



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DE LOS FACTORES EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA  
DE LA POLIMERASA (PCR) SOBRE EL TAMAÑO DE LOS AMPLIFICADOS  
DEL GEN *Stx1* DE *Escherichia coli***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ANA VICTORIA FLORES IBARRA**

**ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA**



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.

## **Agradecimientos**

### *A mis padres:*

Gracias por el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, por que siempre me han impulsado a dar lo mejor de mí. Gracias por estar ahí, siempre que los necesito, por creer en mí; pero sobre todo gracias por demostrarme su amor incondicional. Los amo, sin ustedes esto no sería posible.

### *A Moni:*

Mil gracias hermanita por alegrarme el día siempre que me ves deprimida, por escucharme cuando lo necesito y por soportar mi mal genio. Sabes que te amo aunque no te lo diga con frecuencia, siempre voy a estar cerca cuando me necesites. Eres parte de este logro.

### *A mis abuelitos, tíos, tías, primos, primas y a los bodoques:*

Siempre me han apoyado para que alcance mis metas y han confiado en mis capacidades, gracias por formar el gran trampolín que me impulsa a llegar cada vez más alto.

### *A Rubén:*

Gracias por estar siempre a mi lado, aunque yo estuviera con la mirada clavada en el libro o en la computadora, por ayudarme con mis trabajos, por ayudarme a ver los problemas más objetivamente y por ser mi válvula de escape. Te amo.

*A mis amigas y amigos:*

Son parte de una etapa muy importante en mi vida, las experiencias que compartimos juntos me llevaron a ser la persona que soy ahora. Gracias por su apoyo incondicional y por impulsarme a seguir adelante. Gracias en especial a Karina y a Jazmín.

*Al Dr. Valdivia:*

Por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y por ayudarme cuando lo necesitaba; gracias.

*A Nestor:*

Sin tu ayuda habría sido muy difícil comenzar este trabajo, gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

*A Cocki, Tom y Nena:*

Siempre logran hacer algo que nos llena de alegría a todos en la casa. Son muy importantes en mi vida.

## *Índice*

1. Título.....	I
2. Votos aprobatorios.....	II
3. Agradecimientos.....	III
4. Índice.....	V
5. Resumen.....	1
6. Introducción	
A) Características de tinción, bioquímicas y de crecimiento en agar.....	2
B) Estructura antigénica.....	2
C) Clasificación de E. coli patógenas (patotipos).....	3
D) Genes.....	4
E) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	4
7. Antecedentes.....	7
8. Hipótesis.....	9
9. Objetivo General.....	10
10. Objetivos Particulares.....	11
11. Materiales y métodos	
A) Cultivo.....	12
B) Extracción del ADN.....	12
C) PCR (Polimerase Chain Reaction).....	13
D) Electroforesis.....	16
E) Análisis estadístico.....	16
12. Resultados.....	17
13. Discusión.....	46
14. Conclusiones.....	48
15. Bibliografía .....	49

# **Efecto de los Factores en la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sobre el Tamaño de los Amplificados del Gen *Stx1* de *Escherichia coli*.**

## ***Resumen***

La *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) es una bacteria que tiene gran importancia en salud pública, siendo relevante el serotipo O157:H7 perteneciente a este tipo de *E. coli*, dado que es el responsable del síndrome urémico hemolítico (SUH). En el presente trabajo se utilizaron cepas de origen porcino y canino obtenidas de investigaciones previas, ya que en los resultados de la electroforesis de los amplificadores del gen *stx1* de estas cepas se observó una disminución en el tamaño molecular de dicho gen en comparación con el mismo gen correspondiente a cepas de origen humano. Se utilizaron diferentes combinaciones de temperaturas y tiempos para conformar distintos ciclos de PCR (Polimerase Chain Reaction) para observar el efecto de estos factores sobre el tamaño molecular del gen *stx1*, utilizando dos cepas como controles positivos la cepa EDL933 y la cepa 933J. Como resultado en la electroforesis de los amplificadores de gen *stx1* se observó que no se lograba la amplificación esperada del gen al emplear ciertos ciclos; por otra parte cuando se logró amplificar correctamente al gen *stx1*, en la mayoría de los ciclos se observó una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto a la cepa EDL933, pero al realizar la prueba estadística de análisis de varianza no se encontró una diferencia significativa, únicamente en el ciclo ANA3 se encontró una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto a las cepas de origen humano. Se concluye que la modificación de las constantes de temperatura y tiempo no altera significativamente el tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1*.

## ***Introducción***

### ***A) Características de tinción, bioquímicas y de crecimiento en agar***

La *Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la flora intestinal normal de humanos, mamíferos y aves (Bibek, 2001), es perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, los microorganismos incluidos en este género tienen las siguientes características: Son bacilos Gram (-) dotados de motilidad por flagelos o carentes de motilidad, son anaerobios facultativos, fermentan la lactosa con producción de ácidos y gas, fermentan glucosa, son catalasa (+), oxidasa (-), indol (+), lisina descarboxilasa (+), fermentación del manitol (+) y reducen el nitrato a nitrito (Granados y Villaverde, 2003; Brooks y col., 2005; Holt y col., 1994).

Estas bacterias crecen bien cuando son sembradas en medios de cultivo como el agar MacConkey, sobre peptona o medios con extracto de carne sin adición de NaCl; el crecimiento ocurre entre 10-50°C, siendo la temperatura óptima de 30-37° C (Granados y Villaverde, 2003; Brooks y col., 2005; Holt y col., 1994).

*E. coli* forma colonias lisas, circulares, convexas y con bordes bien definidos, incluso algunas cepas son capaces de producir hemólisis en agar sangre (Brooks y col., 2005).

### ***B) Estructura antigénica***

La estructura antigénica de la *E. coli* se compone por tres antígenos:

1. Antígeno O: es la parte más externa de la pared lipopolisacárida de la célula. Se compone por unidades repetidas de polisacáridos (Brooks y col., 2005).
2. Antígenos K: son antígenos capsulares, en el caso de la *E.coli* son polisacáridos (Brooks y col., 2005).

3. Antígenos H: son los flagelos y se desnaturalizan o retiran mediante alcohol o calor. Son una secuencia de péptidos flagelares (Brooks y col., 2005).
4. Antígenos F: son los antígenos de los pili o fimbrias, responsables de la adherencia a las células. Se componen por unidades repetidas de un solo polipéptido (Eisenstein, 1987).

### ***C) Clasificación de E. coli patógenas (Patotipos)***

Existen diferentes formas de clasificar a la *E. coli*, una de estas es la clasificación según sus factores de virulencia:

1. *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Brooks y col., 2005; López y Guevara, 2002): se adhieren a las células mucosas del intestino delgado y provocan el borrado de las microvellosidades y en ocasiones llegan a penetrar a los enterocitos. Es la causante de diarrea en los lactantes (Brooks y col., 2005).
2. *E. coli* enterotoxigena (ETEC) (Brooks y col., 2005; López y Guevara, 2002): se adhiere al epitelio intestinal y produce exotoxina termolábil (LT) y/o enterotoxina termoestable (ST). Estas cepas son las responsables de la diarrea del viajero e importante en la diarrea de lactantes (Brooks y col., 2005).
3. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Brooks y col., 2005; López y Guevara, 2002): producen una verotoxina similar a la toxina de Shiga (ST) (Brooks y col., 2005; Bibek, 2001). Se han asociado con colitis hemorrágica, diarrea grave y síndrome urémico hemolítico (SUH) (incluye Insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia), el serotipo más común es el O157:H7 (Brooks y col., 2005; Bibek, 2001). Los animales, particularmente el ganado bovino son considerados los portadores del agente (Bibek, 2001). La ingestión de 10-100 células es suficiente para producir enfermedad, especialmente en individuos susceptibles (Bibek, 2001).
4. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) (Brooks y col., 2005; López y Guevara, 2002): las bacterias invaden a los enterocitos. La enfermedad que se produce es muy similar a la Shigelosis (Brooks y col., 2005).

5. *E. coli* enteroagregativa (ECEA o EA<sub>g</sub>EC) (Brooks y col., 2005; López y Guevara, 2002): produce una toxina muy parecida a la ST y una hemolisina. Provocan diarrea aguda y crónica con una duración menor a 14 días (Brooks y col., 2005).
6. *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (López y Guevara, 2002; Nataro, 2002; Gunzburg y col., 1993; Levine y col., 1993): este tipo de bacterias se definen por la habilidad de adherirse a las células HEp-2 en un patrón difuso, con poca adherencia al sustrato (Nataro, 2002). Se ha asociado a este grupo con cuadros de diarrea persistente en niños entre 18 (Gunzburg y col., 1993) y 60 meses de edad (Levine y col., 1993).

#### ***D) Genes***

Los genes responsables de la patogenicidad de las cepas EHEC son:

- Genes *stx1* y *stx2*----- codifican la producción de Citotoxinas (responsables del daño celular)
- Gen *eaeA*----- codifica la producción de la Proteína intimina (responsable de la unión y el borrado de las microvellosidades (A/E))
- Gen *hlyA*-----codifica la producción de la Enterohemolisina (responsable de la hemólisis)

En las cepas EHEC la producción de las verotoxinas (citotoxinas) depende de la presencia de los genes *stx1* y *stx2* (incluyendo sus variantes); estos genes se encuentran dentro de bacteriófagos integrados al cromosoma bacteriano (Nelly y Friedman, 1998). Lo anterior resulta importante por que existe la posibilidad de transducción de los fagos a cepas de *E. coli* distintas, dando como resultado nuevos tipos de cepas EHEC (Schmidt y col., 1999; Ohnish y col., 2002).

#### ***E) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Para la identificación segura y rápida de genes existe una técnica que está tomando cada vez mayor importancia dentro de la investigación médica y biológica, es la Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) (De la Rosa y Prieto, 2005).

La PCR es una técnica de diagnóstico molecular en la cual el material de partida es un segmento de la doble cadena de ADN que contiene la secuencia específica a detectar (De la Rosa y Prieto, 2005). Esta técnica fue descrita por primera vez en 1980 por Kary Mullis (Hogg, 2005).

