de la reacción de PCR se incluyó plásmido (pBS) como control positivo y un control negativo (sin DNA). En el momento de la realización de la técnica de PCR con todos los iniciadores y con la mezcla de DNA puro no se encontró interferencia entre ellos.

En la técnica de PCR múltiple, se utilizó DNA de otras especies bacterianas para determinar la especificidad de la misma. Las especies empleadas fueron *Proteus* y *Klebsiella* entre otros y no se encontró amplificación de ninguna banda. Se realizaron diluciones del DNA para establecer la sensibilidad de la técnica, la cual (en este trabajo) puede detectar una concentración de 7.5 fentogramos de DNA/ $\mu$ l con la amplificación múltiple, que corresponde aproximadamente a tener 5 unidades formadoras de colonia.

Se determinó el tamaño de la población microbiana mediante el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* para establecer el inóculo para la contaminación experimental de la carne y determinar la eficiencia de la técnica de PCR en las muestras de carne. No se encontró interferencia de los componentes cárnicos para la minipreparación del DNA ni para la amplificación de las bandas producto de PCR.

Se probó esta técnica de PCR múltiple en canales de res y se muestrearon aleatoriamente 60 canales de un rastro municipal y 60 canales de un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) después del sacrificio. La toma de muestra en las canales se realizó después del sacrificio con una plantilla (ó molde) en el pecho y dentro de la superficie de la plantilla de frotó un hisopo estéril para la obtención de la muestra. Además de la técnica de PCR se realizaron los métodos microbiológicos oficiales para la determinación de los microorganismos en estudio.

Los resultados obtenidos muestran la presencia en rastro Municipal de *Salmonella* en 2 canales por el método microbiológico oficial y 1 canal por la técnica de PCR en un primer muestreo, no siendo las mismas muestras por lo cual se realizó un segundo muestreo donde se obtuvo la presencia de *Salmonella* en 1 canal por método microbiológico y por la técnica de PCR siendo la misma muestra de las 60 muestreadas. En el rastro TIF no se encontró *Salmonella* por ninguno de los dos métodos. Estas 3 muestras positivas a *Salmonella* representan el 2.5% de presencia de esta bacteria en la muestra. En ambos rastros no se detectó la presencia de *Escherichia coli* O157:H7.

En conclusión, el rastro municipal tuvo 2.5% de muestras positivas a *Salmonella* y 14 amplificaciones del gen *stt I*, 2 amplificaciones del gen *stt II* y 7 amplificaciones del gen *eaeA*. En el rastro TIF no se detectó la presencia de *Salmonella* y encontró la amplificación de una banda correspondiente al gen *stt I* y 1 al gen *eaeA*. En este estudio no se encontró la presencia de *Escherichia coli* O157:H7.

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas sanitarios que más preocupan en la industria de la carne a nivel mundial es la presencia de microorganismos contaminantes potencialmente peligrosos, los cuales son transferidos a las canales durante el sacrificio. Estos microorganismos provienen del contacto directo o indirecto con piel, del contenido intestinal durante el eviscerado, del suelo, del personal contaminado, del equipo contaminado<sup>3, 23, 36</sup>.

Los microorganismos contaminantes pueden incluir aquellos capaces de producir enfermedad en el consumidor y/o los que son responsables de descomponer la carne<sup>16, 23</sup>.

Las estadísticas internacionales muestran que la carne y los productos cárnicos son causantes de la mayor proporción de todas las infecciones alimentarias. Los microorganismos involucrados son principalmente *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocitogenes* y *Staphylococcus aureus*, entre otros<sup>3, 23</sup>.

Los niveles y frecuencias de las bacterias fluctúan dependiendo de las estaciones a lo largo del año, el lugar de origen de los animales, el modo de transporte, el área de llegada al rastro y las condiciones de procesamiento<sup>36</sup>.

Por varios años, la determinación de microorganismos en carne, específicamente en las canales, se ha centrado casi exclusivamente en métodos microbiológicos oficiales lentos que consisten en el aislamiento y caracterización del patógeno. Sin embargo, los avances científicos han introducido un número de pruebas diagnósticas utilizando técnicas de biología molecular, que tienen un impacto importante en los métodos usados para la detección de los microorganismos patógenos y sus toxinas. Las pruebas por medio de biología molecular son más sensibles para detectar microorganismos en alimentos que los métodos microbiológicos convencionales<sup>16</sup>, no obstante, la complejidad en la composición de los alimentos ha imposibilitado la íntegra aplicación en ellos, por lo cual se requiere de un corto preenriquecimiento de las muestras en medios de cultivo para alcanzar una detección óptima, aunque a este respecto existen investigadores que mencionan lo contrario. En el actual comercio nacional e internacional se requieren técnicas rápidas y eficientes que permitan la detección de microorganismos de manera segura, por ejemplo; es preciso que cuando se importe carne, se pueda verificar que esté libre de estos patógenos y/o de sus toxinas en el mismo lugar de recepción de los alimentos (como son puertos, aeropuertos, fronteras o lugares de entrada en general) con los cuidados y precauciones necesarios para poder realizar las determinaciones microbiológicas; estos lugares no tienen la capacidad de almacenar la carne por largo tiempo para la posterior realización de las pruebas microbiológicas convencionales, por lo cual podrían

introducirse al país sin esta evaluación. En institutos de nuestro país, como el Instituto de Diagnóstico de Referencia Epidemiológica (INDRE), una vez realizados el aislamiento y la identificación bioquímica en muestras clínicas se realiza la técnica de PCR para hacer sus diagnósticos más eficaces. La implementación de estas técnicas al diagnóstico cotidiano de microorganismos en productos cárnicos, permitirían hacerlo más eficiente. Este estudio tiene como objetivo principal el desarrollo de una técnica rápida y confiable como la PCR para detectar *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* O157:H7 en carne de res en canal.

## 1.1. ANTECEDENTES

### 1.1.1 Situación sanitaria en México en cuanto a la manipulación de carne

El consumo de carne caliente (recién sacrificada) dificulta muchas veces el cumplimiento de normas y exigencias que tienden a asegurar que el producto se obtenga en condiciones aceptables desde el punto de vista sanitario; el corto tiempo que media entre el procesamiento y el consumo limita la aparición de signos macroscópicos de alteración pero existen recuentos bacterianos comúnmente altos. La gran mayoría de los mataderos involucrados en la exportación de carnes, procesan con cuidado el producto destinado a los mercados internacionales; sin embargo, cuando el destino es el mercado local, las normas técnicas sanitarias no se cumplen o bien se cumplen mínimamente<sup>4</sup>. En un estudio realizado sobre Análisis de Riesgos e Identificación de Puntos Críticos de Control en el procesamiento de canales de bovino para el abasto en un rastro municipal del Estado de México, se determinó un 10% de muestras positivas a *Salmonella spp.* en la canal después del desollado, un 5% de muestras positivas después de eviscerado y un 2.5% de muestras positivas posterior al lavado final<sup>14</sup>.

La explotación pecuaria es una de las bases primordiales en la economía mexicana. El consumo de carne continua siendo un factor constante en la dieta alimentaria de un gran porcentaje de la población con hábitos de preferencia por las carnes y otros alimentos frescos no refrigerados<sup>4</sup>. El consumo de carne de bovino en nuestro país es del 38%. De 1988 a 1994 el consumo total per capita anual de carne de bovino se incrementó ligeramente de 16 a 17 kg<sup>40</sup>.

La inspección adecuada previa y posterior de los animales que se sacrifican en los mataderos reviste gran importancia dado el peligro de contraer enfermedades e incapacidades asociadas con el consumo de carne contaminada<sup>4</sup>.

Los problemas en los mataderos y las plantas procesadoras de productos cárnicos se suscitan a raíz de factores como son los siguientes<sup>4</sup>:

- ◇ “Escaso desarrollo económico de los países, lo cual crea dificultades o imposibilidad por parte del Estado para hacerse cargo de las elevadas inversiones de capital para las plantas físicas y los equipos, el mantenimiento de los mismos, el procesamiento moderno y el control sanitario de las carnes”.
- ◇ “Función que desempeñan los mataderos como fuentes de financiamiento municipal, estatal o privado, sin que se afecten reinversiones para mantenimiento y modernización”.
- ◇ “Bajo nivel de educación del personal vinculado con la explotación y distribución de los productos, así como de gran parte del público consumidor”.

- ◇ “Obsolescencia legislativa en general y rigidez legal de carácter estatal, dificultando la adopción de medidas intermedias progresivas tendientes a transformar las plantas, y mataderos, creando mejores condiciones técnicas y sanitarias, aunque no se llegue a situaciones óptimas en un corto plazo”.
- ◇ “Adopción, sin adaptación, de normas de diseño, estructura y funcionamiento provenientes de países con realidades socioeconómicas y culturales distintas, las cuales carecen de autenticidad local”.
- ◇ “Planificación y ejecución de programas de educación y adiestramiento en higiene de carnes, de profesionales y técnicos de nivel medio, desvinculados de la realidad de recursos, estructural y funcional de cada país. Con frecuencia se produce una frustración por parte del personal que al no obtener las condiciones óptimas de proceso aprendidas, optan por no ejercer ninguna influencia; de esta manera se convierten en ejecutores rituales y simples observadores de circunstancias anómalas que a fuerza de vivirlas diariamente, se han vuelto normales”.
- ◇ “Proliferación de recomendaciones de expertos externos o de funcionarios de instituciones sobre perfeccionamiento de plantas procesadoras, que resultan inaplicables en la realidad de los países latinoamericanos. Esta situación ha contribuido a desechar fórmulas de solución conducentes a un progreso parcial en las diferentes etapas del ciclo de operaciones de los mataderos”.

Todos estos factores plantean la necesidad de buscar otros criterios para abordar la problemática y hallar soluciones efectivas acordes con la realidad que nos atañe.

En muchos de los países de América Latina la salud de los animales destinados zootécnicamente a producir carne tiene gran interés, sin embargo, los rastros son considerados como un asunto de importancia secundaria. La prevención de infecciones e intoxicaciones por el consumo de carne contaminada y de sus productos depende, en primer lugar, de la salud del animal; en segundo lugar, de la modalidad de sacrificio de este y de los métodos de faenamiento y, por último, de las técnicas de preservación y manipulación de la carne. En consecuencia se requiere una atención muy cuidadosa tanto del proceso general como de cada etapa en particular<sup>4</sup>.

El trabajo de los rastros de bovinos, ovinos y porcinos sufre una multitud de problemas de operación, que pueden identificarse y clasificarse de acuerdo a las características de los edificios, de los equipos, del personal, del proceso y del producto. Dichos problemas están estrictamente relacionados con las peculiaridades del ambiente de cada matadero, en especial

las variables económicas, culturales, legales y política de cada región<sup>4</sup>. Dentro de estos problemas se destacan los relacionados a las contaminaciones microbiológicas que pueden alterar el producto acortando la vida de anaquel e incluso causar infecciones e intoxicaciones<sup>4, 23</sup>.

### **1.1.2 Problemas microbiológicos asociados al consumo de alimentos**

Las condiciones microbianas del animal vivo son de gran importancia en la seguridad del producto final listo para consumir, en relación con las infecciones, intoxicaciones o enfermedades transmitidas por alimentos<sup>23</sup>.

De acuerdo a Jacob en 1990, "las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causan trastornos del tubo gastrointestinal, con dolores abdominales, diarrea y, a veces vómitos. Estas enfermedades están causadas por la ingestión de alimentos que contienen cantidades considerables de bacterias nocivas (patógenas) o los productos consecutivos al crecimiento de éstas; la enfermedad puede atacar a una persona, a uno o a dos miembros de una familia o de cualquier grupo cerrado, o a un gran número de personas. Los síntomas pueden ser ligeros, con una duración de pocas horas o graves, con una duración de días, semanas o meses y que obliguen a instaurar un tratamiento intensivo. En grupos vulnerables como son los lactantes y ancianos, la enfermedad probablemente resulte más grave". Las estadísticas actuales de ETA en países industrializados indican que el 60% de los casos pueden deberse a técnicas defectuosas de manipulación de los alimentos y a la contaminación de éstos, servidos en establecimientos de alimentación<sup>26</sup>.

Para que se manifiesten las ETA es preciso que tenga lugar una de tres condiciones siguientes<sup>26</sup>:

- ✓ Que sobre el alimento contaminado o en el interior de éste haya bacterias en cantidad o concentración suficientes para sobrevivir al período de producción, recolección, almacenamiento y elaboración del alimento,
- ✓ Que en la superficie o en el interior del alimento se multipliquen bacterias hasta alcanzar una cantidad suficiente o que se produzcan toxinas en suficiente cantidad para provocar una enfermedad,
- ✓ Que existan bacterias en el lugar donde se preparan los alimentos o en las superficies de trabajo, que si no se lavan adecuadamente contaminarán otros alimentos.

En todos estos casos, para que se produzca la enfermedad es preciso que se consuman cantidades suficientes de alimento contaminado que contengan bastantes bacterias o toxinas, como para vencer la barrera de resistencia de la persona y se manifieste enfermedad. El número o la concentración de bacterias necesarios para causar enfermedad se denomina mínima dosis infectante (DIM, del inglés)<sup>26</sup>.

En nuestro país, la Dirección General de Epidemiología en el período comprendido entre 1981 y 1990 registró 393 brotes de ETA, con un promedio anual de 39 brotes; la transmisión de éstas tiene relación directa con el agua o con el alimento; en el 79% de los casos la etiología se logró precisar, siendo las bacterias responsables de ocupar el primer lugar (42%) del total de las notificaciones<sup>35</sup>.

Los datos de los últimos años en México indican que aproximadamente el 30% de los casos notificados en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica obligatoria, corresponde a las ETA. De acuerdo a su etiología, las enfermedades entéricas de origen bacteriano ocupan el primer lugar con un 54.79% y 47.91% para los periodos de 1986 - 1990 y 1994 - 1997 (hasta el 30 de junio de 1997) respectivamente.

En México los métodos microbiológicos oficiales convencionales se realizan de acuerdo a los procedimientos que se encuentran descritos en las Normas Oficiales Mexicanas. La Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, establece la metodología para la identificación de *Salmonella* en alimentos y como toda Norma Oficial Mexicana, esta es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas y morales que requieran efectuar este método en productos nacionales para fines oficiales<sup>34</sup>.

En México no está establecido el procedimiento para la determinación de *E. coli* O157:H7, por lo cual se decidió a seguir la metodología oficial publicada en el manual de la Organización Americana de Análisis Químicos (AOAC, del inglés) de Estados Unidos de América<sup>17</sup>.

### **1.1.3 Microorganismos involucrados en las ETAs**

Existen diversos grupos de microorganismos que pueden ser transmitidos por los alimentos: bacterias, mohos, levaduras y virus además de los parásitos.

*Salmonella* es un género de la familia Enterobacteriaceae. Son Gram negativas, anaerobias facultativas, no forman esporas y tienen forma de bastón. Existen formas móviles que tienen flagelos peritricos. Este género produce ácido y algunas veces gas de la glucosa, son usualmente catalasa (+) y oxidasa (-) además de reducir nitratos a nitritos. La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran en el tracto intestinal del hombre y de los animales como flora saprofita o patógena<sup>24</sup>.

*Salmonella* es ubicua y reconocida mundialmente como agente zoonótico. Numerosos reservorios animales han sido identificados. Algunos alimentos, particularmente aquellos de origen animal y aquellos sujetos a contaminación con aguas negras, han sido identificados como vehículos de transmisión de estos patógenos al humano<sup>24</sup>.

*Salmonella*, como se mencionó anteriormente, es habitante del tracto intestinal del hombre y animales infectados. Estas son eliminadas a través de las heces y pueden ser transmitidas por contacto con las manos, pelo o piel de animales que se encuentren en su compañía, del aire, etc. Alimento y agua son los vehículos primarios. La contaminación de los animales puede darse a través del transporte, corrales de reposo o sacrificio de los mismos. Los alimentos de origen animal originalmente se contaminan por contacto fecal del medio ambiente y del equipo. La contaminación cruzada es producida por alimentos crudos contaminados durante su posterior procesamiento y preparación. Esta bacteria también es capaz de establecerse y multiplicarse en el medio ambiente y el equipo de una gran variedad de procesos en los alimentos<sup>24</sup>.

En raras ocasiones, *Salmonella* puede estar presente en carne de animales que han padecido salmonelosis septicémica; comúnmente alcanza las superficies de la carne a partir del contenido intestinal y de las heces que se encuentran apelmazadas en el pelo, piel y alimento de animales cuando llega para el sacrificio. Considerable contaminación de canales de cerdo ocurre cuando se produce el escaldado y el pelado. La bacteria es realmente transferida de canal a canal y de canal contaminada a utensilios, superficies de trabajo y manos de trabajadores al cortar la carne. La carne de res y cerdo junto con un inadecuado cocimiento son comúnmente identificadas como vehículo en brotes de salmonelosis. Aunque *Salmonella* no forma esporas, puede sobrevivir por largos periodos en alimentos y otros substratos<sup>24</sup>.

Algunas células bacterianas están adaptadas para producir estructuras de adhesión, por ejemplo, en *Salmonella* se ha descubierto que existen estructuras que le permiten a la bacteria adherirse fuertemente a la célula huésped, para posteriormente ingresar a ella y multiplicarse. Kim *et al.* en 1996 mencionan que el fenómeno de adhesión está considerado en dos pasos: asociación reversible con la superficie, seguida de adherencia irreversible; también Kim *et al.* en

1996 reportaron que las células de *Salmonella* se unen a la piel de la canal de pollo rápidamente y la unión irreversible ocurre en los primeros 15 segundos *post* inoculación<sup>29</sup>; Kim *et al.* en 1996 en otro estudio con *Salmonella* en carne de pollo mostraron algo similar, se inocularon  $10^7$  bacterias y después de 60 minutos de exposición a la suspensión bacteriana se encontró que el 93% del total de las células se encontraban firmemente adheridas a la carne<sup>30</sup>. En la revisión realizada por Darwin y Miller en 1999 mencionan lo necesario para la invasión de algún tipo celular, la bacteria primero debe encontrar a la célula a la cual se va adherir y después mediante fimbrias ó pilis adherirse a la célula huésped<sup>11</sup>.

Pruebas vacunales en humanos voluntarios indican que la mínima dosis infectante (MDI) para hombres sanos es de  $10^7$  *Salmonellas*. Los voluntarios recibieron  $10^3$  células y permanecieron sanos. Sin embargo, la velocidad de ataque en algunas epidemias es de menos de 50%. Algunas investigaciones de brotes han sugerido que un gran número de *Salmonella* se encontraron presentes probablemente en alimentos implicados, ya que estos estuvieron impropriamente manejados y almacenados. Cuando el vehículo ha sido agua, grasa o alimentos procesados, pequeños números (por ejemplo  $<100/g$ ) de *Salmonella* han sido encontradas en los alimentos. Las diferencias en las dosis infectivas parecen estar asociadas con la supervivencia de la bacteria durante el tránsito a través del estomago; agua ingerida a la hora de comer como un tiempo mínimo de retención, mientras la grasa protege a los microorganismos de la acción de los ácidos del estómago<sup>24</sup>.

En el caso de *Salmonella* se han utilizado diferentes tipos de iniciadores para ser detectada por la técnica de PCR, entre ellos se encuentra el reportado por Gooding *et al* en 1999, basado en una secuencia repetida<sup>20</sup>. Otro es el gen de invasión A (*invA*) que es parte de un grupo de genes que sirven para que esta bacteria penetre a la célula huésped<sup>39</sup>.

*Escherichia coli* también es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria tiene forma de bastón corto, es Gram negativo, catalasa (+), oxidasa (-), además anaerobia facultativa. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa. Producen indol, típicamente son rojo de metilo (+), Voges-Proskauer (-) y no crece en medio de citrato de Simmons<sup>24</sup>.

Existen diferentes tipos de *E. coli* patógenas: *E. coli* enteropatógenicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); dentro de este último grupo se encuentra clasificada la *Escherichia coli* de este estudio (*E. coli* O157:H7)<sup>24</sup>.

*E. coli* O157:H7 fue identificada como un patógeno en 1982, cuando se le asoció con dos brotes de colitis hemorrágica. Subsecuentes brotes han sido reportados, algunos asociados con

el consumo de carne de res mal cocida<sup>24</sup>. Se ha estudiado que a 63.8°C *E. coli* O157:H7 se inactiva<sup>36</sup>.

EHEC (O157:H7) en contraste con la mayoría de *E. coli*, crece pobremente o no lo hace a 44-45°C, no produce  $\beta$  - glucoronidasa y es deficiente en fermentar sorbitol a las 24 horas<sup>24</sup>.

Esta bacteria produce dos verotoxinas, las cuales son tóxicas para células vero (células de riñón de mono verde africano), estas han sido identificadas como verotoxina 1 (VT1) y verotoxina 2 (VT2). VT1 es estructural e inmunológicamente indistinguible de la toxina de Shiga. EHEC aparentemente coloniza el tracto intestinal, después de lo cual elabora la(s) verotoxina(s) que son activas en el colon<sup>24</sup>.

