



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Título de Tesis:

Detección e Identificación de Microorganismos Patógenos en carne fresca y carne congelada.

Que para obtener el Título de:

Química de Alimentos.

Presenta:

Beatriz Eugenia Solís Castro

México D.F a

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Nombre del Jurado Asignado.

Presidente: María del Carmen Wacher Rodarte

Vocal: Eduardo Bonilla Espinosa

Secretario: Víctor Manuel Luna Pabello

1er Suplente: Gloria Díaz Ruíz

2do Suplente: Aleida Mina Cetina

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 324. Edificio E. Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

Asesor de Tema: María del Carmen Wacher Rodarte.

Supervisor Técnico: Gloria Díaz Ruíz

Sustentante: Beatriz Eugenia Solís Castro

Primero quiero agradecer a las tres personas más importantes en mi vida... a mi mamá Beatriz y a mi papá Antonio por apoyarme, por ayudarme a convertirme en la persona que soy, y por darme todo su amor y cariño, estoy segura que no pude haber tenido mejores papas que ustedes; y a mi hermana Pily, sé que a veces nos peleamos y discutimos pero eres la mejor hermana y no te cambiaría por nada y sé que mi vida sería muy aburrida sin ti.

A la Doctora Carmen y a la Doctora Gloria por aceptarme en el laboratorio y por su ayuda y guía durante todo el proyecto. A Tere por su ayuda, consejos y amistad.

A Alma, Claux y Cynthia por ser mis amigas desde el primer semestre de la carrera, con ustedes pase momentos muy divertidos y sin ustedes la carrera no hubiera sido lo mismo las quiero.

A Nelly, Armando, Soei y Vianik que nunca me despertaban cuando tomaba mi sueño reparador de 5 minutos en la biblioteca o en algún otro lugar, en verdad chicos son geniales les agradezco que cuidaran mi sueño, los quiero.

A Tats, Susa, Alejandro, Blanquita, Jose, Cynthia Puga, Moni, y Gustavo, chicos son los mejores QA's que conozco gracias por estar en mi vida.

A Mau, Ale, Cris, Neus, Mona, Arturo, Rodolfo y Ana Cristina, chicos a ustedes los conocí mejor al final de la carrera pero se convirtieron en personas muy especiales para mí, los quiero.

A todos mis amigos del mejor laboratorio, el 324, Ana, Anita, Adriana, Andrea, Arely, Bianii, Barbara, Carlos, Caro, David, David Zayas, Gris, Girasol, Israel, Karina, Lila, Marisol, Nalle, Paco, Ricardo, Sandra, y Victor (que aunque estuvo poco tiempo, pero estuvo), Yaz, y Zara, gracias por su compañía, amistad, platicas, consejos, y demás no pude haber tenido mejores compañeros de laboratorio, los quiero.

Y a todas las personas que alguna vez compartieron una clase, o un equipo de laboratorio conmigo gracias también ustedes son parte importante de mi vida aunque no lo crean.

Índice

Capítulo	Título	Página
1	Resumen	1
2	Antecedentes	2
2.1	Carne	2
2.1.1	Estructura de la carne	2
2.1.2	Características físicas y químicas de la carne	4
2.1.3	Cambios post – mortem de la carne	7
2.1.4	Fenómenos que conducen a la rigidez cadavérica	7
2.1.5	Resolución del rigor mortis y maduración de la carne.	8
2.1.6	Microbiología de la carne	10
2.1.7	Microorganismos patógenos en la carne	11
2.1.8	Enfermedades transmitidas por alimentos.	12
2.1.9	<i>Salmonella</i> spp	12
2.1.10	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.1.11	<i>Escherichia coli</i>	15
2.1.12	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.1.13	<i>Campylobacter jejuni</i>	17
2.1.14	<i>Yersinia enterocolítica</i>	18
2.1.15	<i>Bucella abortus</i>	19
2.2	Métodos físicos de conservación de alimentos	20
2.2.1	Congelación	20
2.2.2	Presión hidrostática	22