La PCR es el mayor avance tecnológico en el análisis de ADN y ARN, clonación de ADN, diagnóstico genético y de detección de mutaciones (Wang y col., 1989; Kaufman y col., 1995; Dale, 1998).

Para la reacción se requieren cebadores o primers (oligonucleótidos sintéticos), una ADN polimerasa termoestable y una mezcla de nucleótidos (De la Rosa y Prieto, 2005). Los primers flanquean y limitan la secuencia del ADN que se desea amplificar, cada primer hibrida un trozo de una de las dos cadenas de ADN, lo cual quiere decir que la síntesis a partir de cada primer se realiza en sentido contrario a la síntesis del otro primer encerrando el fragmento de ADN a amplificar (De la Rosa y Prieto, 2005; Hogg, 2005). Por su parte la ADN polimerasa sintetiza cadenas de ADN complementario de la secuencia diana a partir de los cebadores (De la Rosa y Prieto, 2005).

El PCR comienza con la extracción del ADN presente en la muestra, al cual se le agregan los reactivos para poder iniciar el proceso dentro de un termociclador (De la Rosa y Prieto, 2005).

Dentro del termociclador se llevan a cabo las tres fases del PCR:

- 1) Desnaturalización: consiste en la separación de las 2 hebras de ADN mediante calentamiento. Se realiza a una temperatura de 94-95° C (De la Rosa y Prieto, 2005; Hogg, 2005).

- 2) Hibridación: los primers se fijan en los extremos de la zona a amplificar. Esto ocurre a una temperatura de 50-60° C (De la Rosa y Prieto, 2005; Hogg, 2005).
  
- 3) Elongación: la ADN polimerasa extiende el primer adhiriendo nucleótidos complementarios formando una segunda hebra de la secuencia diana, la reacción se realiza siempre en sentido 5'----3' (De la Rosa y Prieto, 2005). Se realiza a una temperatura de 72° C, esta es la temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima, ya que ésta es obtenida de una bacteria termofílica como la *Thermus aquaticus* (De la Rosa y Prieto, 2005; Hogg, 2005).

Este proceso se repite de 30 a 35 veces (en los protocolos normales), dando como resultado la síntesis de millones de copias de la secuencia amplificada en unas cuantas horas (De la Rosa y Prieto, 2005; Hogg, 2005).

El producto obtenido puede observarse mediante distintas técnicas como la electroforesis en gel (De la Rosa y Prieto, 2005).

## *Antecedentes*

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas de trabajos de investigación previos en donde se estudiaron las cepas de origen animal (canino y porcino respectivamente), dichas cepas mostraron una ligera disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* en comparación con el mismo gen de las cepas conocidas de origen humano.

Vásquez (2007), trabajó con cepas de origen porcino obtenidas de casos que llegaron al laboratorio clínico veterinario DIVET y con algunas cepas igualmente de origen porcino proporcionadas por el M.V.Z. Víctor Quintero de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM. Un ejemplo de los resultados obtenidos se encuentra en la siguiente imagen (Figura 1).

**Figura 1**

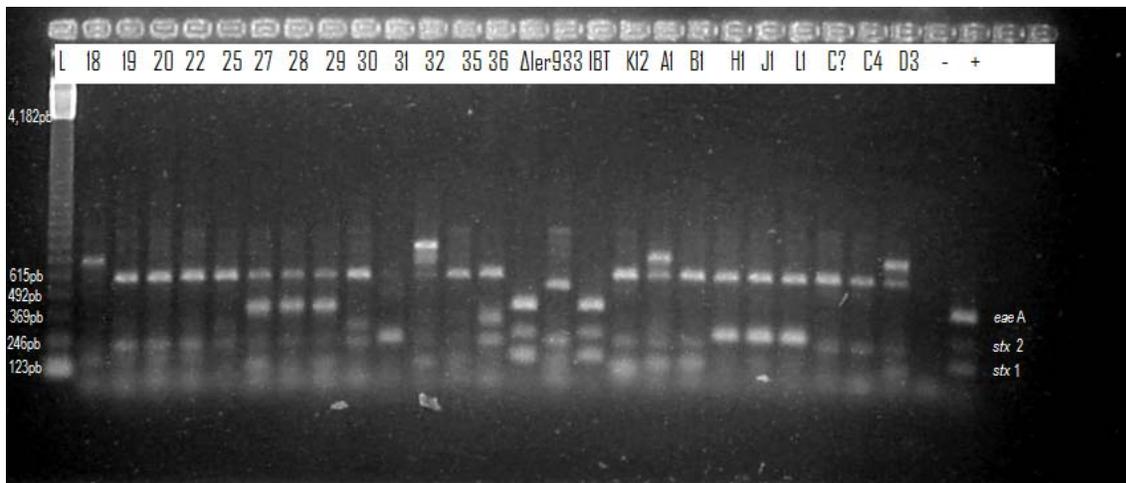


Figura 1. Foto electrónica de la electroforesis de los amplificados de PCR múltiplex de cepas de *E. coli* de origen porcino. En los carriles correspondientes a las cepas A1 y 32 respectivamente se observa una disminución en el tamaño molecular de la banda correspondiente al gen *stx1* con respecto a las cepas control ( $\Delta$ ler, 933e IBT) (Vásquez, 2008).

Estrada (2007), trabajó con cepas de *E. coli* de origen canino obtenidas mediante un muestreo en el albergue “El Rosado” y algunas cepas que fueron donadas por el laboratorio clínico veterinario DIVET. En los amplificados del gen *stx1* de estas cepas

también se observó una disminución en el tamaño molecular de dicho gen con respecto a los amplificadores de las cepas control.

Esto es importante, ya se sabe que es posible que se genere diversidad genómica en el serogrupo O157 cuando existe variación estructural y posicional extensa de los bacteriófagos (Ohnishi y col., 2002); por otra parte se debe considerar el efecto del almacenamiento prolongado y de las múltiples resiembras que se realizaron con las cepas utilizadas en el presente trabajo, ya que esto pudo haber modificado el genoma provocando ligeras variaciones en el mismo (Shima y col., 2006).

Por otra parte en estudios previos se han identificado variantes del gen *stx2* (Cicuta y col., 2006), así como variantes del gen *eae* (Blank y col., 2002).



## ***Hipótesis***

Si al modificar las constantes de tiempo y temperatura de la técnica de PCR no se observa un cambio en el tamaño molecular del gen *stx1*, entonces las cepas de origen animal cuentan con un gen distinto al gen de las cepas de origen humano conocidas.

## ***Objetivo General***

Evaluar las alteraciones producidas por la variación de temperatura y tiempo sobre el tamaño molecular observado en amplificados del gen *stx1* de *Escherichia coli* aisladas de animales domésticos.

## ***Objetivos Particulares***

1. Evaluar el efecto de la modificación de la temperatura de desnaturalización sobre el tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* presente en las distintas cepas de *Escherichia coli* utilizadas.
2. Evaluar el efecto de la modificación de la temperatura de hibridación sobre el tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* presente en las distintas cepas de *Escherichia coli* utilizadas.
3. Evaluar el efecto de la modificación del tiempo durante los ciclos de PCR sobre el tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* presente en las distintas cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

## ***Materiales y Métodos***

### ***A) Cepas utilizadas***

Para el trabajo se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

- 1) Control Positivo: Cepa 933J (presenta el gen *stx1*) (Vázquez, 2008; Solís, 2008).
- 2) Control Positivo: Cepa EDL 933 (presenta los genes (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) (Vázquez, 2008; Solís, 2008).

Las cepas control fueron proporcionadas por el Doctor Guillermo Valdivia Anda de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- 3) Cepas Problema: (Obtenidas de trabajos previos) A1, CIVB032 (origen porcino) y EE1a, EE1c (origen canino).

Todas las cepas fueron sembradas en medio de Mc Conkey a 37°C durante 24h para su purificación (Holt y col., 1994).

### ***B) Extracción del ADN***

Todas las cepas fueron sembradas en caldo soya tripticaseina (AST) durante 24h a 37°C (Valdivia, 1995), posteriormente los cultivos se centrifugaron (centrifuga UNICO™ 182-E Ridge Dayton, NJ 08810) a 1500 rpm por 3-4 minutos (Paton y Paton, 1997), se desechó el sobrenadante y posteriormente se resuspendió el sedimento en 1 ml de agua inyectable y fue colocado en microtubos estériles tipo Eppendorf de 1.5ml (Paton y Paton, 1997).

Los microtubos se colocaron en baño maría durante 15min, después se refrigeraron las muestras durante 10 min (Paton y Paton, 1997). Una vez transcurrido este tiempo se realizó una segunda centrifugación (microcentrífuga BIORAD, model 16K) a 4000 rpm por espacio de 2 minutos.

Finalmente las muestras fueron guardadas en congelación a -20 °C hasta su utilización.

**C) PCR (Polimerase Chain Reaction)**

Se llevó a cabo la técnica de PCR múltiplex (Cuadro 1), para la cuál se realizó la preparación de cada una de las 6 muestras de acuerdo con las cantidades mostradas a continuación (Cuadro 2):

<b>Cuadro 1. Primers utilizados para realizar el PCR Múltiplex</b>	
<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>
<i>stx1 F</i>	5' CTGGATTTAATGTCGCATAGTC <sup>3'</sup>
<i>stx1 R</i>	5' AGAACGCCCACTGAGATCATC <sup>3'</sup>
<i>stx2 F</i>	5' GGCACGTCTGAAACTGCTCC <sup>3'</sup>
<i>stx2 R</i>	5' TCGCCAGTTATCTGACATTCTG <sup>3'</sup>
<i>eaeA F</i>	5' GACCCGGCACAAGCATAAGC <sup>3'</sup>
<i>eaeA R</i>	5' CCACCTGCAGCAACAAGAGG <sup>3'</sup>

<b>Cuadro 2. Reactivos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer (INVITROGEN)	10x	2.5µl
Mg Cl <sub>2</sub> (INVITROGEN)	50mM	1µl
dNTPs (INVITROGEN)	200µM	2µl
Primers (INVITROGEN)	50pM/µl	3.5µl
H <sub>2</sub> O		13.8µl
Taq (INVITROGEN)	5UI/µl	0.2µl
<b>TOTAL</b>		<b>23µl</b>

Se colocaron 23µl de la mezcla anterior en 7 microtubos eppendorf de 0.6ml, ya que se consideraron 2 cepas testigo, 4 cepas problema y un blanco. Posteriormente se agregaron 2µl de ADN a cada microtubo respectivamente, dejando al microtubo marcado como blanco sin ADN. Los microtubos fueron colocados en el termociclador (MJ RESEARCH INC, PTC-100™), para realizar el proceso de PCR.