Los síntomas que se presentan debidos a la infección de esta *E. coli* O157:H7 son: diarrea sanguinolenta, dolores abdominales con un bajo grado de fiebre, la cual puede estar presente o ausente. La transmisión generalmente se da vía fecal/oral. El reservorio es presumiblemente el ganado bovino, resultando la contaminación de la carne por contaminación con excremento durante el procesamiento<sup>36</sup>.

*Escherichia coli* O157:H7 también cuenta con estructuras que le permiten adherirse estrechamente a la célula, como es la proteína intimina, la cual incluso llega a lesionar y destruir la célula<sup>15, 18</sup>. Se ha demostrado que la actividad de unión de la intimina está localizada en el extremo C-terminal de la proteína. Las EPEC y las EHEC muestran un mismo gen de agregación (*eaeA*) produciendo la misma proteína intimina, pero Fratamico, *et al.* en 1995 mencionan que ambas proteínas difieren en peso molecular y secuencia genética, al mismo tiempo exponen que el producto del gen *eaeA* en las EHEC es una proteína de 97kDa<sup>15, 18</sup>, la cual es llamada intimina<sub>O157</sub>, adquiere este nombre para poder ser diferenciada de la proteína intimina que producen las EPEC de 94 kDa, ambas intiminas se localizan en la membrana bacteriana. Con respecto a la secuencia genética, mencionan que ambas contienen el 97% de homología en el extremo 5' pero que solo un 59% de homología en los últimos 800 pb de la región terminal 3'<sup>18</sup>. En contraste, Nataro y Kaper en su recopilación reportan que en las EPEC producen una adherencia mediada por una proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa llamada intimina y no marcan diferencia de peso molecular con respecto a EHEC<sup>33</sup>. Esto conduce a pensar que aún no está claro si: 1) son diferentes proteínas (aunque sean llamadas igual) que provienen de la misma secuencia genética y sufren un cambio conformacional después de ser traducidas; 2) son diferentes proteínas por tener un diferente origen genético, ó 3) son la misma proteína con la misma secuencia genética codificante.

Nataro y Kaper en 1998, exponen que el gen *eaeA* está presente en todas las cepas EHEC, EPEC, *Citrobacter rodentium* y *Hafnia alvei* capaces de producir enlace y esfacelamiento

celular, pero esta ausente en las cepas de *E. coli* de la flora normal. Cepas ETEC entre otras; además revelan un sorprendente patrón de secuencias conservadas entre las proteínas intiminas. Entre estas proteínas descritas existe una identidad del 83%, la divergencia secuencial esta concentrada en la región carboxilo terminal. El primer 75% de la proteína (los primeros 704 residuos de aminoácidos iniciando del extremo amino terminal) tienen un 94% de correspondencia; mientras el otro 25% de los residuos solo tienen un 49% de identidad entre las intiminas. La elevada divergencia de la región C terminal es la porción de la molécula que se une a los receptores en la célula epitelial. Esta diferencia confiere diferentes patrones de colonización intestinal. Para poder diferenciar entre la gran familia de proteínas (intiminas) de los diferentes patógenos, se refieren como Int<sub>O26</sub>, a la intimina de la cepa *E. coli* O26; Int<sub>EPEC</sub> a la intimina de las cepas de EPEC e Int<sub>HA</sub> a la intimina de *Hafnia alvei*<sup>33</sup>.

Meng *et al.* (1997), mencionan la utilización de una combinación de varios iniciadores para la identificación de *E. coli* O157:H7 por la técnica de PCR que amplifican el gen *eaeA* en combinación con los genes para las toxinas *stx I* y *stx II*<sup>32</sup>.

Algunos investigadores (Cebula *et al.* 1995; Venkateswaran *et al.* 1997) han desarrollado una mezcla de iniciadores (llamado múltiple) para la identificación específica de *E. coli* O157:H7, en base a sus factores de virulencia, identificando simultáneamente los genes que codifican para las toxinas que produce, llamadas "Shiga-like" (*stx I* y *stx II*); además de amplificar el gen *uidA* el cual codifica para la  $\beta$ -glucoronidasa<sup>6, 46</sup>. Aunque los aislamientos de O157:H7 no tienen actividad  $\beta$ -glucoronidasa, ellas llevan el gen *uidA*. Se ha secuenciado este gen y se encontró que tiene un residuo G (en vez de un residuo T encontrado en otros tipos de *E. coli*) en la posición 92, así como en el final de extremo 3' también hay una G (en lugar de una A)<sup>6</sup>. Este cambio de base altamente conservado se usará para identificar el serotipo O157:H7.

#### **1.1.4 Utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de microorganismos**

Métodos de biología molecular que usan anticuerpos y ácidos nucleicos para detectar específicamente patógenos de alimentos contaminados fueron apenas conocidos hace una década y media. Pocos científicos pudieron predecir que esas herramientas de investigación básica pudieran venir a dominar el diagnóstico en alimentos. Hoy un gran número de esas tecnologías están comercialmente disponibles para la detección de prácticamente todos los

patógenos que se pueden transmitir por los alimentos así como sus toxinas. Estas pruebas van desde aglutinación de látex unida a anticuerpos, hasta el método de reacción en cadena de la polimerasa<sup>16</sup>.

La técnica de PCR es un método de amplificación enzimático de secuencias específicas de DNA *in vitro*, a partir de dos iniciadores que son complementarios a los extremos de la secuencia de DNA que se desea amplificar. La enzima Taq polimerasa, en presencia de iones de  $Mg^{++}$  extiende el extremo 3' de cada iniciador, complementarios a dicha secuencia. La reacción se lleva a cabo en presencia de un exceso de iniciadores que hibridan al nuevo DNA que se sintetizó en el ciclo anterior, de manera que se convierte en el blanco para la nueva síntesis. Esta reacción ocurre en una serie de ciclos repetitivos que incluyen: desnaturalización de la doble cadena de DNA, hibridación de los iniciadores a los extremos del fragmento de DNA y la extensión de estos iniciadores sobre el DNA molde por la polimerasa termoestable, resultando en la acumulación exponencial del fragmento específico cuya dimensión está definida por los extremos 5' de los iniciadores, ya que el producto de extensión sintetizado en un ciclo sirve como molde en el siguiente ciclo, de manera que el número de copias de DNA se duplica en cada ciclo<sup>13, 21</sup>. Los ciclos necesarios para la amplificación se llevan a cabo en un termociclador, que permite oscilar las temperaturas. A una temperatura de 94°C ocurre la desnaturalización del DNA, o sea, se abre la doble cadena para permitir la hibridación de los iniciadores, en la cual disminuye la temperatura aproximadamente a 72°C, y por último la extensión de las nuevas cadenas, esto representa un ciclo, el cual se repite de 30 a 35 veces<sup>13</sup>. Estas condiciones pueden variar según el fragmento genético que se desea amplificar.

La técnica de PCR es muy específica, ya que solamente se amplifican los fragmentos de DNA limitados por los iniciadores, dando lugar a la producción de un fragmento de un tamaño determinado, incluso en presencia de otro tipo de DNA no relacionado<sup>13</sup>. El producto de PCR se evalúa y compara a un marcador de tamaño molecular en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, sobre un haz de luz ultravioleta<sup>13, 21</sup>.

La principal ventaja del PCR es la sensibilidad y especificidad de la prueba. Pequeñas concentraciones de DNA blanco, correspondientes a bajos números de células bacterianas, pueden ser detectadas en un corto tiempo<sup>21</sup>, pero los cambios en las condiciones de la técnica de PCR comúnmente afectan los resultados de la amplificación<sup>13</sup>, refiriéndose a tiempo, temperatura, concentración de  $Mg^{++}$  (cofactor), etc.

La selección de iniciadores, que amplifican secuencias de DNA de genes, que codifican factores de virulencia o toxinas, permite la identificación de solo esos organismos que son potencialmente patógenos. El PCR no distingue entre células viables y no viables, si el

segmento de DNA incluye el sitio del iniciador intacto, tanto en el primer caso como en el segundo, lo amplificará. Esto puede ser considerado una desventaja ya que bacterias lesionadas pueden ser detectadas incluso en los alimentos tratados térmicamente produciendo reacciones positivas<sup>21</sup>.

Wilson en 1997, menciona que existen dos puntos que inhiben la reacción de PCR en un inicio: 1) la interferencia de la lisis celular necesaria para la extracción de DNA y 2) degradación o captura de ácidos nucleicos; al mismo tiempo expone que existe un amplio rango de inhibidores reportados que en algunos casos no se sabe como actúan, pero dependiendo del origen de la muestra se tiene como ejemplo los siguientes: en el caso de alimentos menciona a los compuestos orgánicos ó fenólicos, glicógeno, grasas y  $Ca^{++}$ ; entre otros inhibidores, se encuentran los detritus bacterianos (pared, membrana celular, etc.), fragmentos de DNA no blanco, e incluso materiales de laboratorio como son el polvo, el talco de los guantes, diferentes tipos de plástico ó celulosa utilizado, la distribución al azar del DNA que pueden estar cerca de los límites de detección, es decir que una molécula de DNA puede no estar presente en la alícuota que se utilizó para realizar la prueba y obtener un resultado falso negativo; que se degrade el DNA o este sea capturado por alguna molécula presente, que se encuentren presentes enzimas proteolíticas o desnaturalizantes que destruyan ó inhiban la actividad de la enzima Taq polimerasa, etc<sup>47</sup>.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Establecer las condiciones de detección de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovino usando un iniciador múltiple con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y comparación de ésta técnica con los métodos microbiológicos oficiales.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un procedimiento para detección simultánea de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.
2. Determinar la presencia ó ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos utilizando la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales oficiales.
3. Comparar resultados de sensibilidad y tiempo entre la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y los métodos microbiológicos convencionales oficiales.

### **HIPÓTESIS**

La técnica de PCR para la detección múltiple de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 en carne de bovino es un sistema rápido y de elevada sensibilidad, teniendo los mismos resultados que los métodos microbiológicos oficiales.

### 3. METODOLOGÍA

#### Cuadro metodológico

Para el cumplimiento de cada uno de los objetivos particulares se realizaron varias actividades las cuales se mencionan a continuación:

1. Objetivo específico: Desarrollar un procedimiento para detección simultánea de <i>Salmonella spp.</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa	2. Objetivo específico: Determinar la presencia ó ausencia de <i>Salmonella spp</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en canales de bovinos utilizando la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales oficiales	3. Objetivo específico: Comparar resultados de sensibilidad y tiempo entre la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y los métodos microbiológicos convencionales oficiales
Actividades:	Actividades:	Actividades:
3.1 Obtener y acondicionar cepas de los microorganismos	3.10 Muestreo de las canales	3.13 Determinar el tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales
3.2 Estandarizar la minipreparación de DNA con modificación de tiempo de lisis celular, tiempo y temperatura de incubación de lisozima, uso de RNasa y concentración de NaCl	3.10.1 Localización de las superficies de muestreo de las canales	3.14 Comparar los niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y los métodos microbiológicos oficiales
3.3 Seleccionar los iniciadores para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple	3.10.2 Toma de las muestras microbiológicas de las superficies de la canal con hisopos	
3.4 Acondicionamiento de PCR múltiple en cuanto a: tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio	3.11 Métodos microbiológicos convencionales oficiales	
3.5 Prueba de especificidad de los iniciadores contra otros géneros bacterianos	3.11.1 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp</i> (Rastro Municipal y TIF)	
3.6 Determinar la sensibilidad de la técnica de PCR múltiple con DNA puro	3.11.2 Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (Rastro municipal y TIF)	
3.7 Determinar el inóculo de <i>Salmonella</i> sp a utilizar para contaminación de la carne	3.12 Realización de PCR múltiple con las muestras obtenidas de los diferentes rastros	
3.8 Determinar el inóculo de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 a utilizar para contaminación de la carne	3.12.1 Rastro municipal	
3.9 Determinar la eficiencia de la técnica de PCR en alimentos	3.12.2 Rastro TIF	

### 3.1 Obtención y acondicionamiento de cepas

Las cepas de *Escherichia coli* fueron donadas por el Dr. Ángel Manjarres de la Facultad de Medicina (CU), de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las características se muestran en la Tabla 1 que a continuación se presenta:

Tabla 1

Cepas de *Escherichia coli* donadas por la Facultad de Medicina (UNAM)

Cepa bacteriana	Clasificación	Serotipo	Origen
<i>E. coli</i>	66295	O127:NM	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	E2348/69	O127:H6	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	88255	OR:H6	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	88160	O19:H4	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	55784	O2:NM	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	JPN10	O44:H18	Ceparío de Medicina
<i>E. coli</i>	093211	O157:H7	Aislamiento de bovinos muertos con diarrea
<i>E. coli</i>	093206	O157:H7	Aislamiento de bovinos muertos con diarrea
<i>E. coli</i>	091984	O157:H7	INDRE (caso importado de California, E.U.)

Algunas de las cepas de *Salmonella* fueron donadas por la Dra. Emma I. Melendro, Departamento de Investigación de Medicina Experimental (ubicado en el primer piso en la Hospital General), de la Facultad de Medicina (CU), de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las características de las cepas se muestran en la Tabla 2 que a continuación se presenta:

Tabla 2

Cepas de *Salmonella* donadas por el Departamento de Investigación de Medicina Experimental (UNAM)

Cepa bacteriana	Clasificación	Serotipo	Origen
<i>Salmonella</i>	JM1301	<i>typhi</i>	Aislada por el Dr. Alfaro en una epidemia en México en los años 70's
<i>Salmonella</i>	F1	<i>typhimurium</i>	Cepa de baja virulencia para ratón. Aislada de gastroenteritis humana por el Dr. Leoncio Filloy (Hospital Infantil de México)
<i>Salmonella</i>	F3	<i>typhimurium</i>	Cepa de elevada virulencia para ratón. Aislada de gastroenteritis humana por el Dr. Leoncio Filloy (Hospital Infantil de México)

Otras cepas de *Salmonella* fueron donadas del Laboratorio de Microbiología Molecular dirigido por el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CU), de la Universidad Nacional Autónoma de México, las características de las cepas se observan en la Tabla 3, que muestran a continuación se presenta:

Tabla 3

Cepas de <i>Salmonella</i> donadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular	Clasificación	Serotipo
Cepa bacteriana <i>Salmonella</i>	ATCC (se desconoce el número)	<i>typhimurium</i>
<i>Salmonella</i>	FVB323	<i>gallinarum</i>
<i>Salmonella</i>	F4 (fagotipo)	<i>enteritidis</i>

Las cepas usadas como control negativo fueron donadas por QFB. Mireya Nicoli Tolosa de Medicina Preventiva, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CU), de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las características de las cepas no se conocen a detalle pero se muestra el listado de ellas:

- ❖ *Shigella sonnei*
- ❖ *Proteus sp*
- ❖ *Klebsiella sp*

Una vez obtenidos los géneros bacterianos se les realizó a cada uno de ellos pruebas bioquímicas para corroborar la identificación de la cepa. Se colocó las cepas con medio de cultivo enriquecido a crecer (cada cepa por separado), una parte este crecimiento se preservó por separado por medio de congelación simple ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) con un protector (glicerina al 60%) que se emulsificó con el medio de cultivo (caldo Luria-Bertani [LB] estéril). La otra parte del crecimiento microbiano se conservó a temperatura ambiente, en tubos con tapón de rosca, sobre medio inclinado a base de gelosa sangre y extracto de carne, para que a partir de él se hiciera la resiembra y el acondicionamiento, utilizando cultivos en medios selectivos y pruebas bioquímicas cada vez que fuera necesario. De este cultivo se obtuvo el cultivo de trabajo que se colocó en caldo LB para su posterior obtención de DNA.

### 3.2 Estandarización de la técnica de minipreparación de DNA con modificación de tiempo de lisis celular, tiempo y temperatura de incubación de lisozima, uso de RNAsa y concentración de NaCl

Con las cepas obtenidas se inició el trabajo experimental empleando la técnica referida por Silhavy *et al* (1984) para la extracción de DNA<sup>41</sup>. Con esta técnica se realizaron posteriormente las modificaciones para utilizarla en el presente trabajo:

Se homogenizó la muestra contenida en el tubo de rosca donde se cultivó la bacteria. Se tomaron 10 ml del cultivo en un tubo Falcon y se centrifugó 12 minutos a 3,500 rpm. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 1 ml de solución de lisis; primero se resuspendió la muestra en un tubo Eppendorff dejando incubar la mezcla a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se le adicionó lisozima a la concentración final de 1.5 mg/ml, incubándose 1 hora a temperatura ambiente. El tubo se calentó a ebullición en baño María por un minuto. Se le adicionó RNAsa a una concentración final de 15µg/ml y se incubó 1 hora a 37°C. A continuación se agregó cloruro de sodio a una concentración final de 1M, se mezcló vigorosamente y se centrifugó 10 minutos a 13,600 rpm. Al sobrenadante se le adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, siguiendo una congelación de 1 hora a -20°C. Pasado este tiempo se centrifugó 10 min a 14 000 rpm a 4 °C (centrifuga: marca Eppendorf, modelo 5417C). La pastilla de DNA se lavó con etanol al 70%, para su posterior secado. Se suspendió y diluyó el DNA con agua bidestilada. La presencia e integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.5µg/ml] sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.3 Selección de los iniciadores para PCR múltiple

En el presente estudio para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 se utilizaron 4 pares de iniciadores, para *Salmonella* dos pares de iniciadores y un par de iniciadores para identificar a la secuencia control positivo, los cuales se describen en la Tabla 4:

Todos los iniciadores empleados fueron adquiridos de la empresa BQ The providers S. A. de C. V., a la cual se hacía llegar la secuencia por escrito.

Tabla 4. Iniciadores empleados para detectar *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

Bacteria	Gene amplificado	Tamaño del producto de PCR (pb).	Designación del iniciador	Secuencia del iniciador (largo del iniciador en nucleotidos)
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>slt - I</i>	348	SLT-P SLT-N	5' - CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG - 3' <sup>6</sup> 5' - CACCAGACAATGTAACCGCTG - 3' <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>slt-II</i>	584	PST-P PST-N	5' - ATCCTATTCCCAGGGAGTTTACG - 3' <sup>6</sup> 5' - GCGTCATCGTATACACAGGAGC - 3' <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>uidA</i>	252	UID-P UID-N	5' - GCGAAACTGTGGAATTGGG - 3' <sup>6</sup> 5' - TGATGCTCCATAACTTCCTG - 3' <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>eaeA</i>	633	EAE-P EAE-N	5' - CCATAATCATTTTATTTAGAGGGA - 3' <sup>32</sup> 5'-GAGAAATAAATTATATTAATAGATCGGA-3' <sup>32</sup>
<i>Salmonella</i>	Secuencia repetida	199	SR-P SR-N	5' - GATCATCCATTTCGGCATTAAACA - 3' <sup>20</sup> 5' - TTCTCAGCGACGGAAGGGTAAATC - 3' <sup>20</sup>
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	284	INVA1 INVA2	5'- GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3' <sup>39</sup> 5' - TCATCGCACCGTCAAAGGAACC - 3' <sup>39</sup>
Plásmido		100	PBS 1	5' - GTACCGGGCCCCCCTCGAG - 3' <sup>8</sup>

Bluscript		PBS 2	5' - ACCGCGGTGGCGGCCGCTCT - 3' <sup>8</sup>
-----------	--	-------	---

Se realizaron ensayos con DNA de un plásmido y de un bacteriófago, para integrar uno de ellos a las reacciones de PCR, esto con el fin de complementar la reacción ya que sirvió como control positivo de la misma y como control negativo del DNA que se experimenta. Se utilizó el plásmido Bluscript (pBS) y el bacteriófago M13 a diferentes concentraciones para encontrar el más adecuado así como la concentración óptima del mismo.

El Bluescript II KS+/- es un plásmido de 2961 pares de bases derivado del pUC19. La designación KS indica que la poliunión está orientada hacia el *lacZ*, la transcripción procede del Kpn I al Sac HI. Banco genético® # X52327 (KS+), X52329 (KS-) <sup>8</sup>.

El genoma del bacteriófago M13 es una simple tira circular de DNA de 6407 nucleótidos de largo numerados de 3' → 5' <sup>8</sup>.

#### Iniciadores que se emplearon

En el momento de la recepción de los iniciadores, cada uno de ellos era acompañado con la hoja descriptiva de las características correspondientes, que entre otros datos contenía la cantidad total del iniciador en nanomoles; con este dato se procedía a realizar la suspensión de los iniciadores con amortiguador (Tris-HCl pH 8 1M) a una concentración final de 200 μM (solución stock) con cada uno de los iniciadores por separado. También se preparó una solución de trabajo a una concentración final de 10 μM, para cada uno de los pares de iniciadores.

Para realizar una reacción múltiple fue necesaria la mezcla de todos los iniciadores a una concentración final de 10 μM.