2.3	Detección e identificación de microorganismos patógenos	23
2.4	Desarrollo e impacto de los métodos rápidos de detección de microorganismos patógenos	24
2.5	Problemas en el análisis de alimentos	23
2.6	Métodos moleculares	25
2.6.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.6.2	Preparación de la muestra para PCR	31
2.6.3	Detección de los productos de PCR	31
2.6.4	Condiciones que afectan el éxito del PCR	34
2.6.5	Inhibidores del PCR	35
3	Justificación	37
4	Hipótesis	38
5	Objetivos	39
6	Materiales y Métodos	40
6.1	Cepas	41
6.2	Primera etapa: Detección de patógenos por PCR de cepas puras	41
6.2.1	Extracción de DNA de cepas puras	41
6.2.2	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de cepas puras	43
6.3	Segunda etapa: Desarrollo de un método para la detección de patógenos por PCR en muestras de carne	45
6.3.1	Estandarización del inóculo	45
6.3.2	Preparación de las muestras de carne	46

6.3.3	Sensibilidad del método	46
6.3.4	Inoculación y enriquecimiento de las muestras de carne	47
6.3.5	Extracción de DNA de la carne	47
6.3.5.1	Método enzimático	48
6.3.5.2	Extracción de DNA utilizando un kit comercial (Fast ID)	47
6.4	Tercera etapa: Evaluación de la sobrevivencia de bacterias patógenas en carne congelada	50
6.4.1	Cuantificación de bacterias sobrevivientes	51
6.4.2	Detección de bacterias patógenas por PCR	52
7	Discusión y resultados	53
7.1	Primera Etapa: Detección de patógenos por PCR (cepas puras)	53
7.1.1	Extracción de DNA de cepas puras	53
7.1.2	Reacción de PCR con primers específicos	55
7.2	Segunda etapa: Desarrollo de un método para la detección de patógenos en muestras de carne	58
7.2.1	Estandarización del inóculo	58
7.2.2	Sensibilidad del método	60
7.3	Tercera etapa: Evaluación de la sobrevivencia de patógenos en carne congelada	68
7.3.1	Muestreo	68
7.3.1.1	Cuantificación de bacterias sobrevivientes	68
7.3.1.2	Identificación por PCR de <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i>	72

8	Conclusiones	80
9	Anexo A. Preparación de reactivos	82
10	Bibliografía	85

Índice de Tablas

Número de tabla.	Título	Página
Tabla 1.	Composición de la carne de res y de cerdo	5
Tabla 2.	Contenido de aminoácidos esenciales en las proteínas musculares de la carne de res	5
Tabla 3.	Contenido de minerales en la carne fresca	6
Tabla 4.	Extracción de ácidos nucleicos de alimentos para PCR	32
Tabla 4. (cont).	Extracción de ácidos nucleicos de alimentos para PCR	33
Tabla 5.	Primers utilizados en la reacción de PCR	44
Tabla 6.	Formulación de la tubos de reacción de PCR para la identificación de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	44
Tabla 7.	Condiciones en las cuales se llevo a cabo el muestreo para evaluar la sobrevivencia de las bacterias.	51
Tabla 8.	Datos obtenidos en la lectura con espectrofotómetro de las muestras de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica subsp. Typhimurium</i> .	55
Tabla 9.	Concentraciones de templado de <i>Listeria</i> y <i>Salmonella</i> .	56
Tabla 10.	Estandarización del inóculo de <i>Salmonella enterica subsp. Typhimurium</i> ..	59
Tabla 11.	Estandarización del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> .	59
Tabla 12.	Concentraciones de DNA de muestras de masa y de carne, obtenido mediante la extracción químico enzimática.	60
Tabla 13.	Concentración de DNA con el kit comercial Fast ID de <i>Listeria monocytogenes</i> obtenido para determinar los límites de detección del método.	63