Se realizó la programación del termociclador tomando en cuenta los criterios que se muestran a continuación (Cuadro 3). Posteriormente se eligió el programa que se deseaba utilizar y se habilitó en el termociclador.

<b><i>Cuadro 3. Diseño experimental</i></b>		
<b><i>Ciclo</i></b>	<b><i>Variables</i></b>	
	<b><i>Temperatura</i></b>	<b><i>Tiempo</i></b>
<b><i>STEC2 (normal)</i></b>	94°C 50°C	45seg
<b><i>ANA1</i></b>	90°C 45°C	45seg
<b><i>ANA2</i></b>	96°C 55°C	45seg
<b><i>ANA3</i></b>	90°C 50°C	45seg
<b><i>ANA4</i></b>	96°C 50°C	45seg
<b><i>ANA5</i></b>	94°C 50°C	30seg
<b><i>ANA6</i></b>	94°C 50°C	55seg

De esta forma los ciclos utilizados fueron los siguientes (Cuadro 4):

<b>Cuadro 4. Condiciones empleadas en la PCR para la evaluación del gen <i>stx1</i></b>							
Paso	Ciclo						
	STEC2	ANA1	ANA2	ANA3	ANA4	ANA5	ANA6
1	94°C por 5min	90°C por 5min	96°C por 5min	90°C por 5min	96°C por 5min	94°C por 5 min	94°C por 5min
2	50°C por 2min	45°C por 2min	55°C por 2min	50°C por 2min	50°C por 2min	50°C por 2min	50°C por 2min
3	72°C por 45seg	72°C por 30seg	72°C por 55seg				
4	94°C por 45seg	90°C por 45seg	96°C por 45seg	90°C por 45seg	96°C por 45seg	94°C por 30seg	94°C por 55seg
5	50°C por 45seg	45°C por 45seg	55°C por 45seg	50°C por 45seg	50°C por 45seg	50°C por 30seg	50°C por 55seg
6	Repite 35 veces paso 3 a 5						
7	72°C por 10min						
8	4 °C ∞						
9	Fin						

#### ***D) Electroforesis***

Se realizó una mezcla homogénea de 30ml de solución TAE 1X estéril + 0.6g de Agarosa (Rodríguez, 2002), se calentó hasta que la muestra adquirió una apariencia transparente. Posteriormente la mezcla de agarosa se dejó enfriar ligeramente y se agregaron 10µl de Bromuro de Etidio, se mezcló para que el bromuro de Etidio se distribuyera correctamente en toda la mezcla. Se colocaron los separadores y el peine en su lugar correspondiente en la cámara de electroforesis en gel (LIFE TECHNOLOGIES™, HORIZON 58) y la mezcla fue vertida dentro de la cámara. Se dejó enfriar hasta que el gel endureció. Se retiraron separadores y el peine, dejando libre el gel, el cual se cubre con solución TAE 1X dentro la cámara de electroforesis.

Los productos amplificados se colocaron en los pozos formados por el peine. El primer pozo se dejó libre para colocar el marcador de peso molecular al final. Para cada pozo se realizó una mezcla de 1.5µl de Buffer + 6.5µl de la muestra elegida respectivamente, después se colocó esa mezcla en el pozo correspondiente y por último se colocó el marcador de peso molecular (123bp DNA Ladder) en el primer pozo del gel. Se conectó la cámara a la corriente eléctrica y se dejaron correr las muestras con una corriente constante (75V) y amperaje constante, durante 45 minutos aproximadamente. Por último se sacó el gel de la cámara de electroforesis y se colocó en el transluminador (SYNGENE) donde se obtuvo una fotografía digital utilizando luz ultravioleta, se procesó dicha fotografía mediante el programa IMAGE-Pro Plus.

#### ***E) Análisis estadístico***

Se realizó el análisis estadístico de los resultados utilizando el método de análisis de varianza (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1999; Daniel, 1984) para establecer si existía una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para el gen *stx1* de las cepas de origen humano y de las cepas de origen animal, así como también se probó si existía una

diferencia significativa entre los resultados para el gen *stx1* en los diferentes ciclos utilizados.

## Resultados

Al realizar la electroforesis de los amplificados de las diferentes cepas de *E. coli* obtenidos al utilizar el ciclo STEC2 de PCR se encontró una disminución del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal en relación con el mismo gen correspondiente a las cepas de origen humano, siendo poco evidente esta diferencia con respecto al gen *stx1* de la cepa 933J y más marcada con respecto al gen *stx1* de la cepa EDL933. (Figura 2).

### Figura 2

Resultados de la electroforesis de los amplificados correspondientes al ciclo STEC2 (Normal)

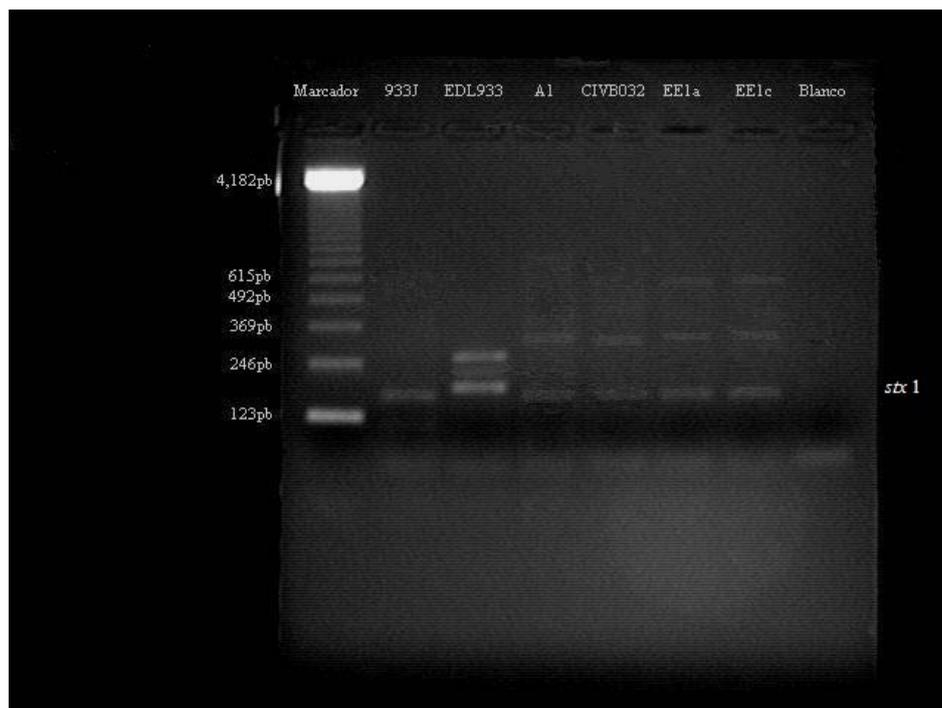


Figura 2. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto al mismo gen de la cepa EDL 933 siendo poco evidente en el caso del gen *stx1* de la cepa

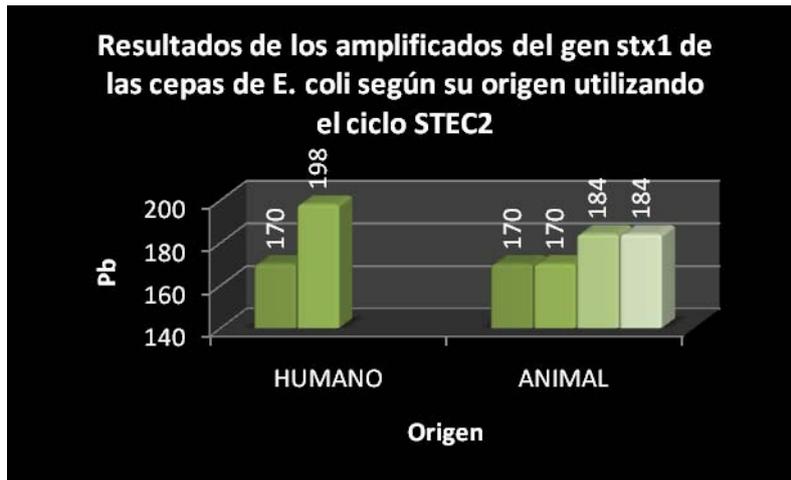
933J

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo STEC2 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal fue menor en todos los casos, que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933. Por otra parte, al comparar el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa 933J se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* fue igual en relación con las cepas de origen porcino, mientras que las cepas de origen canino presentaron un tamaño molecular mayor del gen *stx1* con respecto al tamaño molecular que presenta el mismo gen correspondiente a la cepa 933J. (Cuadro 5 y Figura 2.1).

<b>Cuadro 5</b>	
<b>Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo STEC2</b>	
<b>Temperatura: Desnaturalización 94°C, Hibridación 50°C. Tiempo: 45s</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Tamaño Molecular (pb)</b>
<b>933J</b>	<b>170</b>
<b>EDL933</b>	<b>310, 254, 198</b>
<b>A1</b>	<b>366, 170</b>
<b>CIVB032</b>	<b>352, 170</b>
<b>EE1a</b>	<b>561, 379, 184</b>
<b>EE1c</b>	<b>561, 379, 184</b>

Cuadro 5. El tamaño molecular del gen *stx1* varía entre las cepas de origen humano y las cepas de origen animal (170pb a 198pb).