### **3.4 Acondicionamiento de PCR múltiple en tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio**

Las concentraciones finales para la realización de una reacción de PCR se encuentran en la Tabla 5:

Tabla 5

Reactivo	Concentración del reactivo	µl necesarios para 1 reacción	Concentración final en la reacción
Agua bidestilada		9.75	
Nucleótidos (dNTPs)	2mM (10X)	2	0.2 mM
Iniciador	10 µM (cada 1)	2	1 µM
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	3 mg/ml	1	0.15 mg/ml
Triton	2 %	1	0.1 %
Amortiguador D (amortiguador C) *	2mM (1.5mM) Mg <sup>++</sup>	2	0.2 (0.15) mM
Enzima Taq polimerasa	5 U/µl	0.25	0.0625 U/µl
DNA		2	
Total 20 µl			

\* El amortiguador D (ó amortiguador C) contiene además del Mg<sup>++</sup>: 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 µg/ml gelatina

Las condiciones de amplificación fueron en un inicio las referidas por Cebula *et al* (1995), Meng *et al* (1997), Gooding, *et al* (1999) y Rahn, *et al* (1992), para las secuencias elegidas, para cada uno de los dos microorganismos y el DNA del plásmido y bacteriófago, las cuales se muestran en la Tabla 6 y posteriormente se adecuaron para así realizar múltiplex con ellas <sup>6, 20, 32, 39</sup>, a continuación se muestran los tiempos, temperaturas y número de ciclos.

Tabla 6

Diferentes condiciones de amplificación para las diferentes regiones genéticas bacterianas

Bacteria	Autor	Gen	# de ciclos	Desnaturalización	Alineación	Hibridación ó elongación
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Cebula <i>et al</i> (1995)	<i>sflI</i>	35	94°C, 1.5 min	64°C, 1.5 min	72°C, 1.5 min
		<i>sflII</i>				
		<i>uidA</i>				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Meng <i>et al</i> (1997)	<i>eaeA</i>	30	94°C, 1 min	62.5°C, 1.5 min	72°C, 1 min
<i>Salmonella</i>	Gooding, <i>et al</i> (1999)	Secuencia repetida	35	94°C, 30 seg	48°C, 30 seg	72°C, 30 seg
<i>Salmonella</i>	Rahn, <i>et al</i> (1992)	<i>invA</i>	40	94°C, 1 min	53°C, 2 min	74°C, 3 min

### 3.5 Prueba de especificidad de los iniciadores contra otros géneros bacterianos

Como controles positivos se utilizaron cepas de referencia que se citan a continuación:

- *Salmonella*: *S. typhi* JM1301, *S. typhimurium* F1, *S. typhimurium* F2, *S. typhimurium* ATCC, *S. gallinarum* FVB323 y *S. enteritidis* F4.

- *Escherichia coli* O157:H7: 91984, 93206, 93211.

La prueba de especificidad para la reacción de PCR múltiple se realizó mediante la utilización de DNA de otros géneros bacterianos relacionados con los estudiados: *Shigella sonnei*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Escherichia coli*: 55784, 66295, 88/66, 88265, E2348/69 y JPN10.

### **3.6 Determinación de sensibilidad de la técnica de PCR múltiple con DNA puro**

Para la determinación de la sensibilidad de la técnica de PCR se utilizaron cultivos puros de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*. Se realizó cuantificación del DNA y diluciones décuples y dobles hasta obtener 0.468 fentogramos (fg) de DNA/ $\mu$ l que equivalen a 0.312 unidades formadoras de colonia (UFC), tomando en cuenta que una bacteria contiene aproximadamente  $3 \times 10^6$  kd de DNA<sup>1</sup>.

### **3.7 Determinación del inóculo de *Salmonella sp* a utilizar para contaminación de la carne.**

Se realizó el crecimiento de *Salmonella* y establecer la población en unidades formadoras de colonias (UFC), así como su tiempo de duplicación ( $2\ln/\mu$ ), para estimar el número de bacterias con las que se inoculó la carne y el número de bacterias que se esperó recuperar pasado el tiempo de incubación sobre la carne de res.

En un matraz Erlenmeyer con 50 ml de caldo LB estéril, se depositó una colonia bacteriana de *Salmonella*, incubándose 24 horas a 37°C en una incubadora de agitación con temperatura controlada (New Brunswick Scientific Co, Inc.) a 150rpm, para obtener el inóculo. Posteriormente en otro matraz con 250 ml de caldo Luria se inocularon 25 ml de la suspensión bacteriana del crecimiento anterior y desde este momento se tomó a cada hora la densidad óptica en un espectrofotómetro (Spectronic 20 de Bausch and Lomb) con una longitud de onda de 590, con un total de 6 mediciones y al mismo tiempo se hizo plaqueo con 100  $\mu$ l para determinar el número de células viables.

### **3.8 Determinación del inóculo de *E. coli* O157:H7 a utilizar para contaminación de la carne.**

Al igual que en caso anterior, con *E. coli* O157:H7, también se realizó el crecimiento con el fin de establecer las unidades formadoras de colonias (UFC) y su tiempo de duplicación ( $2\ln/\mu$ ), para estimar el número de bacterias con las que se inoculó la carne y el número de bacterias que se esperó recuperar pasado el tiempo de incubación sobre la carne de res.

En un matraz Erlenmeyer con 50 ml de caldo Luria estéril, se depositó una colonia bacteriana, colocándose en una incubadora de agitación y temperatura controlada marca New Brunswick Scientific Co, Inc., por 24 horas a 37°C con 150rpm, para obtener el inóculo. En otro matraz con 250 ml de caldo LB se inocularon 25 ml de la suspensión bacteriana del crecimiento anterior, desde este momento se tomó cada hora la densidad óptica en un espectrofotómetro Spectronic 20 de Bausch and Lomb, con una longitud de onda de 590 y un total de 6 mediciones. Al mismo tiempo se hizo plaqueo para determinar el número de células viables.

### 3.9 Determinación de la eficiencia de la técnica de PCR con alimentos

Se contaminaron 3 grupos de trozos de carne de res de aproximadamente 100 g cada uno, con diferentes diluciones, de las bacterias del estudio. En la Tabla 7 se presenta la contaminación de la carne de res.

Tabla 7  
Contaminación de carne de res

Bacteria	Dilución de la suspensión bacteriana		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>
<i>Salmonella</i>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>
Mezcla de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>

Además se tuvieron dos grupos control: uno con carne lavada y otro con carne sin lavar.

Todas las carnes fueron lavadas con solución salina fisiológica (SSF) estéril (exceptuando el control de la carne sin lavar) previa a la contaminación por inóculo. Se colocaron las carnes en charolas de poliuretano para ser manipuladas con seguridad (las charolas también recibieron lavado con SSF estéril).

Una vez lavadas se procedió a inocular la carne con un mililitro de la respectiva suspensión, se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente, destapadas y sin ningún otro tratamiento.

Para determinar el número de bacterias inoculadas se plaquearon 100 µl de las respectivas diluciones en agar LB como control.

Pasado el tiempo de incubación a cada una de las carnes contaminadas se les colocó una plantilla ó molde a escala para que la toma de muestra se acercara lo más posible a la toma de las muestras en el rastro. Una vez colocado el molde, se recuperó la muestra aplicada frotando con un hisopo estéril en cada una de las carnes para la toma de la muestra. Con este

hisopo se sembró por estría en agar LB y enseguida se colocó en un tubo con tapa de rosca conteniendo caldo (LB) para posteriormente realizar la técnica de PCR con esta muestra.

Estas muestras se dejaron incubando 24 horas a 37°C para que las bacterias dañadas se recuperaran, aumentando la probabilidad de encontrar bacterias vivas y disminuir lo más posible los elementos constitutivos de la carne que se encontraran presentes en el momento de realizar PCR.

### **3.10 Muestreo de las canales**

Se muestrearon 120 canales en el pecho con un hisopo estéril, 60 de un rastro municipal y 60 de un rastro Tipo Inspección Federal. El número de muestras se determinó de acuerdo con los criterios microbiológicos para carne cruda, establecidos por el ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) <sup>25</sup>. Para este muestreo se manejó un programa de dos clases donde solo existe el aceptable y el no aceptable; se puntualiza que de estas muestras el 98% de ellas deberán estar exentas de las bacterias patógenas y solo el 2% de ellas podrán contenerlas para que el lote pueda ser aceptado. Las categorías que se ajustan de acuerdo al ICMSF con respecto a las bacterias utilizadas en el presente estudio son las correspondientes a donde puede aumentar su peligrosidad en condiciones normales, en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo.

El rastro municipal donde se obtuvieron las muestras fue el de Tlalnepantla y la planta TIF fue la número 45 "Empacadora de Carnes Unidad Ganadera de Aguascalientes, S. A. de C. V. (Empacadora UGASA)" ubicada en Aguascalientes, Aguascalientes. La elección de las canales para la toma de muestra fue al azar.

Se elaboraron 120 moldes de cartón forrados de papel aluminio, los cuales fueron envueltos de manera individual para su posterior esterilización; cada uno de los moldes se utilizó para cada una de las tomas de la muestra.

#### **3.10.1 Localización de las superficies de muestreo de las canales**

La toma de muestra de las canales se realizó después del sacrificio y faenado. Para localizar el pecho se realizó lo siguiente: Una vez localizado el codo, se trazó una línea imaginaria hacia el dorso de la línea media del codo, representando esto el punto de inicio. Un molde de 300 cm<sup>3</sup> se colocó en esta área para cada toma de muestra como se indica más adelante.

### **3.10.2 Toma de las muestras microbiológicas de las superficies de canal con hisopos**

La toma de la muestra se realizó frotando el hisopo estéril en la superficie que comprendía el molde, una vez realizado lo anterior el hisopo se colocó en tubos de polipropileno estériles con solución salina fisiológica estéril, los cuales se transportaron en una hielera con refrigerantes, disminuyendo la temperatura de transporte del rastro al laboratorio para su posterior procesamiento. En el tubo se verificó la inexistencia de fuga del contenido, además de identificar adecuadamente cada una de las muestras. Esta técnica empleada para toma de muestra es la sugerida por Bhaduri y Cottrell (1998). Con esta muestra se procedió a la realización de la técnica de PCR y los métodos de prueba microbiológicos oficiales.

## **3.11 Métodos microbiológicos convencionales oficiales**

### **3.11.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp**

La metodología empleada es la que refiere la NOM - 114 - SSA1 – 1994, método para la determinación de *Salmonella* en alimentos <sup>34</sup>, todas las etapas se utilizaron para la identificación de *Salmonella* en las muestras obtenidas.

Dentro de la sistemática analítica para el aislamiento e identificación de bacterias del género *Salmonella*, se utilizan habitualmente, varias etapas:

∞ Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo.

Es el paso donde la muestra se enriqueció en un medio no selectivo permitiendo restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

∞ Enriquecimiento en medio líquido selectivo.

Empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

∞ Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos.

En este paso se utilizaron medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permitió el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

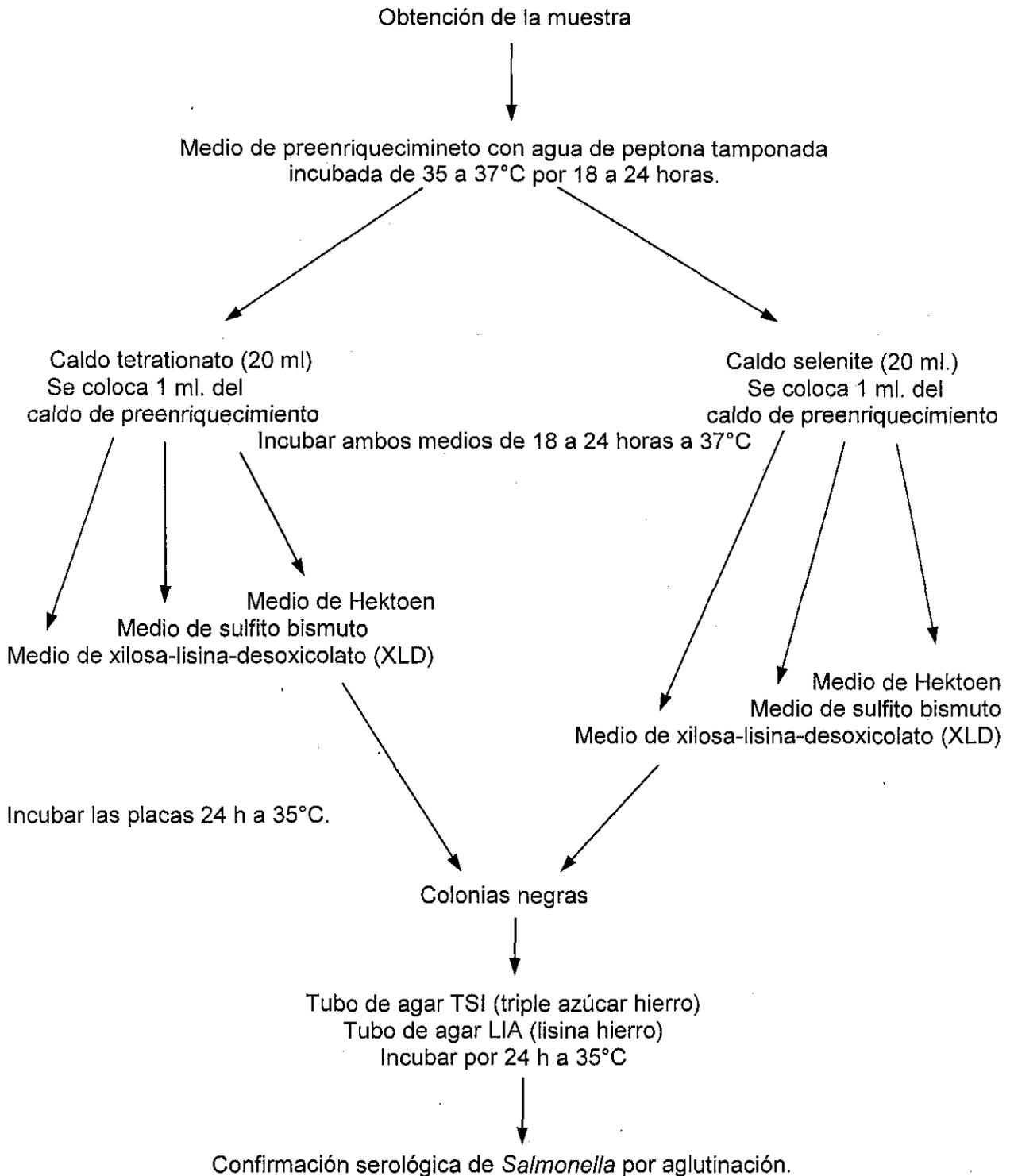
∞ Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.

Con lo cual se permitió la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

∞ Confirmación serológica de las colonias sospechosas.

Permitió la identificación específica de un cultivo.

**Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de *Salmonella*<sup>34</sup> de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994, método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.**



### 3.11.2 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157:H7

Está es la metodología oficial en Estados Unidos de América, publicada en el manual de la Organización Americana de Análisis Químicos (AOAC, del ingles)<sup>17</sup>.

Se aplicó un procedimiento de enriquecimiento y aislamiento utilizando el medio de Telurito-Cefixima-Sorbitol MacConkey (Agar TCSMAC) introducido recientemente para detectar *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos. Tanto el medio de enriquecimiento como el medio selectivo contenían antibióticos, los cuales impidieron en forma efectiva el desarrollo de la flora asociada. No obstante la mayoría de las *E. coli* son fermentadoras de sorbitol, cerca del 6% de los aislamientos no fermentan este carbohidrato. Estas cepas atípicas pueden encontrarse en los alimentos y serán idénticas a las colonias de O157:H7 aisladas en agar TCSMAC. El uso del 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurónico (MUG) en el análisis debe diferenciar las colonias atípicas de *E. coli* de las cepas O157:H7.

#### ∞ Enriquecimiento en medio EEB.

El caldo de enriquecimiento para *Escherichia coli* enterohemorrágica (EEB) tiene la misma fórmula del caldo soya tripticasa pero modificado, al cual se le adicionó antibióticos esterilizados (cefixima [0.05 mg/l], cefsoludin [10.0 mg/l], vancomicina [8.0 mg/l] y novobiocina [0.02 mg/l]) por filtración. Se pesaron 25 g de muestra, agregando 225 ml de caldo de enriquecimiento EEB, homogeneizando e incubando a 37°C con agitación durante 6 horas. No se debe eliminar este medio, se mantiene 18 horas más.

#### ∞ Aislamiento diferencial sobre medios sólidos.

Se tomó 0.1 ml del cultivo anterior e inoculó por extensión a placas de agar TCSMAC y se sembró una asada a una segunda placa con agar TCSMAC, incubando las placas a 37°C durante 18 – 24 horas.

Morfología colonial. Las colonias fermentadoras de sorbitol aparecen de color rosa a rojo; las colonias típicas de *E. coli* O157:H7 son incoloras con centro grisáceo de 1 – 2 mm de diámetro, no hay fluorescencia con la luz ultravioleta.

Se seleccionaran varias colonias típicas y sembrándolas en tubos de agar inclinado de soya tripticasa extracto de levadura, se incubaron a 37°C 18 – 24 horas. Si las placas no presentaban colonias típicas, se repite el sembrado en TCSMAC y la incubación de las mismas de aquellas de la etapa de crecimiento de 24 horas del caldo de enriquecimiento.

☞ Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.

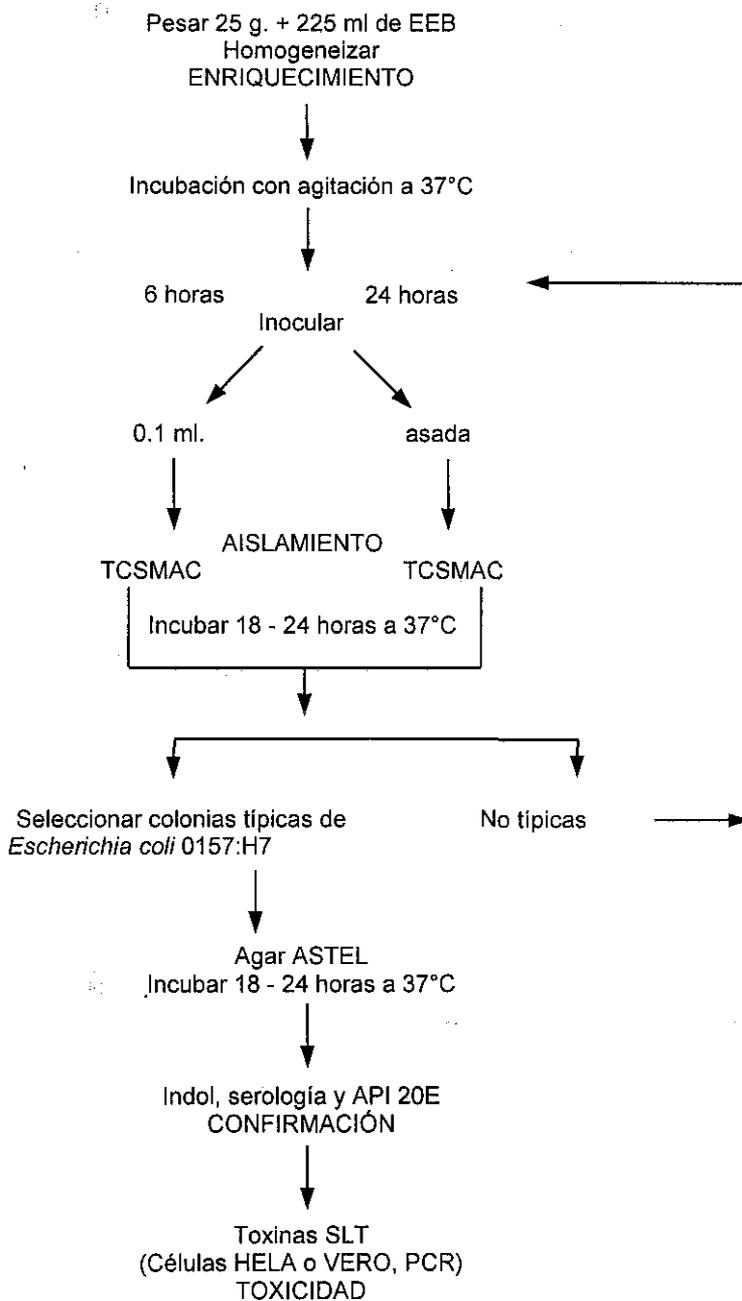
Se realiza prueba tamiz del crecimiento en agar soya tripticasa extracto de levadura humedeciendo un papel filtro que tendría reactivo de kovac (prueba de indol). Las colonias de *E. coli* enterohemorrágica son indol (+).

Si la prueba de indol era positiva se aglutinaba con antisueros O157:H7. Así mismo realiza prueba de API ó VITEK para confirmar el aislamiento de *E. coli*. Si la prueba de indol llega a ser negativa, no se determinara toxicidad.

☞ Confirmación toxicidad de las colonias sospechosas.

Al llegar a este punto se determinara la presencia de las toxinas similares a la Shiga (SLT I y II) en la bacteria, pudiendo utilizar diferentes sistemas como cultivos de células HeLa ó Vero ó la técnica de PCR.

**Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157:H7, esta metodología es la oficial en Estados Unidos de America publicada en el manual AOAC <sup>17</sup>.**



EEB: Caldo de Enriquecimiento para *Escherichia coli* Enterohemorrágica.

TCSMAC: Agar MacConkey Sorbitol.

ASTEL: Agar Soya Tripticasa Extracto de Levadura.

### **3.12 Realización de PCR múltiple con las muestras obtenidas de los diferentes rastros.**

Una vez obtenidas las muestras se realizaron extracciones de DNA y después se realizaron PCR múltiple.