Tabla 14.	Concentración de DNA de <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium.obtenido para determinar los limites de detección del método	64
Tabla 15.	Concentraciones del templado de <i>Listeria monocytogenes</i> en la reacción de PCR para la determinación de los limites de detección	64
Tabla 16.	Concentraciones del templado de <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium en la reacción de PCR para la determinación de los límites de detección	65
Tabla 17	Cuantificación de bacterias sobrevivientes durante el almacenamiento a baja temperatura de carne de res.	69
Tabla 18.	Cuantificación de bacterias en el agar cuenta en placa, a 30°C, condiciones aerobias.	71
Tabla 19.	Concentraciones de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i> obtenido con el kit comercial Fast ID.	74
Tabla 20.	Concentraciones de DNA de <i>Salmonella entérica</i> subsp. Typhimurium.obtenido con el kit comercial Fast ID.	74
Tabla 21.	Concentración de DNA obtenidos de la extracción realizada a las colonias “no típicas” que crecieron en las cajas de agar Oxford y agar XLD.	77

Índice de Figuras.

Número de Figura	Título	Página
Figura 1.	La palabra se refiere a aquellas partes de los animales que se usan como alimento.	2
Figura 2.	Organización del músculo esquelético.	3
Figura 3.	Termociclador Biometra el cual se puede programar para controlar la temperatura y el tiempo de reacción	27
Figura 4.	Reacción en cadena de la polimerasa	28
Figura 5.	Desnaturalización. Se rompen los puentes de hidrógeno dejando a la doble hélice como cadena sencilla.	29
Figura 6.	Alineamiento. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde.	29
Figura 7.	Extensión. A la temperatura óptima de la ADN Polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.	30
Figura 8.	Diagrama general de la metodología utilizada en el estudio.	40
Figura 9.	Gel de Agarosa donde se muestra el DNA extraído de cepas puras de <i>Listeria monocytogenes</i> (carriles 2 a 5) y <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. (carriles 6 a 9).	54
Figura 10.	Gel de agarosa al 2% donde se observan las bandas correspondientes a los productos amplificados de la reacción de PCR de cepas puras de <i>Salmonella Typhimurium</i> de la región ITS (internal transcribed spacer) (carriles 2 y 3) y de <i>Listeria monocytogenes</i> de la región correspondiente al gen de la hemolisina, listeriolisina O (carril 4 y 5.)	57

Figura 11.	A) Caja de Agar XLD con colonias características de <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. B) Caja con agar Oxford con colonias características de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
Figura 12.	Gel de agarosa al 1% donde se observa el DNA extraído mediante el método químico enzimático de masa de maíz nixtamalizado (carril 2 y 3) y carne inoculada con <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. (carril 4) y <i>Listeria monocytogenes</i> (carril 5).	61
Figura 13.	Gel de agarosa al 1% donde se muestran las bandas correspondientes a la extracción de DNA con el Kit Comercial Fast ID para determinar los límites de detección del método.	62
Figura 14.	Gel de agarosa al 2% donde se muestran los productos de PCR de correspondientes a los límites de detección de <i>Salmonella</i> .	66
Figura 15.	Gel de agarosa al 2% donde se muestran los productos de PCR de correspondientes a los límites de detección de <i>Listeria</i> .	67
Figura 16.	Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. durante el almacenamiento en congelación.	69
Figura 17.	A)Caja de agar XLD donde se pueden observar colonias características de <i>Salmonella</i> y colonias diferentes de color amarillo. B)Cajas con agar Oxford donde se observan colonias características de <i>Listeria monocytogenes</i> y colonias diferentes de color amarillo	71
Figura 18.	Cuantificación de bacterias en el agar cuenta en placa, a 30°C, condiciones aerobias.	72
Figura 19.	Gel de agarosa al 1% donde se observa el DNA extraído de muestras de carne inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> (carril	73