**Figura 2.1**



Al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos del tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo STEC2, se obtuvo que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 5.1 y Cuadro 5.1.1)

Cuadro 5.1. ANOVA GEN <i>stx1</i> CICLO STEC2 entre origen			
Origen	HUMANO	ANIMAL	
	170	170	
	198	170	
		184	
		184	
			total
<b>SUMA</b>	368	708	1076
<b>N</b>	2	4	6
<b>Suma de cuadrados</b>	68104	125512	193616
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	193028		
<b>Suma total de cuadrados /n total</b>	192962.6667		
<b>S.C. total</b>	653.3333333		
<b>S.C. grupos</b>	65.33333333		
<b>S.C. ntragrupos</b>	588		
<b>α</b>	2		

Cuadro 5.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo STEC2				
Origen de la variación	g. l	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	1	65.33333	65.33333	0.444444444
Y-Y intragrupos	4	588	147	
Y-Y total	5	653.3333		
Ho= HUMANO = ANIMAL				
Ha= HUMANO ≠ ANIMAL				
<b>Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante</b>				
En base a distribución F	0.975		Ho= aceptada	12.22

Al realizar la electroforesis de los amplificados de las diferentes cepas de *E. coli* obtenidos al utilizar el ciclo ANA1 de PCR se encontró una disminución del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen canino en relación con el mismo gen correspondiente a la cepa EDL933. No se obtuvo el amplificado del gen *stx1* correspondiente a la cepa 933J ni el correspondiente a las cepas de origen porcino (A1 y CIVB032). (Figura 3).

**Figura 3**

Resultados de la electroforesis de los amplificados correspondientes al ciclo ANA1

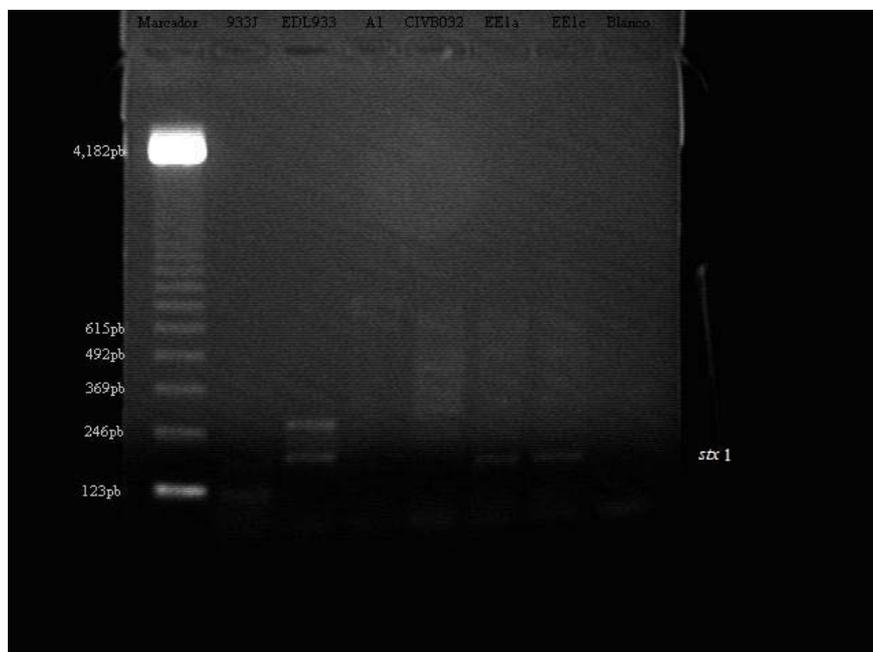


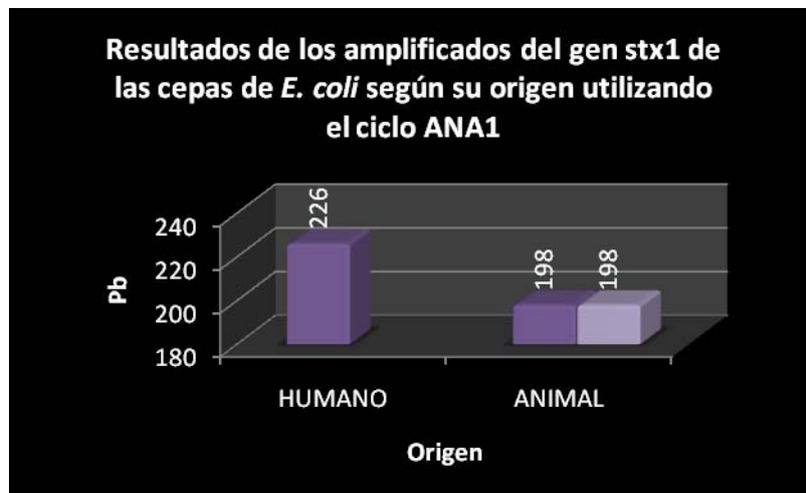
Figura 3. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto al mismo gen de la cepa EDL 933. No se observa el gen *stx1* en los carriles correspondientes a las cepas 933J, A1 ni en CIVB032.

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo ANA1 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen canino (EE1a y EE1c) fue menor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933. (Cuadro 6 y Figura 3.1).

Cuadro 6	
Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA1	
Temperatura: Desnaturalización 90°C, Hibridación 45°C	
Cepa	Tamaño Molecular (pb)
933J	
EDL933	282, 254, 226
A1	
CIVB032	
EE1a	198
EE1c	198

Cuadro 6. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto a la cepa EDL 933. El tamaño molecular del gen *stx1* varía de 198pb en los amplificadores de origen canino con respecto al tamaño molecular de 226pb del mismo gen, que se observa en el amplificado correspondiente a EDL933.

Figura 3.1



Los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) al tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo ANA1, demostraron que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 6.1 y Cuadro 6.1.1)

Cuadro 6.1. ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA1 entre origen			
Origen	HUMANO	ANIMAL	Column1
	226	198	
		198	
		total	
<b>SUMA</b>	226	396	622
<b>n</b>	1	2	3
<b>Suma de cuadrados</b>	51076	78408	129484
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	129484		
<b>Suma total de cuadrados /n total</b>	128961.3333		
<b>S.C. total</b>	522.6666667		
<b>S.C. grupos</b>	522.6666667		
<b>S.C. intragrupos</b>	0		
<b><math>\alpha</math></b>	2		

Cuadro 6.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA1				
Origen de la variación	g.l.	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	1	522.6666	522.6666	#DIV/0!
Y-Y intragrupos	1	0	0	
Y-Y total	2	522.6666		
Ho= HUMANO = ANIMAL				
Ha= HUMANO ≠ ANIMAL				
Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante				
En base a distribución F 0.975		Ho= aceptada		647.8

La electroforesis de los amplificos de las diferentes cepas de *E. coli* obtenidos al utilizar el ciclo ANA2 de PCR mostró que únicamente fue posible obtener el amplificado del gen *stx1* de la cepa EDL933, el resto de los carriles no mostró resultados. (Figura 4).

#### Figura 4

Resultados de la electroforesis de los amplificos correspondientes al ciclo ANA2



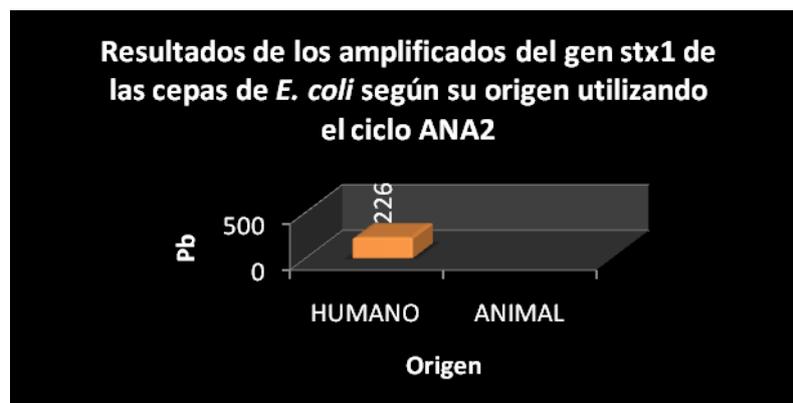
Figura 4. Únicamente se observa en amplificado correspondiente a la cepa EDL933 en donde se observan dos bandas, la última correspondiente al gen *stx1*.

El resultado numérico del tamaño molecular del gen *stx1* de la cepa EDL933 obtenido al utilizar el ciclo ANA2 de PCR fue de 226pb (Cuadro 7 y Figura 4.1)

<b>Cuadro 7</b>	
<b>Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA2</b>	
<b>Temperatura: Desnaturalización 96°C, Hibridación 55°C</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Tamaño Molecular (pb)</b>
933J	
EDL933	310, 226
A1	
CIVB032	
EE1a	
EE1c	

Cuadro 7. El amplificado correspondiente a la cepa EDL933 que presenta 226pb es el correspondiente al gen *stx1*.

Figura 4.1



Los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) al tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo ANA2, demostraron que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 7.1 y Cuadro 7.1.1)

Cuadro 7.1 ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA2			
Origen	HUMANO	ANIMAL	Column1
	226		
			Total
<b>SUMA</b>	226	0	220
<b>n</b>	1	0	1
<b>Suma de cuadrados</b>	51076	0	48400
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	51076		
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	48400		
<b>S.C. total</b>	0		
<b>S.C. grupos</b>	2676		
<b>S.C. intragrupos</b>	-2676		
<b><math>\alpha</math></b>	1		

Cuadro 7.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA2				
Origen de la variación	g.l.	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	1	2676	2676	#DIV/0!
Y-Y intragrupos	0	-	#DIV/0!	
		2676		
Y-Y total	0	0		
<b>Ho= HUMANO = ANIMAL</b>				
<b>Ha= HUMANO <math>\neq</math> ANIMAL</b>				
<b>Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante</b>				
<b>En base a distribución F 0.975</b>			Ho= aceptada	

Al realizar la electroforesis de los amplificados de las diferentes cepas de *E. coli* obtenidos al utilizar el ciclo ANA3 de PCR se encontró una disminución del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal en relación con el mismo gen correspondiente a las cepas de origen humano, siendo poco evidente esta diferencia con respecto al gen *stx1* de la cepa 933J y más marcada con respecto al gen *stx1* de la cepa EDL933. (Figura 5).