### **3.13 Determinación del tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y las técnicas microbiológicas convencionales**

Se determinó el tiempo para la realización de la técnica de PCR múltiple y los métodos oficiales microbiológicos convencionales considerando en cada uno de los tiempos y fases involucrados.

### **3.14 Comparación de los niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y las técnicas microbiológicas oficiales**

Por comparación se evaluaron los niveles de "sensibilidad" entre ambos procedimientos de detección bacteriana.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención y acondicionamiento de las cepas bacterianas

Se obtuvieron y acondicionaron 18 cepas de acuerdo con los requerimientos de cada una de ellas, durante todo el curso de la investigación, mediante lo estipulado por las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes.

### 4.2 Estandarización de la minipreparación de DNA con modificación de tiempo de lisis celular, tiempo y temperatura de incubación de lisozima, uso de RNAsa y concentración de NaCl

Se hicieron las modificaciones para la realización de la minipreparación de DNA según la técnica de Silhavy *et al* (1984), como a continuación se describe: tiempo de lisis: 1 hora; tiempo y temperatura de incubación de la lisozima: 1 hora a temperatura ambiente; uso de RNAsa: a una concentración final de 15µg/ml, incubando 1 hora a 37°C y concentración final de NaCl: 1M. La muestra se ilustra en la Figura 1, donde se observa en el carril # 1 y 15 los marcadores de tamaño de los fragmentos y en los carriles 2 al 14 y del 16 al 29 se encuentran las muestras bacterianas que se sometieron a la extracción de DNA. La molécula de DNA se localiza por arriba de 8454 pares de bases (pb) que es la más grande de las bandas del marcador de tamaño del DNA del bacteriófago (Lamda/BstEII). Es indispensable verificar la obtención de DNA ya que es la materia prima para poder realizar PCR.

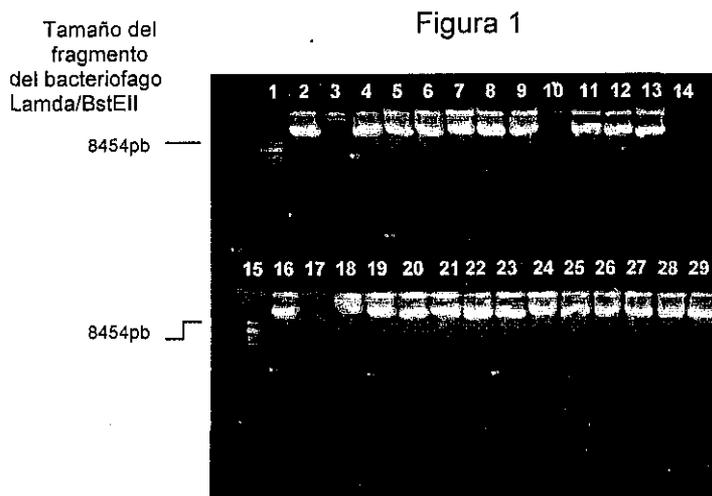


Figura 1. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. En el carril 1 y 15 se encuentra el marcador de tamaño del DNA del bacteriófago lamda/BstEII. De los carriles 2 al 14 y 16 al 29 alicuotas de las muestras sometidas a extracción de DNA de *Escherichia coli* y *Salmonella* observándose una banda de alto peso molecular, nítida, única.

#### 4.3 Prueba de los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple

##### Prueba de iniciadores adquiridos para realizar la técnica de PCR con DNA de *Escherichia coli* O157:H7

Las bandas que resultaron de la utilización de los 4 pares de iniciadores, para la identificación de *E. coli* O157:H7, se muestran en la Figura 2. Se observan las bandas amplificadas en pares, que corresponden a los genes: *stt I*, *stt II*, *eaeA* y *uidA* respectivamente. Se amplificó satisfactoriamente con los iniciadores adquiridos.

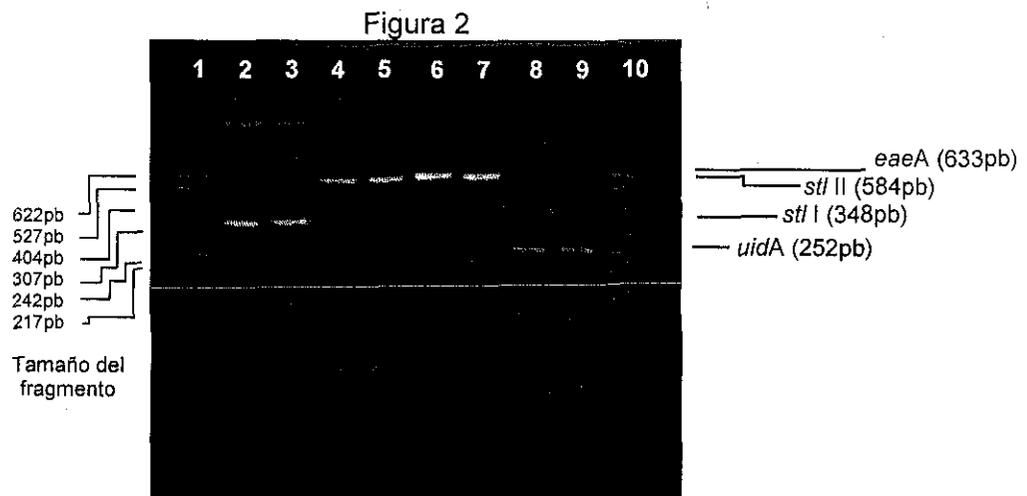


Figura 2. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR con cultivo puro *Escherichia coli* O157:H7 en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 1.5 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 y 10 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la banda correspondiente al gen *stt I*, carriles 4 y 5 se observa la banda correspondiente al gen *stt II*, carriles 6 y 7 se observa la banda correspondiente al gen *eaeA*, carriles 8 y 9 se observa la banda correspondiente al gen *uidA*.

##### Prueba de iniciadores adquiridos para realizar la técnica de PCR con DNA de *Salmonella*

Para la detección de *Salmonella*, en un inicio se utilizaron 2 pares de iniciadores (secuencia repetida y gen *invA*). La imagen electroforética del corrimiento de los productos de PCR con estos dos iniciadores se muestra en la Figura 3. Se obtuvieron resultados satisfactorios con la secuencia repetida y con el gen *invA*.

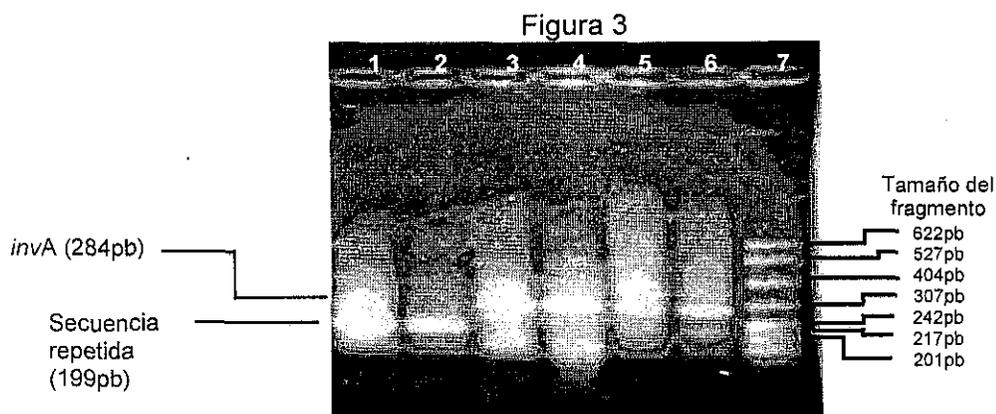


Figura 3. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR con cultivo puro *Salmonella* en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 1.5 mM de Mg<sup>++</sup>. Carril 7 tamaño de fragmento de pBR322/Msp1, carriles 1 y 2 se observa una banda de 199 pb correspondiente a la secuencia repetida, carriles 3 y 4 banda correspondiente al gen de invasión y carriles 5 y 6 se percibe la amplificación múltiple en *Salmonella*.

En la Figura 3 se puede observar que cuando se amplificó *Salmonella* con los diferentes pares de iniciadores con 1.5 mM de Magnesio, las bandas son casi imperceptibles debido a la concentración de magnesio que se utilizó.

#### Estandarización de la técnica de PCR para la detección de las diferentes bacterias del estudio

En esta etapa se realizó la estandarización de la técnica de PCR con DNA purificado para detectar simultáneamente varias bacterias. Al respecto, la Figura 4 muestra los resultados obtenidos; en los primeros carriles se amplificó a cada par de iniciadores por separado, para que al final se observaran 6 bandas que son las que se esperaban obtener en la reacción múltiple. En la parte superior (de izquierda a derecha) se observan las bandas correspondientes a: *slt I*, *slt II*, *uidA*, *eaeA* y la amplificación múltiple únicamente para *Escherichia coli* O157:H7; en la parte inferior (también de izquierda a derecha) se demuestra la aparición de la banda correspondiente a la secuencia repetida, después la amplificación del gen *invA*, la amplificación de ambos iniciadores para *Salmonella* para finalizar con la amplificación simultanea de ambas bacterias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

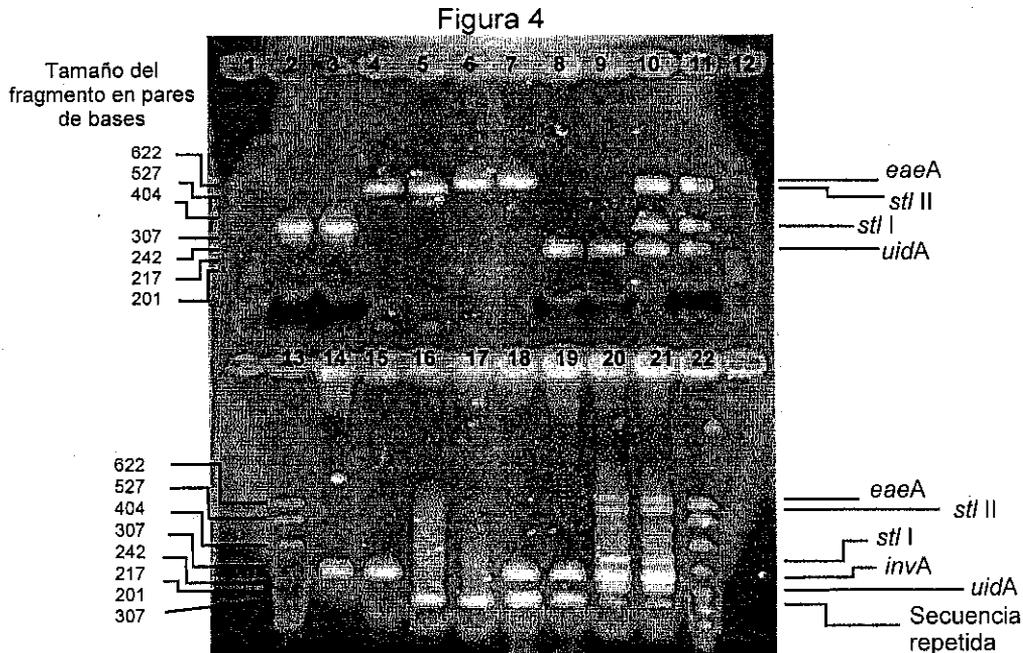


Figura 4 Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR con cultivos puros *Escherichia coli* y *Salmonella* en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En los carriles 1, 12, 13 y 22 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la banda correspondiente al gen *stl I*, carriles 4 y 5 se observa la banda correspondiente al gen *stl II*, carriles 6 y 7 se observa la banda correspondiente gen *eaeA*, carriles 8 y 9 se observa la banda correspondiente gen *uidA*, carriles 10 y 11 amplificación múltiple de *Escherichia coli* O157:H7; 14 y 15 banda correspondiente al gen de la secuencia repetida; 16 y 17 banda correspondiente al gen de invasión; 18 y 19 amplificación múltiple en *Salmonella* y carriles 20 y 21 amplificación múltiple de las dos bacterias.

#### Estandarización de control positivo para la técnica de PCR múltiple

Al utilizar el DNA del bacteriófago M13 se amplificaron dos bandas, la banda de mayor peso (la de arriba) interfiere con las bandas del PCR múltiple, por lo cual se procedió a hacer diluciones de los iniciadores para experimentar si era posible eliminarla. Se observan en la Figura 5 las dos bandas amplificadas del bacteriófago M13.

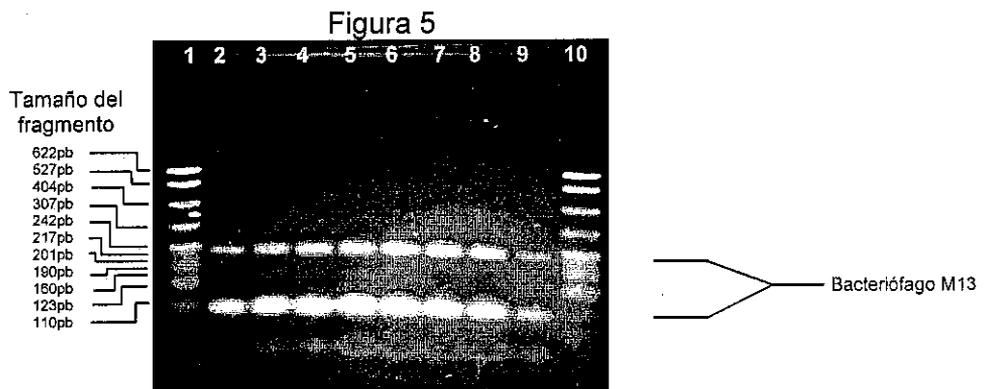


Figura 5. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR del bacteriófago M13 en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10, marcador de tamaño de fragmento de pBR322/MSP1, carril 2, 0.2 ng de DNA; carril 3, 0.1 ng de DNA; carril 4, 0.05 ng de DNA; carril 5, 25 pg de DNA; carril 6, 12.5 pg de DNA; carril 7, 6.25 pg de DNA; carril 8, 3.12 pg de DNA; carril 9, 1.5625 pg de DNA.

Se realizaron diluciones seriales para tratar de eliminar la banda superior que se amplificó con el bacteriófago M13, pero como se observa, aun aparecen dos bandas. Para tratar de resolver el doble bandeado, se realizaron diluciones seriales de plásmido. La Figura 6 muestra las diluciones de los iniciadores universales realizadas para estos plásmidos, pero aun se observaron dos bandas.

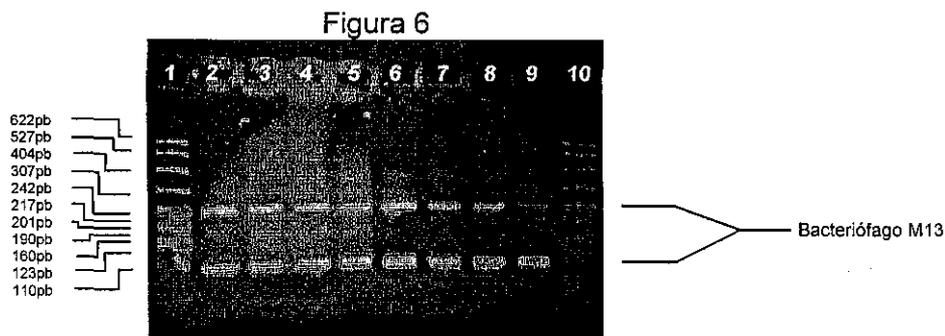


Figura 6. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR del bacteriófago M13 en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10, marcador de tamaño de bandas del pBR322/MSp1, carril 2, 6.25 pg de DNA; carril 3, 3.125 pg de DNA; carril 4, 1.5625 pg de DNA; carril 5, 0.7812 pg de DNA; carril 6, 0.3906 pg de DNA; carril 7, 0.1953 pg de DNA; carril 8, 0.0976 pg de DNA; carril 9, 0.0488 pg de DNA.

Al no poder eliminar la banda de mayor peso molecular se procedió a diseñar iniciadores que amplificaran una región de 100 pb del bacteriófago M13 para que la banda no interfiriera con el PCR múltiple cuando se integrara con la reacción; esta imagen se ilustra en la Figura 7, la cual se muestra a continuación.

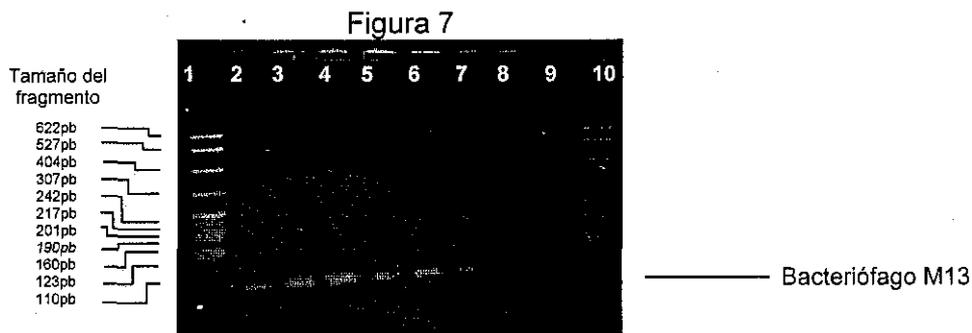


Figura 7. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR del bacteriófago M13 en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10, marcador de tamaño de banda de pBR322/MSp1, carril 2, 3.125 pg de DNA; carril 3, 1.5625 pg de DNA; carril 4, 0.7812 pg de DNA; carril 5, 0.3906 pg de DNA; carril 6, 0.1953 pg de DNA; carril 7, 0.0976 pg de DNA; carril 8, 0.04882 pg de DNA; 0.0244 pg de DNA en el carril 9.

También se utilizó plásmido Bluescript (pBS) con los iniciadores que amplifican los 100 pb, obteniendo un resultado óptimo, el cual se observa en la Figura 8.

Figura 8

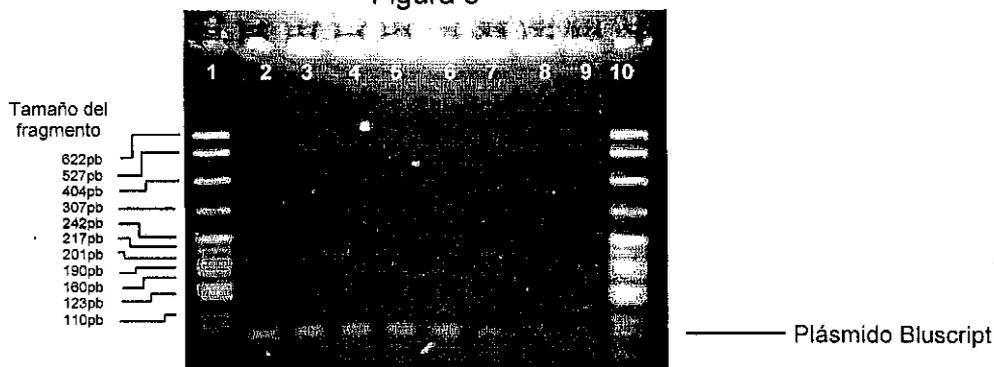


Figura 8. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR del plásmido Bluescript en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10, marcador de tamaño de banda pBR322/Msp1, carril 2, 3.125 pg de DNA; carril 3, 1.5625 pg de DNA; carril 4, 0.7812 pg de DNA; carril 5, 0.3906 pg de DNA; carril 6, 0.1953 pg de DNA; carril 7, 0.0976 pg de DNA; carril 8, 0.04882 pg de DNA; carril 9, 0.0244 pg de DNA.

Realización de la técnica de PCR múltiple incluyendo el plásmido probado

Figura 9

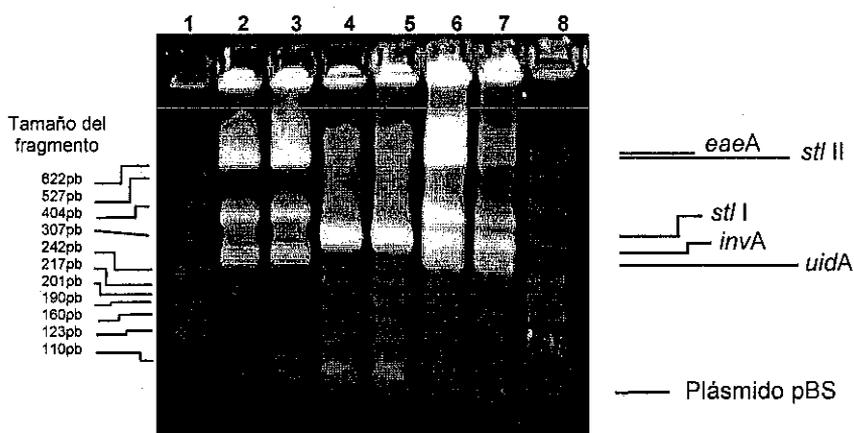


Figura 9. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR múltiple de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y plásmido Bluescript en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 y 8 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322Msp1. En los carriles 2 y 3 se observan las bandas amplificadas de *E. coli* y pBS, carriles 4 y 5 se observa las bandas correspondiente a *Salmonella* y pBS, carriles 6 y 7 se observa el PCR múltiple.