### Figura 5

Resultados de la electroforesis de los amplificados correspondientes al ciclo ANA3

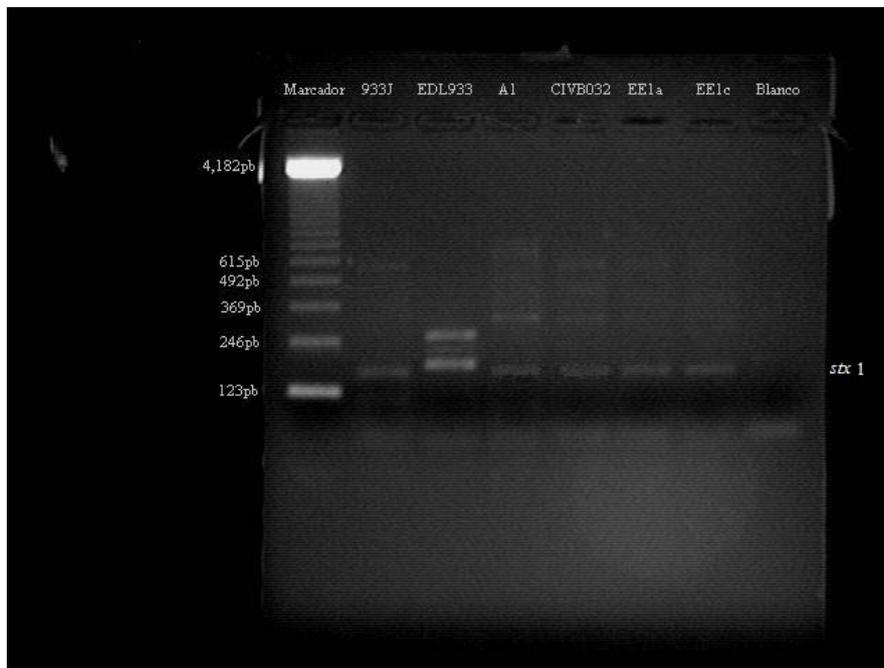


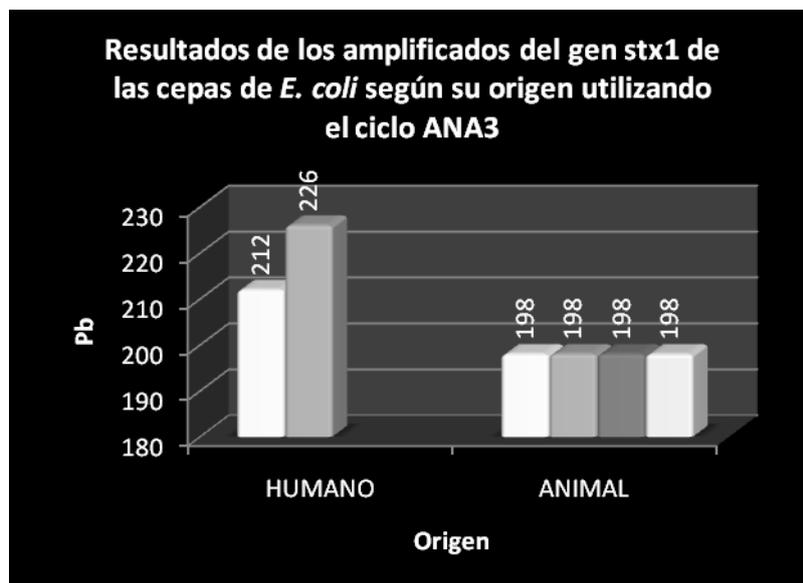
Figura 5. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular del mismo gen de la cepa EDL 933, siendo poco evidente la diferencia en relación con el gen *stx1* de la cepa 933J.

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo ANA3 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal fue menor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a las cepas de origen humano (Cuadro 8 y Figura 5.1).

Cuadro 8	
Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA3	
Temperatura: Desnaturalización 90°C, Hibridación 50°C	
Cepa	Tamaño Molecular (pb)
933J	212
EDL933	338, 296, 226
A1	645, 617, 505, 449, 393, 296, 198
CIVB032	575, 477, 449, 393, 296, 198
EE1a	575, 449, 407, 198
EE1c	575, 449, 407, 198

Cuadro 8. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal (198pb) con respecto al mismo gen de las cepas EDL 933 (226pb) y 933J (212pb).

Figura 5.1



El resultado del análisis estadístico (ANOVA) aplicado a los resultados del tamaño molecular del gen *stx1* obtenidos mediante el ciclo ANA3 de PCR demuestra que existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* presente en las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular del gen *stx1* presente en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular de dicho gen es diferente entre las cepas de origen animal y las cepas de origen humano. (Cuadro 8.1 y Cuadro 8.1.1).

<b>Cuadro 8.1. ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA3</b>			
<b>Origen</b>	<b>HUMANO</b>	<b>ANIMAL</b>	<b>Column1</b>
	212	198	
	226	198	
		198	
		198	
			Total
<b>SUMA</b>	438	792	1230
<b>n</b>	2	4	6
<b>Suma de cuadrados</b>	96020	156816	252836
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	252738		
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	252150		
<b>S.C. total</b>	686		
<b>S.C. grupos</b>	588		
<b>S.C. intragrupos</b>	98		
<b><math>\alpha</math></b>	2		

<b>Cuadro 8.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA3</b>				
<b>Origen de la variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>S.C.</b>	<b>M.C.</b>	<b>Razón de varianza</b>
<b>Y-Y entre grupos</b>	1	588	588	24
<b>Y-Y intragrupos</b>	4	98	24.5	
<b>Y-Y total</b>	5	686		
<b>Ho= HUMANO = ANIMAL</b>				
<b>Ha= HUMANO ≠ ANIMAL</b>				
<b>Por lo tanto el tamaño molecular según el origen tiene una diferencia significativa</b>				
<b>En base a distribución F 0.975</b>			<b>Ho=rechazada</b>	<b>12.22</b>

Al realizar la electroforesis de los amplificadores de las diferentes cepas de *E. coli* obtenidos al utilizar el ciclo ANA4 de PCR se encontró una disminución del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen canino en relación con el mismo gen correspondiente a la cepa EDL933, por el contrario al comparar el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen canino con el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa 933J éste se observó muy similar. No se obtuvo el amplificador del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen porcino (A1 y CIVB032). (Figura 6).

## Figura 6

Resultados de la electroforesis de los amplificados correspondientes al ciclo ANA4

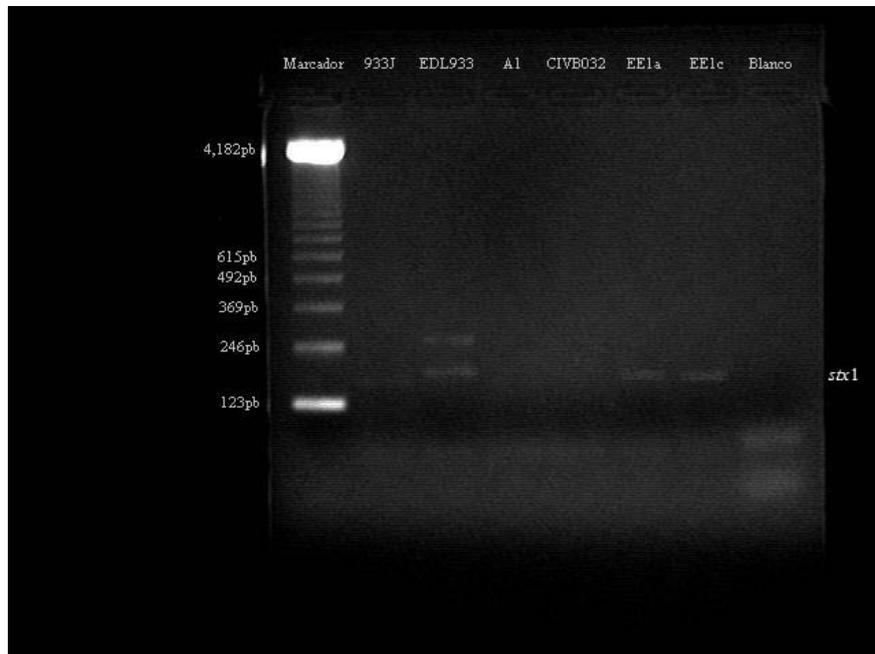


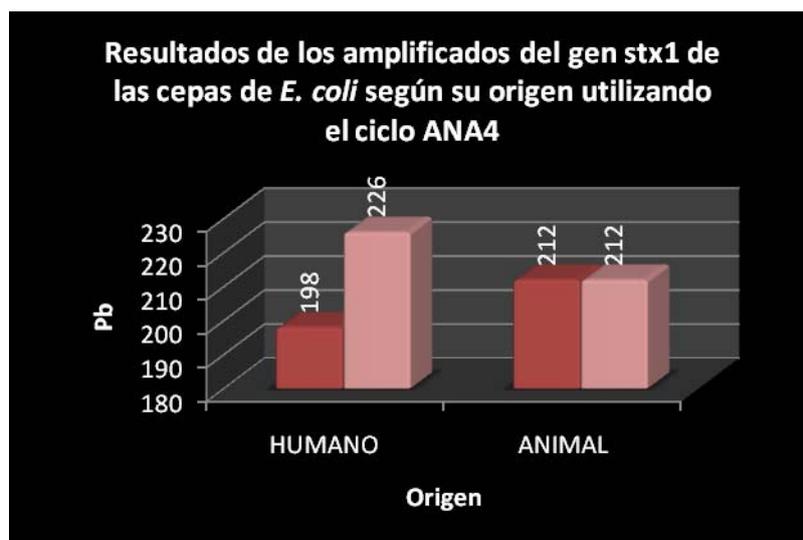
Figura 6. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen canino con respecto al tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933; mientras que el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen canino se observa muy similar al tamaño molecular de dicho gen de la cepa 933J. No se lograron obtener los amplificados correspondientes a las cepas de origen porcino.

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo ANA4 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen canino fue menor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933, pero mayor que el tamaño molecular del gen *stx1* de la cepa 933J. (Cuadro 9 y Figura 6.1).

Cuadro 9	
Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA4	
Temperatura: Desnaturalización 96°C, Hibridación 50°C	
Cepa	Tamaño Molecular (pb)
933J	198
EDL933	338, 226
A1	
CIVB032	
EE1a	212
EE1c	212

Cuadro 9. Se observa una disminución en el tamaño molecular de las bandas correspondientes al gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto a EDL933 (212pb y 226pb respectivamente), siendo este tamaño molecular mayor que el que se presenta en 933J(198pb). No se lograron obtener los amplificadores correspondientes a las cepas de origen porcino.

Figura 6.1



Los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) al tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo ANA4, demostraron que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular del mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 9.1 y Cuadro 9.1.1)

<b>Cuadro 9.1 ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA4</b>			
<b>Origen</b>	<b>HUMANO</b>	<b>ANIMAL</b>	<b>Column1</b>
	198	212	
	226	212	
			total
<b>SUMA</b>	424	424	848
<b>n</b>	2	2	4
<b>Suma de cuadrados</b>	90280	89888	180168
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	179776		
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	179776		
<b>S.C. total</b>	392		
<b>S.C. grupos</b>	0		
<b>S.C. intragrupos</b>	392		
<b><math>\alpha</math></b>	2		

<b>Cuadro 9.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA 4</b>				
<b>Origen de la variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>S.C.</b>	<b>M.C.</b>	<b>Razón de varianza</b>
<b>Y-Y entre grupos</b>	1	0	0	0
<b>Y-Y intragrupos</b>	2	392	196	
<b>Y-Y total</b>	3	392		
<b>Ho= HUMANO = ANIMAL</b>				
<b>Ha= HUMANO <math>\neq</math> ANIMAL</b>				
<b>Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante</b>				
<b>En base a distribución F 0.975</b>			<b>Ho=aceptada</b>	<b>38.51</b>

La electroforesis de los amplificados del gen *stx1* obtenidos mediante el ciclo ANA5 de PCR mostró una disminución del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933. Por otra parte el tamaño molecular del gen *stx1* de la cepa 933J parece menor al observado para el resto de las cepas. (Figura 7).

### Figura 7

Resultados de la electroforesis de los amplificados correspondientes al ciclo ANA5



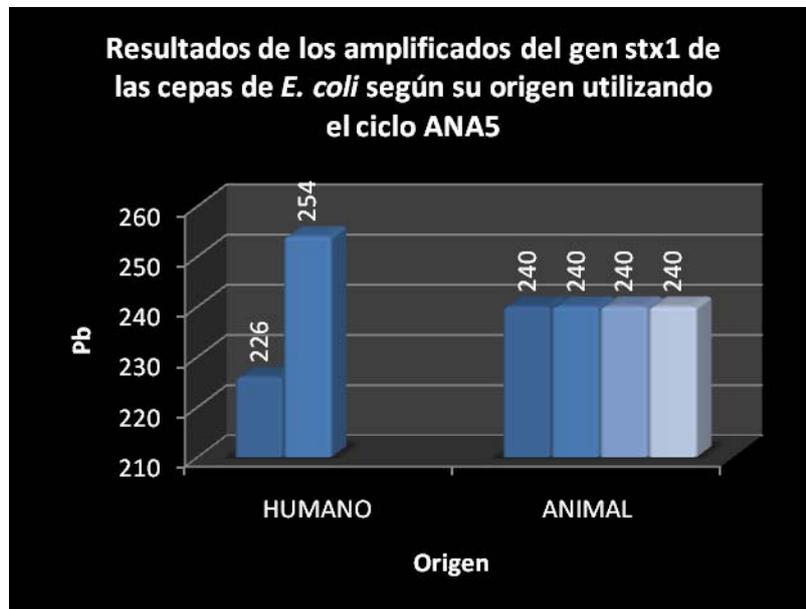
Figura 7. Se observa una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* de las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular de dicho gen para la cepa EDL 933, mientras que en el caso de la cepa 933J el gen *stx1* presenta un tamaño molecular menor con respecto al resto.

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo ANA5 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal fue menor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933 y mayor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa 933J. (Cuadro 10 y Figura 7.1).

<b>Cuadro 10</b>	
<b>Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA5</b>	
<b>Tiempo: 30s</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Tamaño Molecular (pb)</b>
<b>933J</b>	<b>561, 226</b>
<b>EDL933</b>	<b>352, 310, 254</b>
<b>A1</b>	<b>589, 421, 240</b>
<b>CIVB032</b>	<b>561, 407, 240</b>
<b>EE1a</b>	<b>617, 435, 240</b>
<b>EE1c</b>	<b>603, 435, 240</b>

Cuadro 10. Las cepas de origen animal presentan una disminución en el tamaño molecular del gen *stx1* (240pb) con respecto a la cepa EDL933 (254pb) , mientras que presentan un tamaño molecular mayor de dicho gen con respecto a la cepa 933J (226pb)

**Figura 7.1**



Los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) al tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo ANA5, demostraron que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 10.1 y Cuadro 10.1.1)

Cuadro 10.1. ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA5			
Origen	HUMANO	ANIMAL	Column1
	226	240	
	254	240	
		240	
		240	
			total
<b>SUMA</b>	480	960	1440
<b>n</b>	2	4	6
<b>Suma de cuadrados</b>	115592	230400	345992
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	345600		
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	345600		
<b>S.C. total</b>	392		
<b>S.C. grupos</b>	0		
<b>S.C. intragrupos</b>	392		
<b><math>\alpha</math></b>	2		

Cuadro 10.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA5				
Origen de la variación	g.l.	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	1	0	0	0
Y-Y intragrupos	4	392	98	
Y-Y total	5	392		
Ho= HUMANO = ANIMAL				
Ha= HUMANO $\neq$ ANIMAL				
Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante				
En base a distribución F 0.975			Ho=aceptada	12.22

Los resultados de la electroforesis de los amplificadores del gen *stx1* obtenidos mediante el ciclo ANA6 mostraron que el gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal aparenta tener un menor tamaño molecular con respecto al tamaño molecular del mismo gen de la cepa EDL933, mientras que dicho gen correspondiente a la cepa 933J se observa del mismo tamaño molecular que en las cepas de origen animal. (Figura 8). Al utilizar este ciclo no varió el número de bandas de los amplificadores con respecto a los obtenidos con el ciclo STEC2.

### Figura 8

Resultados de la electroforesis de los amplificadores correspondientes al ciclo ANA6



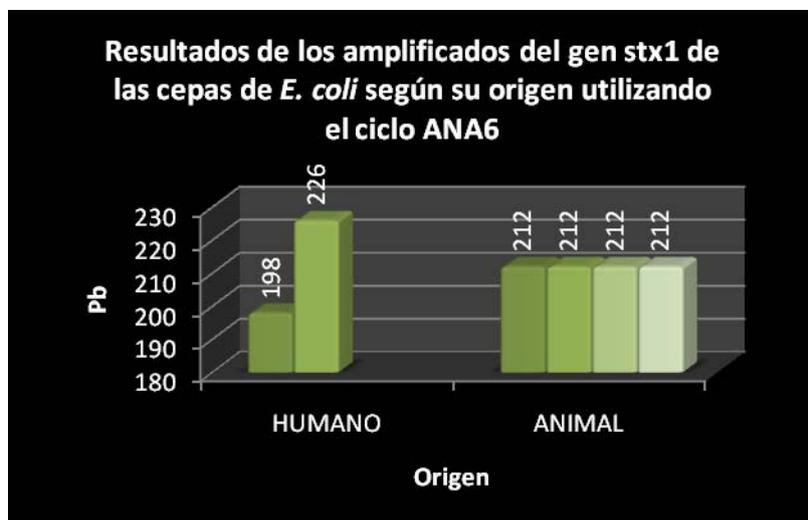
Figura 8. Se observa una disminución en el tamaño molecular de los amplificadores correspondientes al gen *stx1* en los carriles de las cepas de origen animal, con respecto al amplificados del gen *stx1* del carril de EDL933; mientras que el amplificado correspondiente al mismo gen de 933J se aprecia con el mismo tamaño molecular que en las cepas de origen animal.

Al obtener el resultado numérico del tamaño molecular de cada banda correspondiente al gen *stx1* presente en el gel de agarosa correspondiente al ciclo ANA6 de PCR, se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal fue menor que el tamaño molecular del mismo gen correspondiente a la cepa EDL933, pero mayor que el tamaño molecular del gen *stx1* de la cepa 933J. (Cuadro 11 y Figura 8.1).

<b>Cuadro 11</b>	
<b>Resultados de la electroforesis de los amplificadores</b>	
<b>Correspondientes al ciclo ANA6</b>	
<b>Tiempo: 55s</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Tamaño Molecular (pb)</b>
<b>933J</b>	<b>198</b>
<b>EDL933</b>	<b>310, 268, 226</b>
<b>A1</b>	<b>366, 212</b>
<b>CIVB032</b>	<b>366, 212</b>
<b>EE1a</b>	<b>505, 379, 212</b>
<b>EE1c</b>	<b>505, 379, 212</b>

Cuadro 11. El tamaño molecular del gen *stx1* para las cepas de *E. coli* de origen animal (212pb) es menor que el tamaño de dicho gen para la cepa EDL933(226pb), por el contrario el tamaño molecular del gen *stx1* para la cepa 933J (198pb) es menor que el correspondiente para las cepas de origen animal.

Figura 8.1



Los resultados obtenidos al aplicar la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) al tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes al ciclo ANA6, demostraron que no existe una diferencia significativa entre el tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a las cepas de origen animal con respecto al tamaño molecular del mismo gen encontrado en las cepas de origen humano, por lo tanto el tamaño molecular del gen *stx1* es semejante entre todas las cepas comparadas. (Cuadro 11.1 y Cuadro 11.1.1)

Cuadro 11.1. ANOVA GEN <i>stx1</i> Ciclo ANA6			
Origen	HUMANO	ANIMAL	Column1
	198	212	
	226	212	
		212	
		212	
			Total
<b>SUMA</b>	424	848	1272
<b>n</b>	2	4	6
<b>Suma de cuadrados</b>	90280	179776	270056
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	269664		
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	269664		
<b>S.C. total</b>	392		
<b>S.C. grupos</b>	0		
<b>S.C. intragrupos</b>	392		
<b><math>\alpha</math></b>	2		

Cuadro 11.1.1. Tabla de análisis de varianza entre origen ciclo ANA6				
Origen de la variación	g.l.	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	1	0	0	0
Y-Y intragrupos	4	392	98	
Y-Y total	5	392		
Ho= HUMANO = ANIMAL				
Ha= HUMANO $\neq$ ANIMAL				
Por lo tanto el tamaño molecular según el origen es semejante				
En base a distribución F 0.975			Ho=aceptada	12.22

En resumen encontramos que utilizando seis de los siete ciclos diferentes en el termociclador, no se observa una diferencia significativa del tamaño molecular del gen *stx1* entre los amplificadores de las cepas de origen animal y las cepas de origen humano.