Cuando se incluyó la secuencia para polimerizar al plásmido junto con los iniciadores y amplificar a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, se comprobó que no existía interferencia entre los iniciadores, ni entre cada uno de los DNA purificados. Este resultado se puede visualizar en la Figura 9.

La concentración final de todos los DNA utilizados para la reacción múltiple fue de 25 ng/µl.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

#### 4.4 Acondicionamiento de PCR múltiple en cuanto a tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio

##### Establecimiento de tiempo, temperatura y número de ciclos para la técnica de PCR múltiple

En un principio se experimentó con los diferentes tiempos y temperaturas de amplificación que los autores mencionaban en sus publicaciones, después de realizaron combinaciones hasta llegar a un tiempo, temperatura y número de ciclos óptimos con todos los iniciadores para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y pBS esta estandarización de la reacción de PCR se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Estandarización de condiciones de reacción de PCR					
Bacteria	Gen	# de ciclos	Desnaturalización	Alineación	Hibridación ó elongación
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>slt I</i>	35	94°C, 30 seg	50°C, 30 seg	72°C, 30 seg
	<i>slt II</i>				
	<i>uidA</i>				
	<i>eaeA</i>				
<i>Salmonella</i>	Secuencia repetida				
	<i>invA</i>				
pBS					

##### Establecimiento de la concentración de magnesio para la realización de la técnica de PCR múltiple

Como se mostró en la Figura 2, las amplificaciones producidas mediante la técnica de PCR con una concentración de Mg<sup>++</sup> de 1.5 mM realizada con el DNA de *Escherichia coli* O157:H7, en ella se puede observar que las bandas no son muy claras e incluso casi no se observaron las bandas cuando se realizó el PCR múltiple. También se probó con 2.0mM de Mg<sup>++</sup>.

Se observó en el corrimiento electroforético la concentración óptima del magnesio para *Escherichia coli* O157:H7 que resultó ser de 2.0 mM de Mg<sup>++</sup>. Las bandas obtenidas son más nítidas en el gel. Estas amplificaciones se observan en la Figura 10.

Figura 10

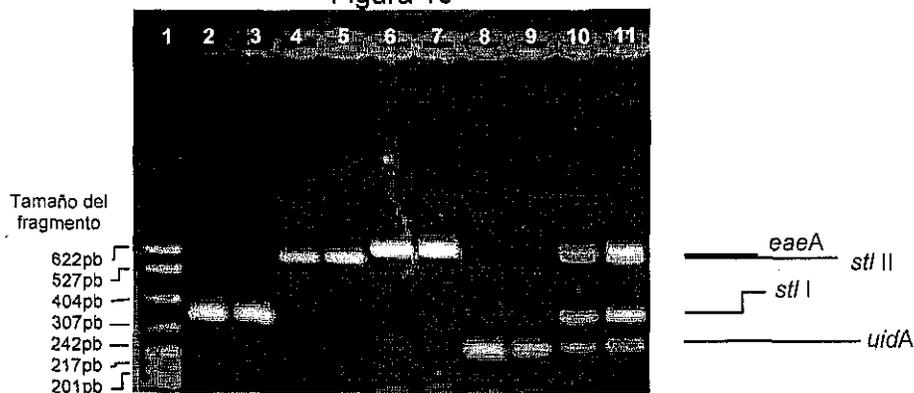


Figura 10. Corrimiento electroforético de productos amplificados por la técnica de PCR con cultivo puro *Escherichia coli* O157:H7 en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la banda correspondiente al gen *stI I*, carriles 4 y 5 se observa la banda correspondiente al gen *stI II*, carriles 6 y 7 se observa la banda correspondiente gen *eaeA*, carriles 8 y 9 se observa la banda correspondiente gen *uidA*, carriles 10 y 11 se observa las 4 bandas de la amplificación múltiple.

También para *Salmonella* se probaron las 2 diferentes concentraciones de magnesio (1.5mM y 2.0mM de Mg<sup>++</sup>) en el PCR; como también se observó en la Figura 3, las amplificaciones producidas mediante la técnica de PCR con la concentración de Mg<sup>++</sup> de 1.5 mM. Las bandas no son muy claras e incluso no se observan las bandas cuando se realizó el PCR múltiple.

Cuando se realizó la técnica de PCR con 2mM de Mg<sup>++</sup> se observó que para *Salmonella*, fue también esta la concentración óptima. Las bandas obtenidas con esta concentración de Mg<sup>++</sup> son también más nítidas y mejor visualizadas. Los productos amplificados se observan en la Figura 11.

Figura 11

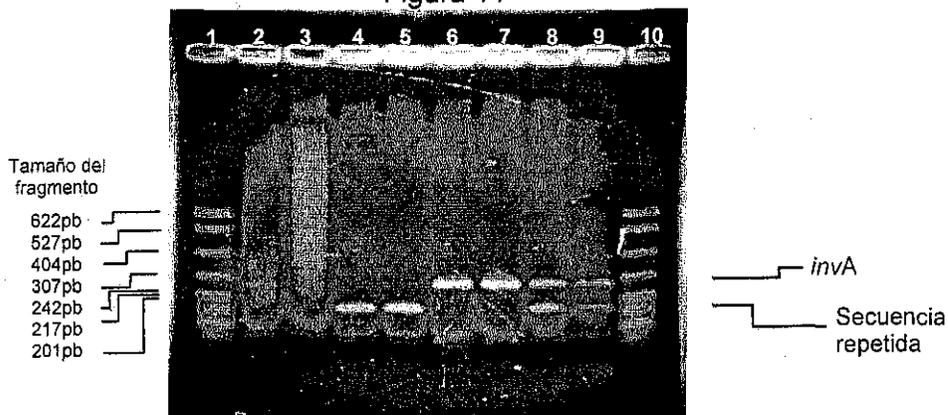


Figura 11. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR con cultivo puro de *Salmonella* en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10 tamaño de fragmento pBR322/MSP1, carriles 2 y 3 control negativo, carriles 4 y 5 se observa una banda de 199 pb correspondiente a la secuencia repetida, carriles 6 y 7 banda correspondiente al gen de invasión y carriles 8 y 9 amplificación múltiple en *Salmonella*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para ambas bacterias se estableció la concentración óptima del Mg<sup>++</sup> que fue de 2.0 mM.

#### 4.5 Prueba de especificidad de los iniciadores contra otras especies bacterianas

Con los cuatro pares de iniciadores utilizados para la identificación de *E. coli* O157:H7, se trabajó con todas las cepas de *E. coli* que no pertenecían al serotipo O157:H7 que se tenían para el estudio y no se obtuvo ninguna banda amplificada, esto quiere decir que no encontraron secuencias con las cuales pudieran interaccionar y ser amplificadas. También se realizó con bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Proteus* obteniendo el mismo resultado, tampoco se dio amplificación de ninguna banda.

Con respecto a la especificidad de *Salmonella*, los iniciadores se utilizaron con otras bacterias como *Proteus*, *Escherichia coli*, ó *Klebsiella* sin dar ninguna amplificación.

Cuando se probaron los iniciadores de *Salmonella* con *Shigella*, se observó en los carriles 2 y 3 de la Figura 12 una banda amplificada de mayor peso, siendo una amplificación inespecífica ya que no corresponde al peso esperado. Además con el par de iniciadores de la secuencia repetida, se observó la aparición de una banda de 199pb (que es igual a la observada con *Salmonella*) en los carriles 4 y 5 de la Figura 12. Por esta razón se decidió no utilizar más los iniciadores de la secuencia repetida, evitando la amplificación de *Shigella* e interpretar el resultado como *Salmonella*.

Esta banda de 199pb (secuencia repetida) también fue observada por Gooding *et al.* (1999), quien se dio a la tarea de identificar el iniciador óptimo de un grupo de 5 de ellos evaluándolos bajo las mismas condiciones reportadas, con *Salmonella* y con otras cepas bacterianas (no-*Salmonella*). Lo que encontró fue que el iniciador que amplifica la secuencia repetida fue el óptimo para detectar *Salmonella* por la técnica de PCR, pero este iniciador también producía una reacción cruzada con *Shigella sonnei*, con el mismo tamaño de banda que la que se amplifica para *Salmonella*. Para su estudio, Jitrapakdee *et al.* (1995) utilizaron *Shigella flexneri* y reportan que con este género bacteriano y con los iniciadores que amplifican la secuencia repetida, no encontraron amplificación alguna. Esto pone de manifiesto que es indispensable la selección adecuada de cada uno de los iniciadores para cada uno de los géneros bacterianos elegidos en los diferentes estudios. Al mismo tiempo es indispensable que

se tenga extremo cuidado con la pureza de los materiales y reactivos empleados para llevar a cabo la técnica de PCR.

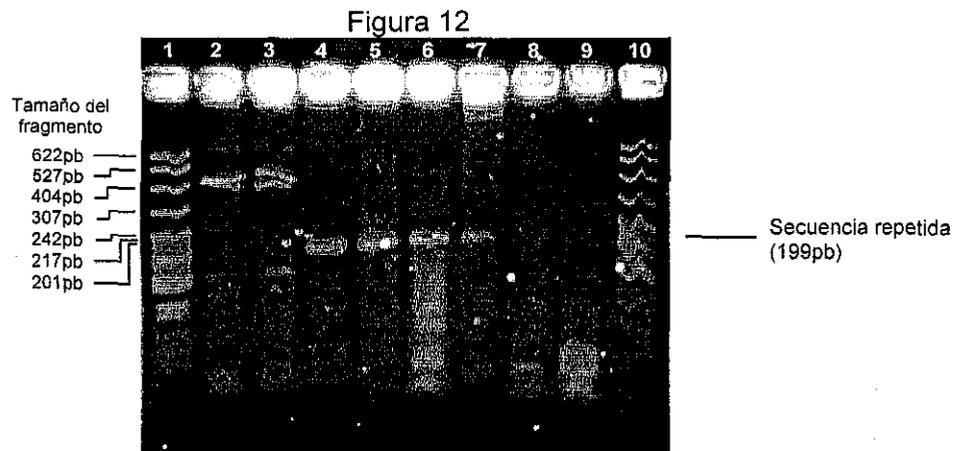


Figura 12. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR con *Shigella* en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidío 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 10 pBR322/MSp1, carriles 2 y 3 gen de invasión, carriles 4 y 5 secuencia repetida, carriles 6 y 7 amplificación múltiple y carriles 8 y 9 control negativo.

Con DNA puro de *Salmonella*, utilizando solo el par de iniciadores para la amplificación del gen *invA*, con una concentración final en la reacción de 1 µM, la amplificación que se observó en el gel de agarosa al 3% es de 284pb y una banda de mayor tamaño que apenas observable. Al reducir la concentración de la solución de trabajo del iniciador a 0.5 mM, desapareció la banda de mayor peso, la banda que corresponde a la amplificación del gen *invA* permaneció sin alteración, incluso al reducir la concentración de la solución de trabajo del iniciador a 0.25 mM aun es observable la banda del gen *invA*. Pero cuando se hace la mezcla de iniciadores para la identificación simultanea ó múltiple de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 es necesario que todos los iniciadores tengan una concentración de 1 mM ya que si hay alguno que tenga una concentración menor, este tiene una menor probabilidad de amplificar la región a la cual va dirigido. Se probó disminuir la concentración del iniciador del gen de *invA* en la mezcla de iniciadores para la reacción múltiple y lo que sucedió fue que la banda amplificada era casi imperceptible ó incluso no se amplificaba.

Todas las secuencias utilizadas como iniciadores se compararon en el banco genético obteniendo especificidad de género y especie en el caso de *Escherichia coli* O157:H7 y con *Salmonella* el gen de invasión (*invA*) fue 100% específico de *Salmonella* y la secuencia repetida cruza con *Shigella* como se ha observado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.6 Determinación de sensibilidad de la técnica de PCR múltiple con DNA puro

En el trabajo la sensibilidad para la amplificación múltiple fue de una concentración de 7.5 fg de DNA/ $\mu$ l, corresponde aproximadamente a tener 5 UFC. En las Figuras 13 y 14 se ilustran las diluciones realizadas en el presente trabajo, cada una de las diluciones se realizó por duplicado.

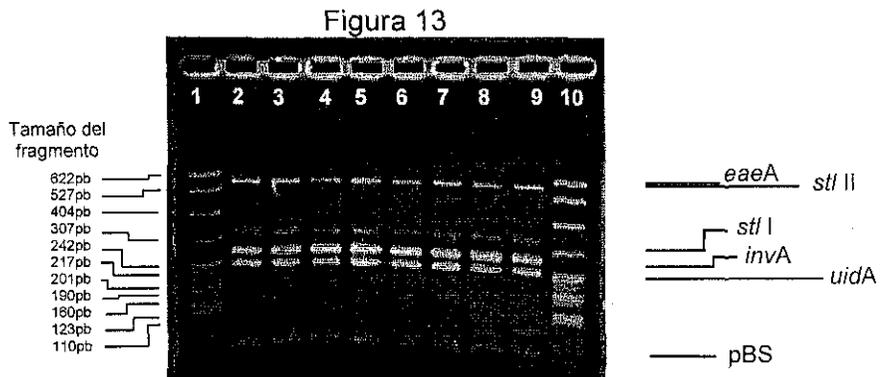


Figura 13. Determinación de sensibilidad de PCR múltiple para *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* con diferentes concentraciones de DNA/ $\mu$ l. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu$ g/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En los carriles 1 y 10 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la amplificación múltiple con 15 ng de DNA/ $\mu$ l, carriles 4 y 5 se observa la amplificación múltiple con 0.15 ng de DNA/ $\mu$ l, carriles 6 y 7 se observa la amplificación múltiple con 1.5 pg de DNA/ $\mu$ l, carriles 8 y 9 se observa la amplificación múltiple con 0.15 pg de DNA/ $\mu$ l.

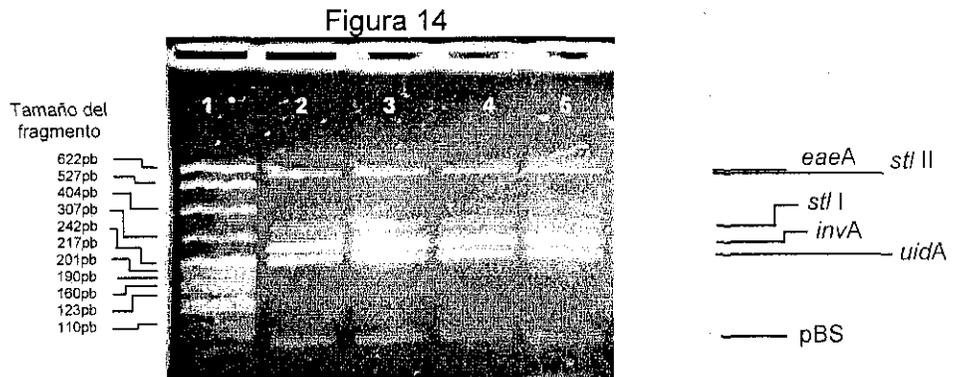


Figura 14. Determinación de sensibilidad de PCR múltiple para *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* con diferentes concentraciones de DNA/ $\mu$ l. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu$ g/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 se encuentra el marcador de tamaño de fragmento correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la amplificación múltiple con 0.015 pg de DNA/ $\mu$ l, carriles 4 y 5 se observa la amplificación múltiple con 7.5 fg de DNA/ $\mu$ l.

Meng *et al.* (1997); Venkateswaran *et al.* (1997); Fratamico *et al.* (1995) y Cebula *et al.* (1995) no reportan sensibilidad para sus trabajos con *Escherichia coli* O157:H7, pero por su parte Uyttendaele, *et al.* (1999) informan que en su trabajo encontraron una sensibilidad para la misma bacteria de 1pg de DNA/ $\mu$ l ó 10<sup>3</sup> UFC por reacción de PCR. Para el gen de invasión en *Salmonella*, Rahn *et al.* (1992) reportan una sensibilidad de 27 pg de DNA/ $\mu$ l.

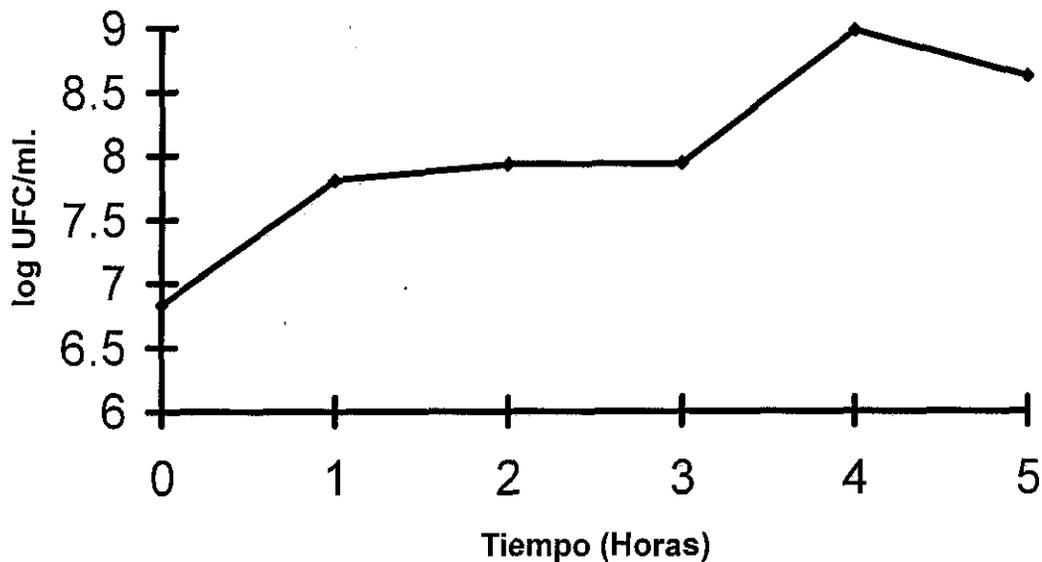
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Por lo observado en la Figura 7 se pudo determinar la concentración óptima del bacteriófago M13 (cuando de amplifica solo) siendo de 0.04882 pg/ $\mu$ l (carril 8), para ser utilizada en el PCR. En la Figura 8 (carril 9) se observa una amplificación del plásmido Bluescript con 0.0244pg de DNA/ $\mu$ l. En base a la sensibilidad del plásmido Bluescript se decidió a trabajar con él.

#### 4.7 Determinación del inóculo de *Salmonella sp* a utilizar para contaminación de la carne

Se determinó que en el tiempo cero ya se contaban con  $10^5$  UFC/ml, por ello con el crecimiento del tiempo cero se realizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  para contaminación de la carne. En el Gráfico 1 se observa la cinética de crecimiento de *Salmonella spp*.

Gráfico 1  
Crecimiento de *Salmonella sp* en Caldo LB



#### 4.8 Determinación del inóculo de *Escherichia coli* O157:H7 a utilizar para contaminación de la carne

El crecimiento de esta bacteria era discontinuo, subía y bajaba medición tras medición, nunca se obtuvo una línea continua de crecimiento como se produce en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano de la mayoría de las bacterias. El crecimiento con esta bacteria se repitió 5 veces más, pero el resultado era el mismo. En la Grafica 2 se muestra los resultados obtenido

con el crecimiento discontinuo de *Escherichia coli* O157:H7. Los errores humanos se minimizaron pero el resultado persistía, había discontinuidad del crecimiento.