Únicamente en el ciclo ANA3 se encontró una diferencia significativa entre el tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* entre las cepas de origen humano y las cepas de origen animal; en este ciclo la temperatura de desnaturalización se disminuyó (90°C), la temperatura de hibridación y el tiempo se mantuvieron iguales (50°C y 45seg respectivamente) con respecto al ciclo STEC2.

Figura 9

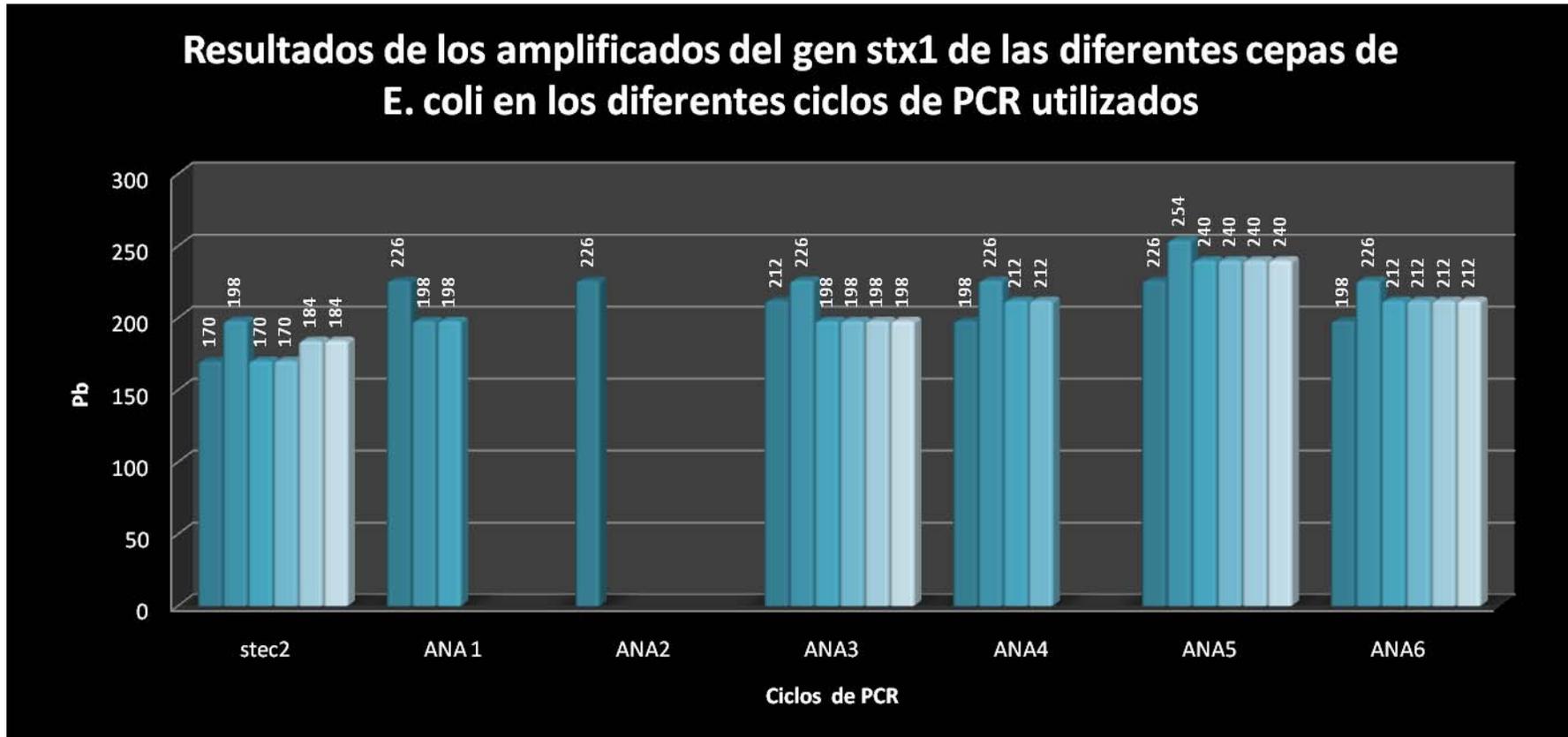


Figura 9 En esta gráfica se muestran los resultados de los amplificadores del gen *stx1* para las distintas cepas utilizando diferentes ciclos de PCR. Ciclo STEC2: 933J (170pb), EDL 933 (198pb), A1 (170pb), CIVB032 (170pb), EE1a (184pb) y EE1c (184pb). Ciclo ANA1: EDL933 (226pb), EE1a(198pb) y EE1c (198pb). Ciclo ANA2: EDL933 (226pb). Ciclo ANA3: 933J (212pb), EDL933 (226pb), A1 (198pb), CIVB032 (198pb), EE1a (198pb) y EE1c (198pb). Ciclo ANA4: 933J (198pb), EDL933 (226pb), EE1a (212pb) y EE1c (212pb). Ciclo ANA5: 933J (226pb), EDL 933 (254pb), A1 (240pb), CIVB032 (240pb), EE1a (240pb) y EE1c (240pb). Ciclo ANA6: 933J (198pb), EDL 933 (226pb), A1 (212pb), CIVB032 (212pb), EE1a (212pb) y EE1c (212pb).

Utilizando el ciclo ANA1 solamente se obtuvo el amplificado del gen *stx1* para las cepas EDL933, EE1a y EE1c. En todos los casos se observó un aumento en el tamaño molecular del gen con respecto al resultado obtenido para la misma cepa al utilizar el ciclo STEC2. (Figura 9).

En el ciclo ANA2 sólo se obtuvo el amplificado del gen *stx1* correspondiente a la cepa EDL933, y se observó un aumento en el tamaño molecular del mismo con respecto a su homólogo utilizando el ciclo STEC2 de PCR. (Figura 9).

Con el ciclo ANA3 se obtuvo como resultado el aumento del tamaño molecular del gen *stx1* correspondiente a cada cepa con respecto al resultado obtenido con STEC2 respectivamente. Se igualó el tamaño molecular entre las cepas de origen canino y porcino. (Figura 9).

Al analizar los datos obtenidos con la utilización de cada ciclo sobre el tamaño molecular del gen *stx1*, observamos que usando el ciclo ANA4 los amplificados del gen *stx1* obtenidos para cada cepa presentaron un incremento en el tamaño molecular. (Figura 9).

Al aplicar el ciclo ANA5 se encontró que el tamaño molecular para el gen *stx1* correspondiente a las diferentes cepas (de origen humano y animal respectivamente), aumentó en todos los casos con respecto a su igual obtenido al utilizar el ciclo STEC2. (Figura 9).

En el ciclo ANA6 se encontró que el tamaño molecular del gen *stx1* para cada una de las cepas se encontró incrementado en comparación con el tamaño molecular del gen obtenido para cada cepa al utilizar el ciclo STEC2. (Figura 9).

El resultado del análisis estadístico (ANOVA) del tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* de todas las cepas utilizadas empleando los diferentes ciclos de PCR demostró que no se produjo una diferencia significativa en el tamaño molecular del gen *stx1* con los diferentes ciclos utilizados. (Cuadro 12 y Cuadro 12.1)

Cuadro 12. ANOVA GEN <i>stx1</i>								
	stec2	ANA 1	ANA2	ANA3	ANA4	ANA5	ANA6	
	170	226	226	212	198	226	198	
	198	198		226	226	254	226	
	170	198		198	212	240	212	
	170			198	212	240	212	
	184			198		240	212	
	184			198		240	212	
								total
<b>SUMA</b>	1077	622	226	1230	848	1440	1272	6715
<b>n</b>	6	3	1	6	4	6	6	32
<b>Suma de cuadrados</b>	194034.8004	129484	51076	252836	180168	345992	270056	1423646.8
<b>Suma de cuadrados de SUMA</b>	1420613.459							
<b>Suma total de cuadrados/n total</b>	1409176.326							
<b>S.C. total</b>	14470.47439							
<b>S.C. grupos</b>	11437.13272							
<b>S.C. intragrupos</b>	3033.341667							
<b><math>\alpha</math></b>	7							

**Cuadro 12.1. Tabla de análisis de varianza entre ciclos**

Origen de la variación	g.l	S.C.	M.C.	Razón de varianza
Y-Y entre grupos	6	11437.13	1906.189	15.71030471
Y-Y intragrupos	25	3033.342	121.3337	
Y-Y total	31	14470.47		
Ho=stec2 =ANA1=ANA2=ANA3=ANA4=ANA5=ANA6				
Ha= stec2≠ANA1≠ANA2≠ANA3≠ANA4≠ANA5≠ANA6				
Por lo tanto el tamaño molecular entre los ciclos utilizados es semejante				
En base a distribución F 0.975		Ho= rechazada		2.97

## Discusión

Según lo publicado por Gelfand (1989) e Innis y Gelfand (1990), si la temperatura de desnaturalización es muy alta, la DNA polimerasa disminuye su efectividad. Por otra parte Mas y col. (2001), afirman que cuando la temperatura de desnaturalización es mayor a 94°C se requiere disminuir el tiempo para no reducir la actividad de la DNA polimerasa; esto puede ser la razón por la que no se logró la amplificación del gen *stx1* de todas las cepas al utilizar los ciclos ANA2 y ANA4. En el caso del ciclo ANA4 la razón por la que el tamaño molecular del gen *stx1* para todas las cepas en las que se logró la amplificación, aumentó con respecto a los resultados obtenidos al utilizar el ciclo STEC2 puede relacionarse con este incremento de la temperatura de desnaturalización.