Gráfico 2  
Crecimiento de *E. coli* O157:H7 en Caldo LB

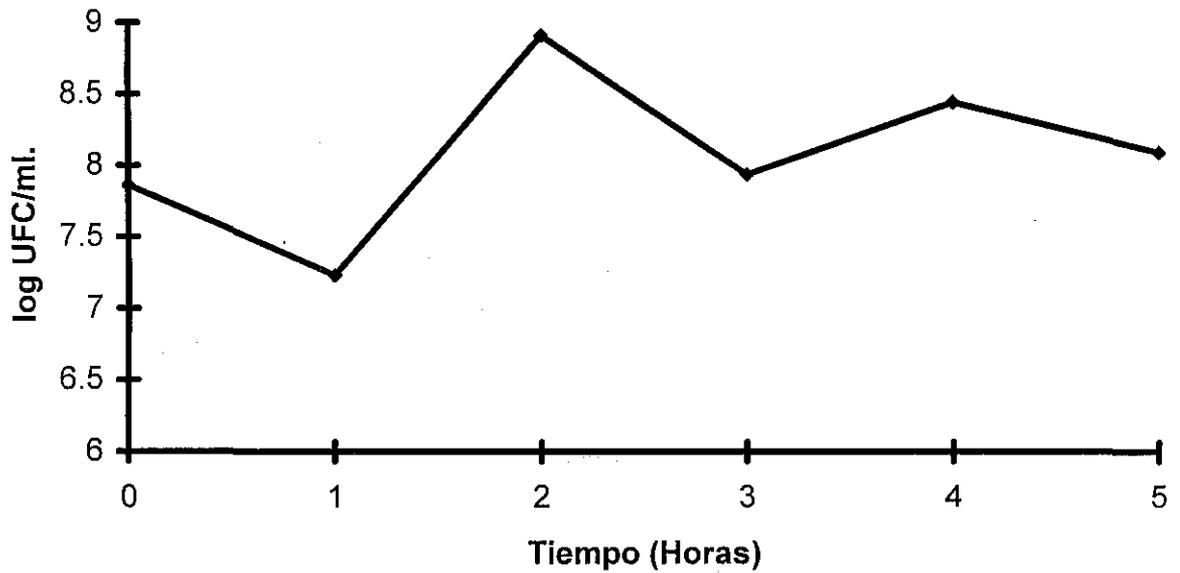
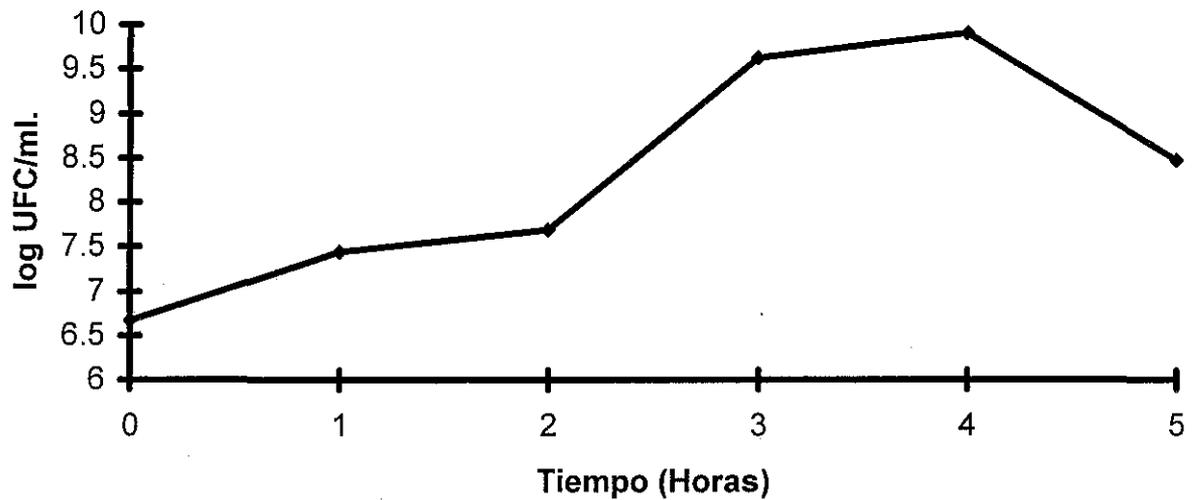


Gráfico 3  
Crecimiento de *E. coli* O157:H7 en Caldo LB con Metionina



Este fenómeno inesperado del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 también fue observado por Cornu *et al* (1999) por el monitoreo de los cambios en la absorbancia; el crecimiento no parecía ser exponencial, en el cual teóricamente supone ser constante de acuerdo a la hipótesis de la fase exponencial. En el estudio que llevaron a cabo Cornu *et al.* (1999) utilizaron un medio sintético mínimo, el cual contenía como fuente de carbono y energía glucosa, además de otros minerales. Con este antecedente, al caldo LB se le adicionó metionina y se encontraron resultados similares a los que Cornu *et al.* (1999). Este medio fue complementado con metionina, y se observó mayor velocidad de crecimiento en el medio mínimo cercano al crecimiento exponencial esperando. En la Gráfica 3, se observa la suplementación de metionina al caldo LB. Esto puede ser debido a que la bacteria es incapaz de sintetizar metionina o que sintetiza una cantidad tan pequeña que es necesario que utilice una fuente externa para suplementar esta deficiencia. En este estudio, el crecimiento logarítmico se acercó a una línea recta y el tiempo de duplicación fue de 48 minutos. Este tiempo de duplicación también llamó la atención ya que en *E. coli* el mínimo tiempo de duplicación es de alrededor de 20 minutos<sup>12, 42</sup> a 37°C. A pesar de esto, se determinó que también al tiempo cero se tenía alrededor de  $10^5$  UFC/ml (como en el caso de *Salmonella*), con lo cual se realizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  para contaminación de la carne.

#### **4.9 Determinación de la eficiencia de la técnica de PCR con carne**

En el Cuadro 1 se muestran el número de bacterias inoculadas en la contaminación experimental de la carne y cuantas se recuperaban en caldo LB.

Cuadro 1

## Resultado de la contaminación experimental de carne de res

Carne / Bacteria	Dilución	Cuenta bacteriana	
		Inoculación (UFC <sup>1</sup> /100µl)	Recuperación (UFC <sup>1</sup> /hisopo)
Carne contaminada con <i>Salmonella</i>	10 <sup>-1</sup>	6 x 10 <sup>5</sup>	210
	10 <sup>-1</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>	206
	10 <sup>-3</sup>	6,550	40
	10 <sup>-3</sup>	5,150	37
	10 <sup>-5</sup>	65.5	3
	10 <sup>-5</sup>	51.5	1
Carne contaminada con <i>Escherichia coli</i> O157:H7	10 <sup>-1</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	214
	10 <sup>-1</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	202
	10 <sup>-3</sup>	3,880	68
	10 <sup>-3</sup>	3,720	63
	10 <sup>-5</sup>	38.8	30
	10 <sup>-5</sup>	37.2	26
Carne contaminada con <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i>	10 <sup>-1</sup>	6 x 10 <sup>5</sup>	228
	10 <sup>-1</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	196
	10 <sup>-3</sup>	6,370	72
	10 <sup>-3</sup>	4,860	65
	10 <sup>-5</sup>	63.7	34
	10 <sup>-5</sup>	48.6	22
Carne sin lavar			100
Carne lavada			19

Como se observa en el Cuadro 1, es elevado el número de bacterias con las que se contaminaron las carnes y es muy pequeña la cantidad de bacterias recuperadas, esto pudo

<sup>1</sup> UFC: Unidades formadoras de colonia.

ocurrir por la adhesión de la bacteria a la célula (en este caso a las células de la carne) ó a la absorción de estas bacterias en la carne.

Se han realizado estudios de PCR con diluciones bacterianas para contaminar carne, por ejemplo, Bhaduri *et al* (1998), Gannon *et al* (1992) y Venkateswaran *et al* (1997) realizaron contaminación de carne con *E. coli* para detectarla por la técnica de PCR, pero la carne la colocaban en caldo estéril (caldo soya tripticasa), después colocaban la bacteria y se incubaba con agitación. Además Venkateswaran *et al* (1997) realizaron una técnica de filtración para detectar *E. coli* O157:H7 en carne de res por PCR para evitar que los constituyentes y la complejidad de la composición de los alimentos interfirieran en la reacción, pero en estos estudios no se establece el número de bacterias que se recuperan y tampoco se determinó la eficiencia de la técnica de PCR con carne

#### Realización de la técnica de PCR múltiple con el DNA de la muestra obtenida de la carne contaminada *in vitro*

Después de la minipreparación de DNA, se realizó la técnica de PCR múltiple y se encontró amplificación de las cuatro bandas (*slt I*, *slt II*, *eaeA* y *uidA*) en todas las muestras ( $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ ) que se habían contaminado solo con *Escherichia coli* O157:H7 (Figura 15). En todas las muestras que se habían contaminado con *Salmonella* se observa la banda amplificada correspondiente al gen de invasión A (Figura 16). Con respecto a la combinación de ambas bacterias se encontró amplificación positiva a las 5 bandas (Figura 17). No se observó ninguna banda amplificada en la carne que no fue contaminada (carne lavada y carne sin lavar) (Figura 18). El control positivo de la reacción de PCR también se llevó a cabo, esto es realizar amplificación de las bandas de las bacterias como amplificación múltiple incluyendo DNA de plásmido (pBS); en este control (+) las 6 bandas son observadas, además del control negativo en donde solo se incluye plásmido (Figura 19).

Figura 15

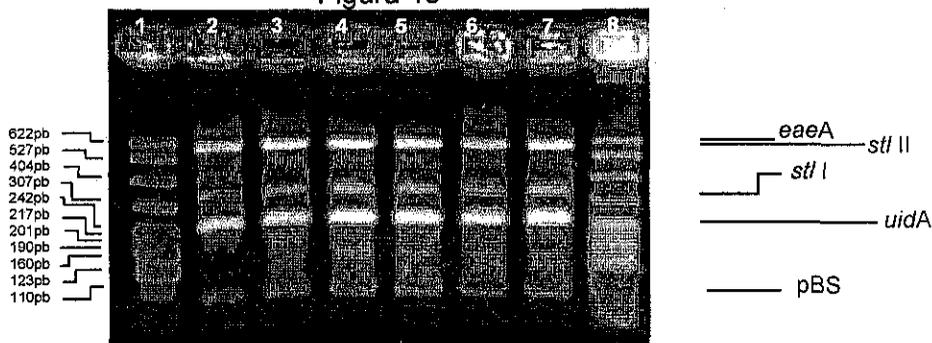


Figura 15. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR múltiple de *Escherichia coli* O157:H7 y pBS de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En los carriles 1 y 8 se encuentra el marcador de peso molecular correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-1</sup> UFC/ml, carriles 4 y 5 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-3</sup> UFC/µl, carriles 6 y 7 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-5</sup> UFC/ml.

Figura 16

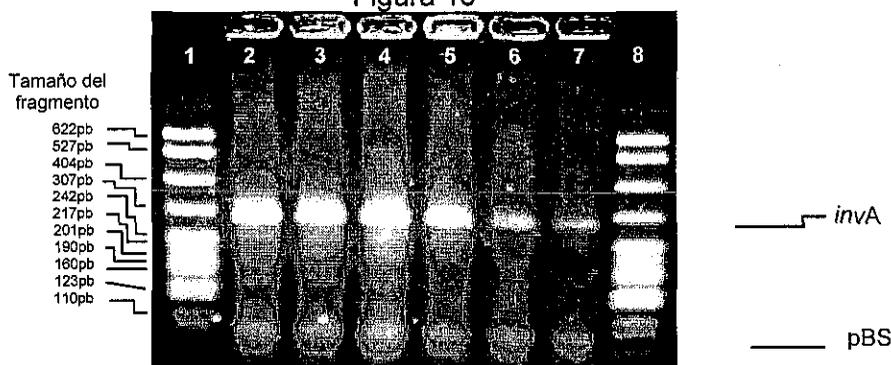


Figura 16. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR múltiple de *Salmonella* sp. y pBS de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En los carriles 1 y 8 se encuentra el marcador de peso molecular correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-1</sup> UFC/ml, carriles 4 y 5 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-3</sup> UFC/µl, carriles 6 y 7 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-5</sup> UFC/ml.

Figura 17

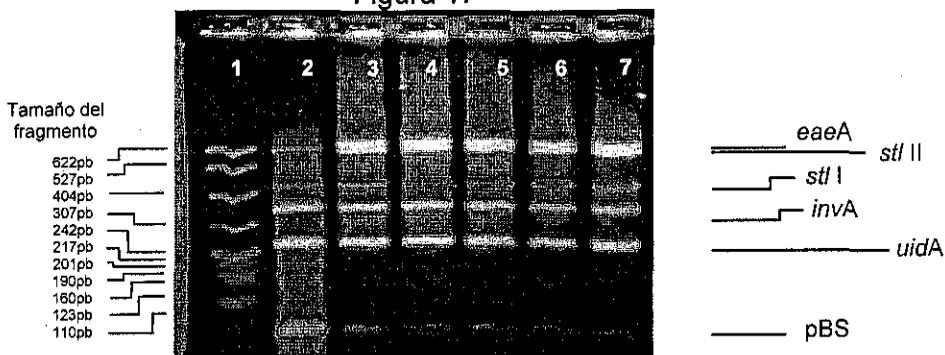


Figura 17. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR múltiple de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp. y pBS de diferentes contaminaciones experimentales de carne de res. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-1</sup> UFC/ml, carriles 4 y 5 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-3</sup> UFC/µl, carriles 6 y 7 se observa la amplificación múltiple con 10<sup>-5</sup> UFC/ml.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 18

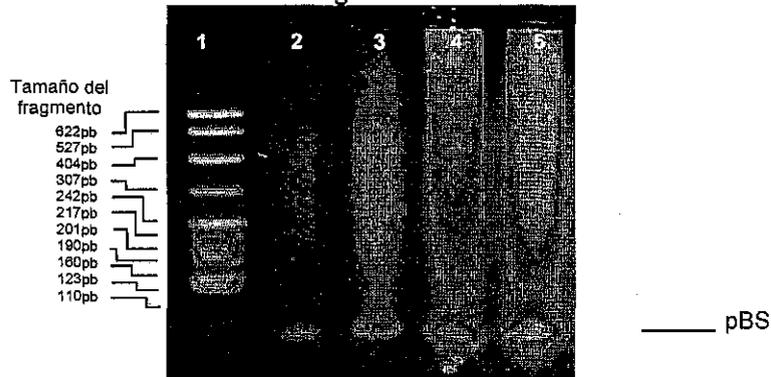


Figura 18. Corrimiento electroforético del producto de PCR de la carne de res no contaminada (lavada y sin lavar). Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa solo la amplificación del control positivo (pBS), carriles 4 y 5 se observa solo la amplificación del control positivo (pBS), como se muestra no hay ninguna otra banda amplificada.

Figura 19

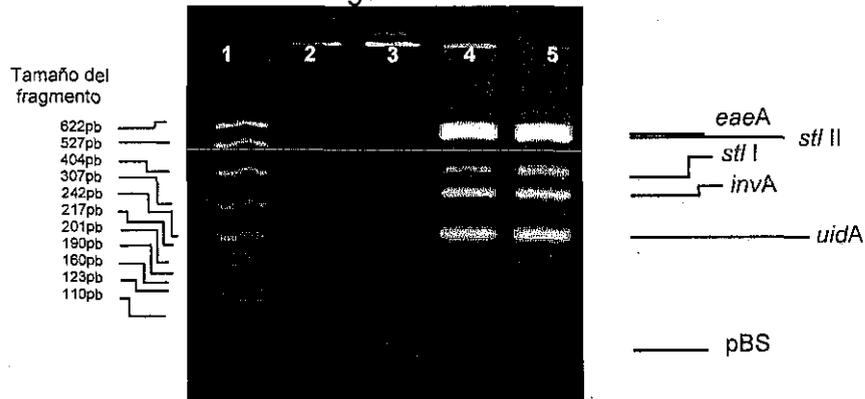


Figura 19. Corrimiento electroforético del producto de PCR del control positivo de la contaminación de carne de res. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular correspondiente a pBR322/Msp1. En los carriles 2 y 3 se observa solo la amplificación del control positivo (pBS), carriles 4 y 5 se observa el producto de PCR múltiple como control positivo (pBS).

#### 4.10 Muestreo de las canales

##### Elaboración, distribución y esterilización de medios necesarios para realización de métodos microbiológicos oficiales

La elaboración, distribución y esterilización de los medios necesarios para la realización de métodos microbiológicos oficiales, en tiempo representa aproximadamente 3 días. Posterior a su utilización la inactivación y lavado del material en tiempo representa aproximadamente de 1 a 2 días.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4.11 Técnicas microbiológicas convencionales oficiales**

##### **4.11.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella***

###### Muestras del rastro municipal

Se realizó un primer muestreo tomando 60 muestras del rastro municipal y se encontró que los resultados por ambas técnicas no coincidían (cada una de ellas tenía resultados positivos a *Salmonella* pero con diferentes muestras), pensando que era un problema en el manejo de las muestras se realizó un segundo muestreo con otras 60 muestras del mismo rastro y se encontró una muestra positiva a *Salmonella* con ambos procedimientos de identificación con el mismo número de muestra.

Después de haber procesado las 120 muestras se obtuvieron 3 muestras positivas a *Salmonella sp* que equivale al 2.5 % de presencia de esta bacteria en la muestra.

###### Muestras del rastro TIF

Después de haber procesado las 60 muestras no se tuvieron muestras positivas a *Salmonella sp*

##### **4.11.2 Aislamiento e identificación de *E. coli* O157:H7**

###### Muestras del rastro municipal

La muestra obtenida se sembraba en caldo EEB para *Escherichia coli* O157:H7 y se procedía según la metodología. Después de haber procesado las 120 muestras ninguna de las muestras fue positiva a *Escherichia coli* O157:H7.

La tabla de resultados, donde se manifestaron las muestras procesadas por los métodos microbiológicos oficiales convencionales y la técnica de PCR se encuentra en el anexo 1.

###### Muestras del rastro TIF

Después de haber procesado las 60 muestras ninguna de las muestras fue positiva a *Escherichia coli* O157:H7.

## 4.12 Realización de PCR múltiple con las muestras obtenidas

### 4.12.1 Muestras del rastro municipal

Después de la minipreparación de DNA de las 120 muestras del rastro municipal, se verificó la existencia e integridad de DNA en geles de agarosa al 1% (Figura 20). Todas las muestras fueron cuantificadas y estandarizadas a 25 ng/μl. En las muestras 22, 26 y 27 se observa que el efecto de concentración, existe una gran cantidad de DNA en la muestras, en las muestras 26 y 27 el DNA no es totalmente integro.

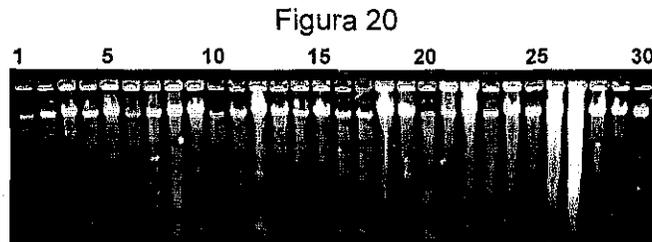


Figura 20. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 0.5μg/ml. Del carril 1 al 30 alícuotas de las muestras sometidas a extracción de DNA de muestras de Rastro municipal (Tlalnepantla) observándose una banda de alto peso molecular, nítida, única. Los números en los carriles muestran el número de muestra asignado.

Consecutivamente se realizó la técnica de PCR para las muestras del rastro municipal y los resultados positivos del primer muestreo se presentan en la Tabla 10 y del segundo muestreo solo se muestran las imágenes (de las Figuras 21 a 27). Aquellas muestras que fueron negativas no son presentadas.

Tabla 10

Resultados de la amplificación por PCR de las muestras del rastro municipal			
Número de muestra	Gen amplificado	Figura en la que aparece la amplificación	Bacteria presumible
6	plásmido	Figura 21	-
7	plásmido	Figura 21	-
8	<i>slt I</i> , plásmido	Figura 21	<i>E. coli</i>
9	<i>eaeA</i> , <i>slt I</i> y plásmido	Figura 21	<i>E. coli</i>
10	<i>eaeA</i> , plásmido	Figura 21	<i>E. coli</i>
11	plásmido	Figura 22	-

12	plásmido	Figura 22	-
13	<i>invA</i> , plásmido	Figura 22	<i>Salmonella</i>
14	plásmido	Figura 22	-
15	<i>eaeA</i> , plásmido	Figura 22	<i>E. coli</i>
16	plásmido	Figura 23	-
17	plásmido	Figura 23	-
18	<i>eaeA</i> , plásmido	Figura 23	<i>E. coli</i>
19	plásmido	Figura 23	-
20	plásmido	Figura 23	-
26	<i>eaeA</i> , <i>slt I</i> y plásmido	Figura 24	<i>E. coli</i>
27	<i>slt I</i> , plásmido	Figura 24	<i>E. coli</i>
28	plásmido	Figura 24	-
29	<i>slt I</i> , plásmido	Figura 24	<i>E. coli</i>
30	plásmido	Figura 24	-
46	plásmido	Figura 25	-
47	plásmido	Figura 25	-
48	<i>slt I</i> , plásmido	Figura 25	<i>E. coli</i>
49	<i>slt I</i> plásmido	Figura 25	<i>E. coli</i>
50	<i>slt I</i> y plásmido	Figura 25	<i>E. coli</i>
51	<i>slt II</i> , <i>slt I</i> y plásmido	Figura 26	<i>E. coli</i>
52	plásmido	Figura 26	-
53	plásmido	Figura 26	-
54	plásmido	Figura 26	-
55	<i>slt I</i> , plásmido	Figura 26	<i>E. coli</i>
56	plásmido	Figura 27	-
57	plásmido	Figura 27	-
58	plásmido	Figura 27	-
59	plásmido	Figura 27	-
60	<i>eaeA</i> , <i>slt I</i> y plásmido	Figura 27	<i>E. coli</i>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Todas las muestras (120) se corrieron por duplicado, de las cuales solo 3 muestra resultaron positivas a *Salmonella* (2.5%), ninguna fue positiva a *Escherichia coli* O157:H7 en las muestras obtenidas del rastro municipal de Tlalnepantla.

Figura 21

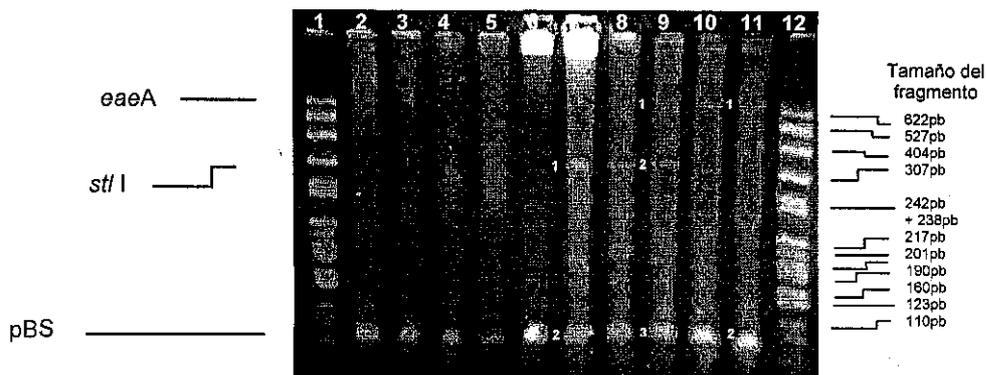


Figura 21. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. En los carriles 1 y 12 se observan los tamaños de fragmentos del pBR322/Msp1, en los carriles 2 y 3 (muestra 6) se observa amplificación de pBS (control +); en los carriles 4 y 5 (muestra 7) se observa amplificación de pBS (control +); en el carril 6 (muestra 8) se observa amplificación de pBS (control +) y en el carril 7 (muestra 8) número 1: *stt I* y la número 2: pBS; carriles 8 y 9 (muestra 9) se observa amplificación (en orden progresivo) *eaeA*, *stt I* y pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 10) *eaeA* y pBS (control +) de la reacción.

Figura 22

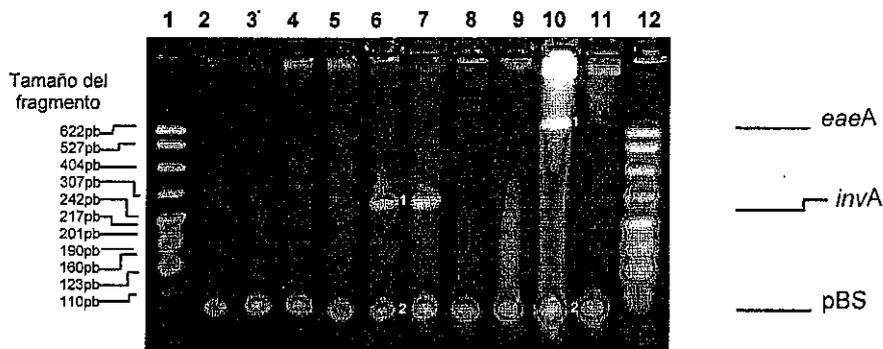


Figura 22. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/Msp1, carriles 2 y 3 (muestra 11) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 12) amplificación de pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 13) se observan 2 bandas amplificadas *invA* y pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 14) se observa amplificación de pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 15) se observan 2 bandas, la número 1 corresponde al gen *eaeA* y la número 2 es la amplificación de pBS (control +) de la reacción.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 23

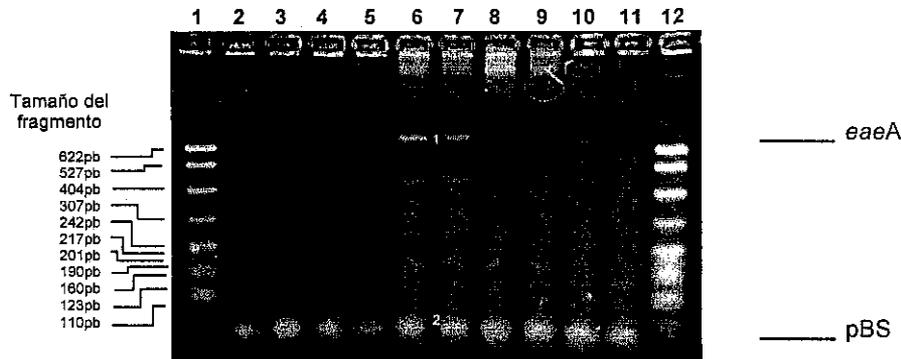


Figura 23. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/Msp1, carriles 2 y 3 (muestra 16) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 17) amplificación de pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 18) se observan 2 bandas la primera *eaeA*, y amplificación de pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 19) amplificación del pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 20) se observa la banda amplificada de pBS (control +) de la reacción.

Figura 24

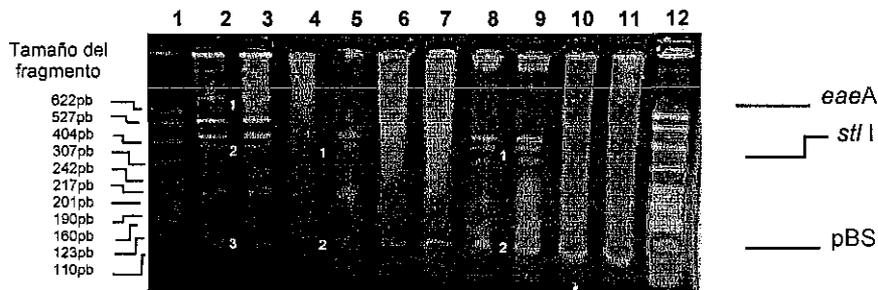


Figura 24. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/Msp1, carriles 2 y 3 (muestra 26) con 3 bandas, gen *eaeA*, la segunda *stt I*, y la última pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 27) con 2 bandas, la *stt I*, la segunda pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 28) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 29) se observan 2 bandas, las cuales corresponde a *stt I* y amplificación de pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 30) se observa amplificación de pBS (control +) de la reacción.

Figura 25

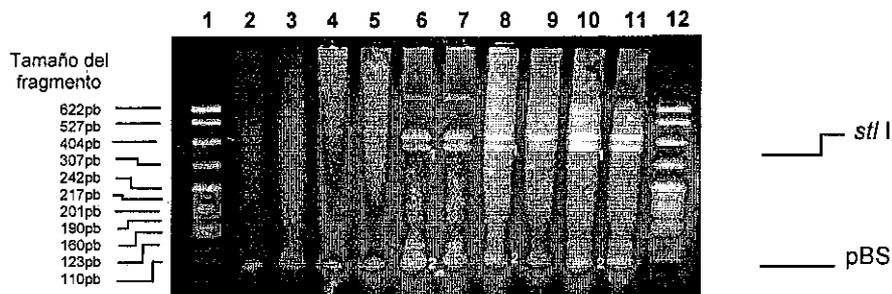


Figura 25. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/Msp1, carriles 2 y 3 (muestra 46) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 47) amplificación de pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 48) se observan 2 bandas amplificadas: *stt I* y pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 49) *stt I* y pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 50) se observa *stt I* y la pBS (control +) de la reacción.

Figura 26

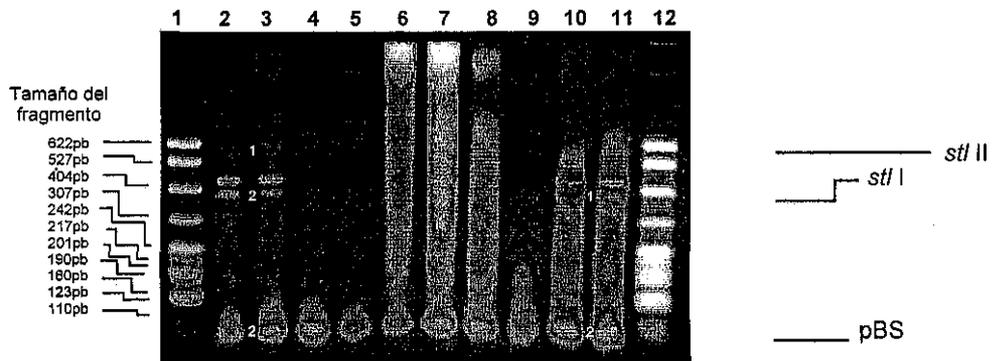


Figura 26. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/MSP1, carriles 2 y 3 (muestra 51) la primera banda corresponde a la amplificación del gen *stf II*, la segunda *stf I* y la tercera pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 52) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 53) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 54) se observa amplificación de pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 55) se observan 2 bandas, la número 1 es correspondiente a *stf I* y la número 2 es la amplificación de pBS (control +) de la reacción.

Figura 27

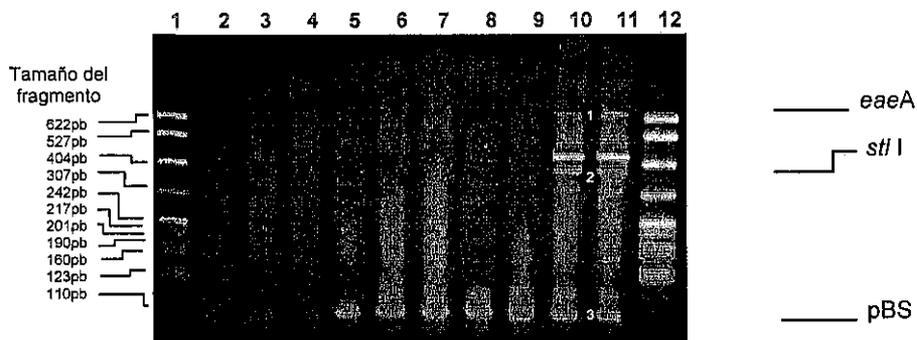


Figura 27. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro municipal (Tlalnepantla) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5µg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carriles 1 y 12 pBR322/MSP1, carriles 2 y 3 (muestra 56) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 4 y 5 (muestra 57) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 6 y 7 (muestra 58) se observa amplificación de pBS (control +); carriles 8 y 9 (muestra 59) se observa amplificación de pBS (control +) y carriles 10 y 11 (muestra 60) se observan 4 bandas, la número 1 corresponde al gen *eaeA*, la número 2 corresponde a *stf I* y la número 3 es la amplificación de pBS (control +) de la reacción.

Estos resultados obtenidos son significativos de la etapa post-lavado final, pero con el método empleado en el rastro municipal para lavar las canales (con un pedazo de costal y una cubeta con agua) hay posibilidades de redistribuir la carga bacteriana entre las canales con el consiguiente posible aumento de riesgo en la contaminación de la carne como consecuencia de la presencia de microorganismos patógenos o de la existencia de microorganismos capaces de alterar el alimento.

Una ventaja que ofrece la técnica de PCR sobre los métodos microbiológicos es la identificación de características genéticas muy específicas, por ejemplo la amplificación del gen *eaeA* por medio de la técnica de PCR, permite identificar cepas patógenas que se adhieren a la célula intestinal y pueden causar daño potencial al consumidor. En aquellas muestras que se detectaron genes productores de toxinas, se puede recomendar tratamiento de la carne (buen cocimiento) para evitar posibles intoxicaciones en el consumidor. Sirugusa, *et al* en 1999, menciona en su trabajo que la remoción de las bacterias se adhieren a la superficie de la carne ó la descontaminación de la canal está influenciada por la cantidad de tejido adiposo que tenga. Thayer y Boyd (1993) mencionan en su estudio la utilización de radiación gamma para eliminar *E. coli* O157:H7 de carnes.

Debido a la versatilidad de la técnica de PCR, en el trabajo se permitió identificar también genes productores de toxina, identificandose 13 muestras que contenían el gen *slt I* y 2 muestras que contenían *slt II*. Las cepas EHEC pueden expresar SLT I, SLT II ó ambas, y se ha comprobado que la SLT I de EHEC es idéntica a la "Shiga toxin" producida por *S. dysenteriae* I<sup>33</sup>, en las muestras en donde se encontró SLT I podrían ser por la presencia de EHEC ó *S. dysenteriae*. La SLT II también es producida por *Citrobacter freundii* y *Enterobacter* spp.<sup>33</sup> y no es difícil que las canales se encontraran contaminadas con estos dos géneros bacterianos aunque se recomendaría confirmar por cultivo.

El trabajo con alimentos perecederos como la carne, exige que sea tratada cumpliendo el máximo grado en higiene y seguridad, ya que la carga bacteriana de posibles contaminaciones podría poner en riesgo potencial a los consumidores que ingieran la carne con agentes patógenos. Aunado a esto, el trabajo en los rastros presenta una gran cantidad de problemas, desde el embarco de los animales que llegarán al matadero para ser sacrificados hasta su comercialización. En todos los pasos que esto conlleva están presentes bacterias patógenas que pueden ser detectadas rápidamente mediante la técnica de PCR como herramienta diagnóstica, siendo sugerida por Radu, *et al.* (1999), Sirugusa, *et al.* (1999), Uyttendaele, *et al.* (1999), Ganon, *et al.* (1992), Ventateswaran, *et al.* (1997) y Wernars, *et al.* (1991), entre otros.

A pesar que la genética está muy avanzada en nuestros días al igual que la secuenciación del DNA de los organismos (tanto macro como micro), aun no se conoce todas las secuencias de todos los microorganismos, con lo cual sería factible que alguno de los iniciadores encontrara una región blanco en un DNA "x" (aun no estudiado) y produjera amplificaciones inespecíficas. Además de que las bacterias con las que se trabaja en el presente estudio son habitantes habituales del lumen intestinal y muchos de los microorganismos que conviven con ellas contienen características de virulencia y/o patogenicidad en plásmidos que pueden ser transmitidos entre bacterias.

*Salmonella* representa riesgo para la salud humana y en las muestras procesadas se encontraron 3 muestras positivas por la método microbiológico convencional oficial y 2 por la técnica de PCR (para las 120 muestras), estos resultados no coincidentes pueden deberse al nivel de sensibilidad de que presentan los procedimientos empleados. El método microbiológico convencional oficial detecta desde 1 UFC y la técnica de PCR detecta a partir de 5 UFC. Hay que recalcar que aunque se encuentren *Salmonella* muertas es suficiente para decir que hay presencia. En este respecto, Johnson *et al.* (1998) reportaron la presencia de 0.9 a 4.3 UFC de *E. coli* O157:H7 por gramo en lotes de carne que habían sido implicados en un brote de síndrome urémico hemolítico en humanos en 1993. Por la complejidad en la composición de los alimentos, se sugiere un corto preenriquecimiento previa realización de la técnica de PCR para detección óptima microorganismos, en los trabajos llevado a cabo por Bhaduri *et al* (1998), Venkateswaran *et al* (1997) y Uyttendaele *et al* (1998) realizaron preenriquecimientos previos para la detección de bacterias patógenas en alimentos por PCR, estos preenriquecimientos los efectuaron para aumentar el número de células sujetas a estrés, detectar células en el límite de detección y eliminar componentes que pueden interferir con la reacción de PCR. Aunque este preenriquecimiento, podría ser contraproducente ya que no solo crece el microorganismo del estudio sino también toda la flora de acompañamiento ó competitiva, disminuye la concentración de las bacterias en estudio y eso pudo ocurrir con las muestras no coincidentes del presente estudio. En su estudio, Chang *et al* en 1999, realizó un estudio utilizando caldo enriquecido sulfa verde brillante selenito para recuperar *Salmonella*, en el cual concluyen que el enriquecimiento es un paso crítico para promover el crecimiento de ciertas especies bacterianas mientras que inhibe el desarrollo de microorganismos no buscados. D'aoust *et al* en 1982, trabajaron en la detección de *Salmonella* en canales de pollo crudo y reportaron que el enriquecimiento selectivo en caldo y agar verde brillante tetrionato y agar sulfito bismuto

identificó un gran número de canales contaminadas. Para evitar el crecimiento de todos los otros géneros bacterianos que se encuentran en las muestras se podrían utilizar medios líquidos selectivos, por ejemplo para *E. coli* O157:H7 caldo soya tripticasa modificado con antibióticos y para *Salmonella* se puede utilizar caldo tetrionato, caldo selenite ó caldo sulfa verde brillante selenito.

#### 4.12.2 Muestras del rastro TIF

Después de la minipreparación de DNA de las 60 muestras del rastro tipo inspección federal, se verificó la existencia e integridad de DNA en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras fueron cuantificadas y estandarizadas a 25 ng/μl.

Consecutivamente se realizó la técnica de PCR para las muestras del rastro tipo inspección federal, de la muestra número 1 a la muestra número 13 y de la muestra 15 a la muestra número 60 fueron negativas. En la muestra número 14 se encontró la amplificación del gen *eaeA* y el plásmido y el resultado se muestra en la Figura 28.

Figura 28

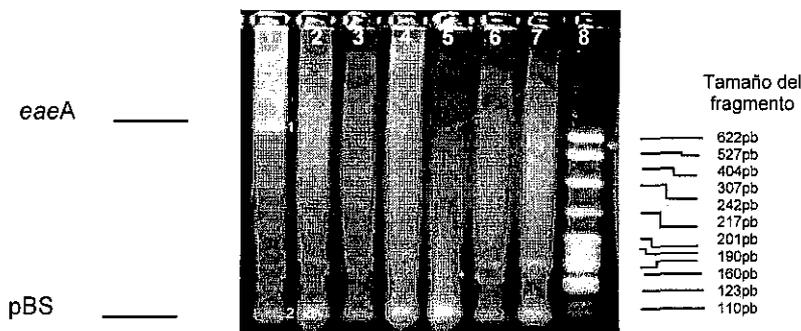


Figura 28. Corrimiento electroforético de productos amplificados por PCR de muestras de rastro Tipo Inspección Federal (UGASA) en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 0.5μg/ml. PCR con 2 mM de Mg<sup>++</sup>. Carril 8 pBR322/MSp1, carril 1 (muestra 14) se observan 2 bandas: *eaeA*, y pBS (control +); carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (muestras 15, 16, 17, 18, 19 y 20) se observa amplificación de pBS (control +) de la reacción.

Al comparar las muestras obtenidas de ambos rastros podemos observar que las obtenidas del rastro municipal se encuentran contaminados con más cantidad de bacterias (al tomar en cuenta la amplificación de más bandas) en comparación con el rastro TIF. Esto se explica por el manejo que se les da a los animales a lo largo del sacrificio, en el rastro TIF se cuidan al máximo todas las condiciones sanitarias y técnicas para que el consumidor obtenga

canales y carne de optima calidad. El lavado final que se les da a las canales en este tipo de rastro es con agua a presión con 4 – 5 ppm de cloro residual, las canales se enmantan y se colocan en refrigeración durante 12 horas y posteriormente salen a mercado. La presencia de bacterias de la Familia Enterobacteriaceae indica pocas condiciones higiénicas de trabajo y posibles contaminaciones con heces, como lo mencionan Pérez *et al* (1999) en un estudio realizado en la carne de la Ciudad de México.

La técnica de PCR es una herramienta muy útil dentro de la investigación, pero hay muchos factores que pueden afectar la reacción, por ejemplo la distribución al azar de las células que pueden estar cerca de los límites de detección, en otras palabras que una célula o una molécula de DNA puede no encontrarse en número suficiente para ser detectada y obtener un resultado falso negativo; que la lisis celular no se realice, que se degrade el DNA<sup>47</sup> o este sea capturado por alguna molécula presente, que se encuentren presentes enzimas proteolíticas o desnaturalizantes que destruyan ó inhiban la actividad de la enzima Taq polimerasa, etc<sup>39, 47</sup>.

#### **4.13 Determinación del tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales**

Con las pruebas microbiológicas oficiales se requieren 5 días para identificación de *Salmonella* y 5 días para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7. Esta identificación puede hacerse simultáneamente.

En la técnica de PCR se requiere de máximo 2.5 días (junto con el preenriquecimiento previo).

Con respecto a este punto, Mandrell *et al* en 1999, determinaron el tiempo máximo para la identificación bacteriana de *Salmonella* sp y *Campilobacter* sp en canales de pollo, comparando los métodos microbiológicos convencionales y la técnica de PCR, obteniendo como máximo 4 días (96 horas) y 24 horas respectivamente.

Lo que se obtuvo con la determinación del tiempo máximo para la identificación bacteriana es que se pudo ganar tiempo en el diagnóstico utilizando la técnica de PCR en productos perecederos, pero uno de los más grandes inconvenientes es que con la técnica de PCR no solo detecta bacterias vivas, sino además también puede detectarse bacterias muertas. En contraposición con esta última parte, los métodos microbiológicos oficiales detectan solo bacterias vivas que si pueden ser nocivas al consumidor, ya que estas pueden replicarse en el

producto alimenticio y producir toxii infecciones en los consumidores. Se puede mencionar que el mejor sistema para identificación microbiológica es el método microbiológico convencional oficial.

#### **4.14 Comparación los niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y los métodos microbiológicos oficiales**

En las pruebas microbiológicas oficiales se detecta desde una célula viable ya que los medios de cultivo y la técnica como tal, están especificadas para que se multiplique y detecte el género bacteriano que se desea diagnosticar. En el caso de la técnica de PCR se tuvo una sensibilidad de 7.5 fg DNA/ $\mu$ l (5 UFC aproximadamente). Mandrell *et al* en 1999, detectaron *Salmonella* sp y *Campilobacter* sp en canales de pollo, en el estudio determinaron la sensibilidad (UFC/ml) de los métodos microbiológicos convencionales y la técnica de PCR, los resultados que obtenidos fueron: menos de 10 UFC/ml y 50 UFC/ml respectivamente. Con lo cual se ratifica que son más sensibles las técnicas microbiológicas oficiales que la técnica de PCR.