La disminución de la temperatura de desnaturalización podría ser la causa del incremento del tamaño molecular de los amplificadores del gen *stx1* en todas las cepas empleando el ciclo ANA3, a causa de una separación pobre o defectuosa de las hebras de DNA, lo cual modifica el resto del proceso y origina la presencia de amplificadores inespecíficos. Mientras que en el ciclo ANA1 la disminución de las temperaturas de desnaturalización e hibridación resultó en que no se obtuvieron los amplificadores correspondientes a todas las cepas.

Gelfand (1989) e Innis y Gelfand (1990), afirman que al incrementar la temperatura de hibridación, los primers no se unirán adecuadamente, disminuyendo la utilidad del producto deseado, lo cual puede explicar el aumento del tamaño molecular del gen *stx1* para la cepa EDL933 en comparación con el tamaño molecular de dicho gen obtenido al utilizar el ciclo STEC2, por otra parte, junto la disminución de la efectividad de la DNA polimerasa, puede ser la razón por la que no se logró obtener el resto de los amplificadores.

Por otra parte Sansinforiano y col. (2001) y Parejo y col. (1997), concuerdan en que al incrementar la temperatura de hibridación se reducen las uniones específicas entre el primer y el ADN molde además de que se presenta la incorporación errónea de nucleótidos dando como resultado la formación de productos inespecíficos; este efecto no se observó como resultado al utilizar el ciclo ANA2 ya que se incrementó al mismo tiempo la temperatura de

desnaturalización y no es posible determinar el efecto que tendría incrementar únicamente la temperatura de hibridación.

Innis y Gelfand (1990), también mencionan que si la temperatura de hibridación es baja el primer se unirá inespecíficamente; pudiendo ser esta la razón por la que en el ciclo ANA1 se modificó el tamaño molecular del gen *stx1* de EDL933 con respecto al tamaño molecular obtenido al utilizar al ciclo STEC2, aunque no se evaluó el efecto producido únicamente por la disminución de esta temperatura.

La disminución del tiempo para cada reacción en el ciclo ANA5 produjo en todos los casos, un incremento el tamaño molecular del gen *stx1* en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el ciclo STEC2. No existe mucha bibliografía al respecto, únicamente Sansinforiano y col. (2001), publicaron que en su experimento la disminución del tiempo de desnaturalización provoca una pérdida de rendimiento de las amplificaciones, pero en el presente trabajo los amplificadores se observan similares a los obtenidos con el ciclo STEC2.

En el ciclo ANA6 el incremento en el tiempo para cada reacción provocó el aumento del tamaño molecular del gen *stx1* en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el ciclo STEC2; mientras que en la bibliografía consultada, mientras que al incrementar el tiempo de desnaturalización se obtiene una variación en el patrón de las bandas. En el presente trabajo no se observó ese efecto.

Debido a que el tamaño molecular del amplificado del gen *stx1* presente en las cepas de origen animal y el tamaño molecular del amplificado del gen *stx1* presente en las cepas de origen humano presentó una diferencia significativa se recomienda la secuenciación de los amplificadores del gen *stx1* correspondientes a las cepas de origen canino y porcino utilizadas en el presente trabajo

## Conclusiones

La modificación las constantes físicas de tiempo y temperatura implicadas en los ciclos de PCR, no alteró significativamente el tamaño molecular de gen *stx1* en las cepas de origen animal ni en las cepas de origen humano.

La disminución de la temperatura de desnaturalización (ciclo ANA3) produjo una diferencia significativa en el tamaño molecular del gen *stx1* entre las cepas de origen animal y las cepas de origen humano; por lo tanto, probablemente exista una diferencia estructural en el gen *stx1* perteneciente a las cepas de origen animal en comparación con el mismo gen presente en las cepas de origen humano.

## Bibliografía

- 1) Bibek, R. (2001), *Fundamental Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> (ed.), CRC Press LLC, USA, pp. 347-351.
- 2) Blank, T. E. y col (2002), “Enteropathogenic *Escherichia coli*”, Donnenberg, M. S. (Ed.), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*, Elsevier, USA, pp. 87-93.
- 3) Brooks, F. G., Butel S. J. y Morse S.A. (Ed.) (2005), *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, 18<sup>a</sup>(ed.), El Manual Moderno, México, pp. 243-248.
- 4) Cicutta, M. E., Deza, N., Roibón, W. R., Pereyra, D., Benitez, M. C., Arzú, R. O. y Boehringer, S. I. (2006), “Detección de *Escherichia coli* productor de toxina *Shiga* en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina”, *Rev. Vet.*, Vol. 17, pp. 20-25.
- 5) Dale, J. W. (1998), *Molecular Genetics of Bacteria*, 3<sup>th</sup> (ed.), WILEY, Great Britain, pp. 231-233.
- 6) Daniel, W.W. (1984), *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*, Limusa, México, pp. 193-237.
- 7) De la Rosa, F. M. y Prieto, P. J. (2005), *Microbiología en Ciencias de la Salud. Conceptos y Aplicaciones*, 2<sup>a</sup> (ed.), Elsevier, España, pp. 67-68.
- 8) Eisenstein, B. I. (1987), “Fimbriae”, Neidhardt, F. C., (Ed.), *Escherichia coli y Salmonella typhimurium Cellular and molecular biology*, 1<sup>a</sup> (ed.), Vol. 1, American Society for Microbiology, USA, pp. 84-86.
- 9) Estrada, A. E. (2008), *Detección de cepas de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) a partir de caninos de la zona metropolitana* (Tesis de Licenciatura), FES Cuautitlán – UNAM, Cuautitlán (Estado de México), México.
- 10) Gelfand, D. (Ed.) y Erlich H. (1989), *The Design and Optimization of PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification*, Stockton Press, pp. 7-16.
- 11) Granados, P. R. y Villaverde, P. M. C. (2003), *Microbiología. Bacteriología, Características y Clasificación Bacterianas, Virología, Características y Técnicas Bioquímicas*, Thompson-Paraninfo, España, pp. 112-114.

- 12) Gunzburg, S. T., Chang, B. J., Elliott, S. J., y col (1993), "Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia", *J. Infect. Dis*, Vol. 167, pp. 755-758.
- 13) Hogg, S. (1994), *Essential Microbiology*. 1<sup>st</sup> (ed.), Wiley, England, pp. 333-335.
- 14) Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (1994), *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> (ed.), Williams & Wilkins, USA, pp. 179-180.
- 15) Innis, M., Gelfand, D. (1990), *Optimization of PCRs. In PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, pp. 3-12.
- 16) Kaufman, P.B., Wu, W., Cseke, D.K. y Cseke, L.J. (1995), *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, USA, pp. 243-262.
- 17) Levine, M. M., Ferreccio, C., Prado, V., y col. (1993), "Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago, Chile", *Am. J. Epidemiol*, Vol. 138, pp. 849-869.
- 18) López, A. W., Guevara, D.J. (2002), "Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica", *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*, Vol 3, pp. 38-41.
- 19) Mas, E., Poza J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., Rodellar, C.(2001), "Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)", *Rev AquATIC*, Vol. 15.
- 20) Nataro, J.P., Steiner, T. (2002), "Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*", Donnenberg, M. S. (Ed.), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*, Elsevier, USA, pp. 200-203.
- 21) Nelly, M. N. y Friedman, D.I. (1998), "Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release", *Mol. Microbiol*, Vol. 28, pp. 1255-1267.
- 22) Ohnishi, Terajima, Kurokawa, Nakayama, Murata, Tamura, Ogura, Watanabe and Hayashi (2002), "Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 99, pp. 17043-17048.
- 23) Parejo, J. C., Sansinforiano, M. E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Fernandez, García, J. L., M. y Padilla, J. A. (1997), "Optimización de la técnica

- RAPD en la raza vacuna Blanca Cacereña”, *Archivos de Zootecnia*, Vol. 46, pp. 279-284.
- 24) Paton, A. W. and Paton, J. C. (1997), “Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb 111*, *rfb O 157*”, *North Adelaide, Australia: Molecular Microbiology Unit Women’s and Children’s Hospital*.
  - 25) Rodríguez, A. G. (2002), “Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*”, *Salud Pública de México*, Vol. 44, Suppl 5.
  - 26) Sansinforiano, M. E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Parejo, J. C., Hermoso de Mendoza, M. y Padilla, J. A. (2001), “Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida spp.* y *Cryptococcus spp.*”, *Rev. Iberoam. Micol*, Vol. 18, pp. 65-69.
  - 27) Schmidt, H., Bielaszewska, M. y Karch, H. (1999), “Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage  $\phi$ 3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7”, *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 65, Suppl 9 pp. 3855-3860.
  - 28) Shima, K., Wu Y., Sugimoto, N., Asakura, M., Nishimura, K. and Yamasaki, S. (2006), “Comparison of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay to Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Determine the Effect of Repeated Subculture and Prolonged Storage on RFLP Patterns of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7”, *JCM*, pp. 3963-3968.
  - 29) Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1999), *Introducción a la bioestadística*, Reverté, México, pp. 130-180.
  - 30) Solís, R. (2008), *Evaluación de los efectos causados por Escherichia coli O157:H7 y 2 mutantes en los genes *csD* y *cada* empleando un modelo en conejos* (Tesis de Licenciatura), FES Cuautitlán – UNAM, Cuautitlán (Estado de México), México.
  - 31) Valdivia, A. G. (1995), *Desarrollo de un modelo animal en el conejo para el estudio de verotoxinas (VT) de Escherichia coli* (Tesis de Maestría), UNAM, Distrito Federal, México.
  - 32) Vázquez, Borja C. I. (2008), *Aislamiento y caracterización patogénica de cepas de E. coli productoras de toxina semejante a shiga de cerdo con enfermedad del edema* (Tesis de Licenciatura), FES Cuautitlán – UNAM, Cuautitlán (Estado de México), México.

- 33) Wang, A.M., Doyle, M.V. and Mark, D.F. (1989), "Quantitation of mRNA, by the polymerase chain reaction", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 86, pp. 9717.