## 5. CONCLUSIONES

- ☞ La reacción de PCR múltiple es muy específica y no cruza con los géneros bacterianos cercanos probados.
- ☞ La sensibilidad para amplificación por PCR múltiple se detecta hasta una concentración de 7.5 fg de DNA/μl que corresponde aproximadamente a tener 5 UFC.
- ☞ No hubo interferencia de los elementos de la carne en la reacción de PCR múltiple.
- ☞ De las 120 muestras del rastro municipal se obtuvieron 3 positivas (2.5%) por métodos microbiológicos convencionales oficiales y 2 positivas (1.6%) por la técnica de PCR a *Salmonella spp.* Por ambas pruebas no se encontraron muestras positivas a *E. coli* O157:H7.
- ☞ De las 60 muestras de rastro TIF no se encontraron muestras positivas ni a *Salmonella spp* ni a *E. coli* O157:H7
- ☞ De acuerdo con la ICMSF el rastro municipal tiene más del 2% de muestras positivas. Lo que no sucede con el rastro TIF.
- ☞ En este estudio no se encontró la presencia de *Escherichia coli* O157:H7.
- ☞ Por lo encontrado, se puede afirmar que los métodos oficiales convencionales son mejores para la identificación bacteriana.

## 6. RECOMENDACIONES

Se recomienda que para la realización de la técnica de PCR para alimentos, se realice un preenriquecimiento selectivo dependiendo del género bacteriano en estudio

La realización de la técnica de PCR refleja el estado sanitario de los rastros. Debido a que la técnica de PCR detecta tanto células vivas como muertas se recomienda hacer una confirmación con métodos microbiológicos convencionales oficiales.

Se recomienda realizar un estudio más a fondo para la amplificación con en iniciador *invA* en *Salmonella* ya que con una concentración final en la reacción de 1 $\mu$ M se amplifican 2 bandas con DNA puro. Cuando se utiliza esta misma concentración final del iniciador *invA* en la reacción múltiple con DNA puro de *Salmonella*, aparece la banda correspondiente.

## 7. REFERENCIAS.

1. Alonso, M. A.: Comunicación personal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2001
2. Bhaduri, S. and Cottrell, B.: A simple preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: a possible model for other food pathogens. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 79 – 83, 1998.
3. Blair, Y. S. and McDowell, D. A.: Microbiological examination of pre - storage and post - storage intervention beef. *Meat science*. 38: 155 - 161, 1994.
4. Bobenrieth, R.; Beltrán, F. E. y Arenas, A.: Saneamiento de mataderos de bovinos, ovinos y porcinos. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 98 (2): 211 - 227, 1985.
5. Bustamante, S. V. H.: Comunicación personal. Investigador C. Instituto de Biotecnología, UNAM. 2001.
6. Cebula, T. A.; Payne, W. L. and Feng, P.: Simultaneous identification of strains of *E. coli* serotype O157:H7 and their shiga - like toxin type by mismatch amplification mutation assay - multiplex PCR. *J. of Clinical Microbiology*. 31 (1): 248 - 250, 1995.
7. Chang, C.; You, C.; Shen, H.; Li, A.; Chen, C.; Chou, J. and Huang, S.: Recovery of *Salmonella* by using selenite brilliant green sulfa enrichment broth. *J. of Clinical Microbiology*. 37 (12): 4120-4123, 1999.
8. Cloning systems. Maps and Restriction sites. Catalogo Stratagene: 298, 1994.
9. Cornu, M; Delignerre-Muller, M. L. and Flandrois, J.: Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12): 5322 – 5327, 1999.
10. D'aoust, J. Y.; Stotland, P. and Boville, A.: Sampling methods for detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. *J. of Food Science*. 47: 1643, 1644 y 1729; 1982.
11. Darwin, K. H. and Miller, V. L.: Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (3): 405 – 428, 1999.
12. Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N. and Ginsberg, H. S.: Microbiology: including immunology and molecular genetics. 3 edition.
13. Erlich, H. A. (editor): PCR technology, principles and applications for DNA amplification. *Oxford University press*. U. S. A., 1992.
14. Escutia, S. Y.: Análisis de Riesgos e Identificación de Puntos Críticos de Control en el procesamiento de canales de bovino para el abasto en un rastro municipal tipo del Estado de México. Tesis de Maestría. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM*, 1996.
15. Fagan, P. K.; Hornitzky, M. A.; Bettelheim, K. A. and Djordjevic, S. P.: Detection of shiga - like - toxin (stx1 y stx2), intimin (*eaeA*) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (2): 868 - 872, 1999.
16. Feng, P.: Impact of molecular biology on the detection of foodborne pathogens. *Molecular biotechnology*. 7: 267 - 278, 1997.
17. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual 8<sup>th</sup> Edition. AOAC. Washington, D. C. Rev A. 1998.
18. Fratamico, P. M.; Sackitey, S. K.; Wiedmann, M. and Yi Deng, M.: Detection of *E. coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. of Clinical Microbiology*. 33 (8): 2188 - 2191, 1995.
19. Gannon, V. P. J.; King, R. K.; Kim, Y. and Golsteyn Thomas, E. J.: Rapid and sensitive method for detection of shiga - like - toxin - producing *E. coli* in ground beef using the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (12): 3809 - 3815, 1992.
20. Gooding, C.M. and Choudary, P.V.: Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 13: 341 - 347, 1999.
21. Harris, L. J. & Griffiths, M. W.: The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). *Food Research International*. 25: 457 - 469, 1992.

22. Hernández, S. R.; Fernández, C. . y Baptista, L. P.: Metodología de la Investigación. *McGraw Hill, Interamericana de México, S. A. de C. V.*, México D. F., 1991.
23. Huis in 't Veld, J. H. J.; Mulder, R. W. A. W. and Snijders, J. M. A.: Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of meat: monitoring and control. *Meat science*. 36: 123 - 154, 1994.
24. ICMSF: Microorganism in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. *Blackie academic & professional*. Great Britain, 1996.
25. ICMSF: Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. *Acribia*. Zaragoza, España, 1984.
26. Jacob, M.: Manipulación correcta de los alimentos. Guía para gerentes de establecimientos de alimentación. *Organización Mundial de la Salud*. Ginebra, 1990.
27. Jitrapakdee, S.; Tassanakajon, A.; Boonsaeng, V.; Piankijagum, S. and Panyim, S.: A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 9 (6): 375 - 382, 1995.
28. Johnson, J.; Brooke, CH. L. and Fritschel, S. J.: Comparison of the BAX for screening/*E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (11): 4390 - 4395, 1998.
29. Kim, K. Y.; Lillard, H. S.; Frank, J. F. and Craven, S. E.: Attachment of *Salmonella typhimurium* to poultry skin as related to cell viability. *J. of Food Science*. 61 (2): 439 - 441 y 448, 1996.
30. Kim, K. Y.; Lillard, H. S.; Frank, J. F. and Craven, S. E.: Attachment of *Salmonella* on Modified poultry skin surface. *J. of Food Science*. 61 (2): 442 - 443 y 448, 1996.
31. Mandrell, R. E. and Wachtel, M. R.: Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 273 - 278, 1999.
32. Meng, J.; Zhao, S.; Doyle, M. P.; Mitchell, S. E. and Kresovich, S.: A multiplex PCR for identifying shiga-like-toxin producing *E. coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 172 - 176, 1997.
33. Nataro, J. P. and Kaper, J. B.: Diarrheagenic *Escherichai coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1): 142 - 201, 1998.
34. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. 1995.
35. OPS/OMS/SSA: Diagnóstico sobre la situación de la protección de los alimentos en México. *OPS/OMS/SSA*. México, 1993.
36. Pearson, A. M. and Dutson, T. R.: Meat and health. Advances in meat research. Vol. 6. *Elsevier applied science*. London and New York, 1990.
37. Pérez, C. M. L.; Rodríguez, S. G. M.; Lara C. P. and Guerrero, I.: Microbial spoilage of metas offered for retail sale in México City. *Meat Science*. 51: 279 - 282, 1999.
38. Radu, S.; Abdul, M. S.; Rusul, G.; Ahmad, Z.; Morigaki, T.; Asai, N.; Bu, K. Y.; Okuda, J. and Nishibuchi, M.: Detection of *E. coli* O157:H7 in the beef marked in malaysia. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (3): 1153 - 1156, 1998.
39. Rahn, K.; De Grandis, S. A.; Clarke, R. C.; McEwen, S. A.; Galán, J. E.; Ginocchio, C.; Curtiss III, R. and Gyles, C. L.: Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by PCR as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 6: 271 - 279, 1992.
40. SECOFI: Modernización del Sistema de Distribución de Cárnicos. Propuesta para la incorporación de Salas de Deshuese en Plantas de Sacrificio TIF, 1996.
41. Silhavy, T.; Berman, M. and Enquist, J.: Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1984.
42. Singleton, P.: Bacteria in biology, biotechnology and medicine. 5<sup>th</sup> edition. *John Wiley and sons, LTD*. England, 1999.

43. Siragusa, G. R.; Nawotka, K; Spilman, S. D.; Contag, P. R. and Contag, C. H.: Real - time monitoring of *E. coli* O157:H7 adherence of beef carcasse surface tissues with a Bio luminiscent reporter. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (4): 1738 - 1745, 1999.
44. Uyttendaele, M.; van Boxtael, S. and Debevere, J.: PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae* gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat - killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *International J. Food Microbiology*. 52: 85 - 95, 1999.
45. Venkateswaran, K.; Kamijoh, Y; Ohashi, E. and Nakanishi, H.: A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 and its toxin in beef by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (10): 4127 - 4131, 1997.
46. Wernars, K.; Delfgou, E.; Soentoro, P. S. and Notermans, S.: Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *E. coli* in minced meat by using the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (7): 1914 - 1919, 1991.
47. Wilson, I. G.: Minireview. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 43 (10): 3741 - 3751, 1997.

8. ANEXO

RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Esperanza García López.

# Muestra consecutivo	Lugar	Microbiológico		PCR (Gen)	# Muestra
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i>		
1	Rastro Municipal	-	-	P	1
2	Rastro Municipal	-	-	P	2
3	Rastro Municipal	-	-	P	3
4	Rastro Municipal	-	-	P	4
5	Rastro Municipal	-	-	P	5
6	Rastro Municipal	-	+	P	6
7	Rastro Municipal	-	-	P	7
8	Rastro Municipal	-	-	P	8
9	Rastro Municipal	-	-	P	9
10	Rastro Municipal	-	-	P	10
11	Rastro Municipal	-	-	P	11
12	Rastro Municipal	-	-	P	12
13	Rastro Municipal	-	-	P	13
14	Rastro Municipal	-	-	P	14
15	Rastro Municipal	-	-	P	15
16	Rastro Municipal	-	-	P	16
17	Rastro Municipal	-	-	P	17
18	Rastro Municipal	-	-	P	18
19	Rastro Municipal	-	-	P	19
20	Rastro Municipal	-	-	P	20
21	Rastro Municipal	-	-	P	21
22	Rastro Municipal	-	-	P	22
23	Rastro Municipal	-	-	P	23
24	Rastro Municipal	-	-	P	24
25	Rastro Municipal	-	-	P	25
26	Rastro Municipal	-	-	P	26
27	Rastro Municipal	-	-	P	27
28	Rastro Municipal	-	-	P	28
29	Rastro Municipal	-	-	P	29
30	Rastro Municipal	-	-	P	30
31	Rastro Municipal	-	-	P	31
32	Rastro Municipal	-	-	P	32
33	Rastro Municipal	-	-	P	33
34	Rastro Municipal	-	-	P	34
35	Rastro Municipal	-	+	<i>stI</i> , P	35
36	Rastro Municipal	-	-	P	36
37	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA</i> , P	37
38	Rastro Municipal	-	-	P	38
39	Rastro Municipal	-	-	P	39
40	Rastro Municipal	-	-	P	40
41	Rastro Municipal	-	-	P	41
42	Rastro Municipal	-	-	P	42
43	Rastro Municipal	-	-	P	43
44	Rastro Municipal	-	-	P	44
45	Rastro Municipal	-	-	P	45
46	Rastro Municipal	-	-	P	46
47	Rastro Municipal	-	-	P	47
48	Rastro Municipal	-	-	P	48
49	Rastro Municipal	-	-	P	49
50	Rastro Municipal	-	-	P	50
51	Rastro Municipal	-	-	P	51
52	Rastro Municipal	-	-	P	52

53	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	53
54	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	54
55	Rastro Municipal	-	-	<i>slt II, invA, P</i>	55
56	Rastro Municipal	-	-	P	56
57	Rastro Municipal	-	-	P	57
58	Rastro Municipal	-	-	P	58
59	Rastro Municipal	-	-	P	59
60	Rastro Municipal	-	-		60

Segundo muestreo rastro municipal

61	Rastro Municipal	-	-	P	1
62	Rastro Municipal	-	-	P	2
63	Rastro Municipal	-	-	P	3
64	Rastro Municipal	-	-	P	4
65	Rastro Municipal	-	-	P	5
66	Rastro Municipal	-	-	P	6
67	Rastro Municipal	-	-	P	7
68	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I y P</i>	8
69	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA, slt I y P</i>	9
70	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA y P</i>	10
71	Rastro Municipal	-	-	P	11
72	Rastro Municipal	-	-	P	12
73	Rastro Municipal	-	+	<i>invA, P</i>	13
74	Rastro Municipal	-	-	P	14
75	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA, P</i>	15
76	Rastro Municipal	-	-	P	16
77	Rastro Municipal	-	-	P	17
78	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA, P</i>	18
79	Rastro Municipal	-	-	P	19
80	Rastro Municipal	-	-	P	20
81	Rastro Municipal	-	-	P	21
82	Rastro Municipal	-	-	P	22
83	Rastro Municipal	-	-	P	23
84	Rastro Municipal	-	-	P	24
85	Rastro Municipal	-	-	P	25
86	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA, slt I y P</i>	26
87	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	27
88	Rastro Municipal	-	-	P	28
89	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	29
90	Rastro Municipal	-	-	P	30
91	Rastro Municipal	-	-	P	31
92	Rastro Municipal	-	-	P	32
93	Rastro Municipal	-	-	P	33
94	Rastro Municipal	-	-	P	34
95	Rastro Municipal	-	-	P	35
96	Rastro Municipal	-	-	P	36
97	Rastro Municipal	-	-	P	37
98	Rastro Municipal	-	-	P	38
99	Rastro Municipal	-	-	P	39
100	Rastro Municipal	-	-	P	40
101	Rastro Municipal	-	-	P	41
102	Rastro Municipal	-	-	P	42
103	Rastro Municipal	-	-	P	43
104	Rastro Municipal	-	-	P	44
105	Rastro Municipal	-	-	P	45
106	Rastro Municipal	-	-	P	46
107	Rastro Municipal	-	-	P	47
108	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	48
109	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	49

110	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I y P</i>	50
111	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, slt II y P</i>	51
112	Rastro Municipal	-	-	P	52
113	Rastro Municipal	-	-	P	53
114	Rastro Municipal	-	-	P	54
115	Rastro Municipal	-	-	<i>slt I, P</i>	55
116	Rastro Municipal	-	-	P	56
117	Rastro Municipal	-	-	P	57
118	Rastro Municipal	-	-	P	58
119	Rastro Municipal	-	-	P	59
120	Rastro Municipal	-	-	<i>eaeA, slt I y P</i>	60

# Muestra consecutivo	Lugar	Microbiológico		PCR (Gen)
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i>	
1	Rastro TIF (1)	-	-	P
2	Rastro TIF (2)	-	-	P
3	Rastro TIF (3)	-	-	P
4	Rastro TIF (4)	-	-	P
5	Rastro TIF (5)	-	-	P
6	Rastro TIF (6)	-	-	P
7	Rastro TIF (7)	-	-	P
8	Rastro TIF (8)	-	-	P
9	Rastro TIF (9)	-	-	P
10	Rastro TIF (10)	-	-	P
11	Rastro TIF (11)	-	-	P
12	Rastro TIF (12)	-	-	P
13	Rastro TIF (13)	-	-	<i>eaeA, slt I, P</i>
14	Rastro TIF (14)	-	-	P
15	Rastro TIF (15)	-	-	P
16	Rastro TIF (16)	-	-	P
17	Rastro TIF (17)	-	-	P
18	Rastro TIF (18)	-	-	P
19	Rastro TIF (19)	-	-	P
20	Rastro TIF (20)	-	-	P
21	Rastro TIF (21)	-	-	P
22	Rastro TIF (22)	-	-	P
23	Rastro TIF (23)	-	-	P
24	Rastro TIF (24)	-	-	P
25	Rastro TIF (25)	-	-	P
26	Rastro TIF (26)	-	-	P
27	Rastro TIF (27)	-	-	P
28	Rastro TIF (28)	-	-	P
29	Rastro TIF (29)	-	-	P
30	Rastro TIF (30)	-	-	P
31	Rastro TIF (31)	-	-	P
32	Rastro TIF (32)	-	-	P
33	Rastro TIF (33)	-	-	P
34	Rastro TIF (34)	-	-	P
35	Rastro TIF (35)	-	-	P
36	Rastro TIF (36)	-	-	P
37	Rastro TIF (37)	-	-	P
38	Rastro TIF (38)	-	-	P
39	Rastro TIF (39)	-	-	P
40	Rastro TIF (40)	-	-	P
41	Rastro TIF (41)	-	-	P

42	Rastro TIF (42)	-	-	P
43	Rastro TIF (43)	-	-	P
44	Rastro TIF (44)	-	-	P
45	Rastro TIF (45)	-	-	P
46	Rastro TIF (46)	-	-	P
47	Rastro TIF (47)	-	-	P
48	Rastro TIF (48)	-	-	P
49	Rastro TIF (49)	-	-	P
50	Rastro TIF (50)	-	-	P
51	Rastro TIF (51)	-	-	P
52	Rastro TIF (52)	-	-	P
53	Rastro TIF (53)	-	-	P
54	Rastro TIF (54)	-	-	P
55	Rastro TIF (55)	-	-	P
56	Rastro TIF (56)	-	-	P
57	Rastro TIF (57)	-	-	P
58	Rastro TIF (58)	-	-	P
59	Rastro TIF (59)	-	-	P
60	Rastro TIF (60)	-	-	P

- ¿Has visto eso? ¿Qué era? – preguntó el ladrón a la oscura figura que salía de entre las sombras -. Y ya que estamos, ¿Quién eres tú? – añadió con tono de sospecha.

ADIVINA – respondió la voz.

Mooty escudriñó a la figura encapuchada.

- ¡Vaya! – exclamó -. No sabía que acudieras a por la gente como yo.

ACUDO A POR TODOS.

- Quiero decir en persona ..., bueno, más o menos.

AVECES EN OCASIONES ESPECIALES.

- Si, bueno – concedió Mooty -. ¡Y ésta es una de ellas, sin duda! O sea ¡era un jodido dragón! ¿Qué se supone que puede hacer uno? ¡Nadie espera encontrarse un dragón a la vuelta de la esquina!

EN FIN, SI NO TE IMPORTA VENIR POR AQUÍ ... – indicó la Muerte, poniendo la mano esquelética en el hombro del ex ladrón.

- ¿Sabes una cosa? Una echadora de cartas me dijo que moriría en la cama, rodeado de bisnietos llorosos – dijo Mooty a la alta figura - ¿Qué te parece, eh?

ME PARECE QUE ESTABA EQUIVOCADA.

- Un jodido dragón – gruñó Mooty -. Y respiraba fuego, y todo. ¿Sufrió mucho?

NO. FUE PRÁCTICAMENTE INSTANTÁNEO.

- Menos mal. No me gustaría pensar que sufrí mucho. – Mooty miró a su alrededor -. ¿Qué viene ahora? – preguntó.

Tras él, la lluvia convirtió en barro el montoncito de cenizas negras.

...”

“¡Guardias! ¿Guardias?”

Terry Pratchett

Ed. Plaza Janés

España, 1999

“... Iba a ser la peor noche en la vida de Zebbo Mooty, ladrón de tercera clase, y no se habría consolado en absoluto saber que también sería la última. La lluvia hacía que la gente se quedara en sus casas y él aun no había cumplido el cupo. Por tanto, se mostró un poco menos cauteloso de lo que habría sido en otras circunstancias.

Durante la noche, en las calles de Ankh-Morpork la precaución es un absoluto. No existe el concepto de «precaución moderada». O eres muy precavido, o eres un cadáver. Quizá camines y respíres, pero el caso es que eres un cadáver.

Mooty oyó los sonidos amortiguados que le llegaban de un callejón cercano, se sacó de la manga la cachiporra forrada de cuero, esperó a que su víctima estuviera a punto de doblar la esquina, saltó, exclamó «¡Oh, mier...!», y murió.

Fue una muerte de lo más inusual. Nadie moría así desde hacía por lo menos un siglo.

El muro de piedra que había a su espalda se puso al rojo vivo por el calor, y el brillo se fue fundiendo poco a poco con la oscuridad circundante.

Fue el primer ciudadano de Ankh-Morpork en ver al dragón. Por desgracia, esto no lo consoló en absoluto, porque estaba muerto.

«...da», dijo.

Su yo descarnado contempló el montoncito de cenizas que, esto lo supo con una certeza poco común, eran lo que quedaba de su cuerpo. Ver tus propios restos mortales es una sensación extraña. No le pareció tan espantoso como habría dicho si se lo hubieran preguntado diez minutos antes. El hecho de descubrir que estás muerto se compensa al descubrir que hay una parte de ti conciente que se da cuenta de que estás muerto.

El callejón volvía a estar desierto.

- Pues sí que ha sido raro - se dijo Mooty.

EXTREMADAMENTE INUSUAL DESDE LUEGO.