	2 a 8) y con <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. (carril 9 a 16).	
Figura 20.	Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas características de la región correspondiente al gen de la hemolisina, listeriolisina O de <i>Listeria monocytogenes</i> identificadas en las muestras de carne utilizadas en el muestreo	76
Figura 21.	Gel de agarosa al 2% donde se muestran las bandas de la región ITS (internal transcribed spacer) características del <i>Salmonella enterica</i> subsp. Typhimurium. identificadas en las muestras de carne utilizadas en el muestreo.	76
Figura 22.	Gel de agarosa al 2%, carril 1 marcador molecular, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo de <i>Salmonella</i> , carril 4 control positivo de <i>Listeria</i> , carril 5 colonia (SG) tomada de la caja de agar XLD con primers de <i>Listeria</i> , carril 6 colonia (SG) tomada de la caja de agar XLD con primers de <i>Salmonella</i> , carril 7 colonia (SC) tomada de la caja de agar XLD con primers de <i>Salmonella</i> , carril 8 colonia (SC) tomada de la caja de agar XLD con primers de <i>Listeria</i> , carril 9 colonia (LG) tomada de la agar Oxford con primers de <i>Salmonella</i> , carril 10 colonia (LG) tomada de la caja de agar Oxford con primers de <i>Listeria</i> .	78

1. Resumen.

Para este estudio se utilizaron cepas de *Salmonella enterica* subespecie Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, ya que estos microorganismos tiene una gran importancia en el área de alimentos porque son de los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Se detectaron los productos característicos de PCR de cepas puras de estas dos bacterias, después, se determinaron los límites máximos y mínimos del método de detección los cuales fueron de 10^1 UFC/g y de 10^4 UFC/g para ambas bacterias y también se determino si era necesario someter las muestras a enriquecimiento o no. Después, se determinaron las concentraciones con los cuales se inocularon las muestras, estos inóculos estaban en el orden de 10^5 UFC/g para *Salmonella enterica* subespecie Typhimurium y de 10^4 UFC/g para *Listeria monocytogenes*. Se probaron dos métodos diferentes de extracción de DNA, el químico-enzimático y un método comercial (Kit Fast ID) y se eligió el método comercial ya que con este se obtenían productos amplificados. Las muestras de carne inoculadas se sometieron a congelación a -14°C y se monitoreo por 4 semanas para detectar a los patógenos presentes mediante una reacción de PCR y se cuantificaron las bacterias sobrevivientes mediante cuentas en placas en agar XLD y agar Oxford; estas cuentas presentaron una disminución durante las 4 semanas de monitoreo, además, se presentaron colonias diferentes a las típicas durante todo el muestreo, estas bacterias se cuantificaron en agar cuenta en placa y también mostraron una disminución. Se realizó una reacción de PCR para las colonias que eran diferentes de la típicas y se encontró que de las 3 colonias tomadas las 3 presentaban bandas características para *Salmonella* y una colonia también presentaba la banda característica para *Listeria monocytogenes*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Carne

Bajo el término de carne muscular (carne en sentido estricto) se incluye, fundamentalmente, el tejido muscular esquelético del animal; que representa alrededor del 40 al 50% del peso corporal total del animal (Prändl, 1992) (Figura 1).



Figura 1. La palabra se refiere a aquellas partes de los animales que se usan como alimento. ¹

2.1.1 Estructura de la carne

El músculo esquelético está constituido por células filamentosas (fibras musculares), que dispuestas paralelamente unas sobre otras dan lugar a los músculos. Las fibras musculares contienen ciertas estructuras fibrilares dispuestas longitudinalmente (miofibrillas) y constituidas a su vez por finas fibras de proteínas

¹Imagen tomada de: Arenas, Lilia et al. Calidad microbiológica de la carne y los productos cárnicos. Agrotécnico No. 25. (2009) 44-46

(filamentos). Las miofibrillas tienen la propiedad de acortarse debido a transformaciones químicas reversibles y con ello hacen posible la contracción muscular. El diámetro de las miofibrillas asciende aproximadamente a $1\mu\text{m}$. Estas estructuras están formadas por unidades estructurales idénticas enlazadas longitudinalmente y denominadas sarcómeros. Cada sarcómero tiene multitud de filamentos de proteínas que son los responsables últimos de la contracción muscular (Prändl, 1992).

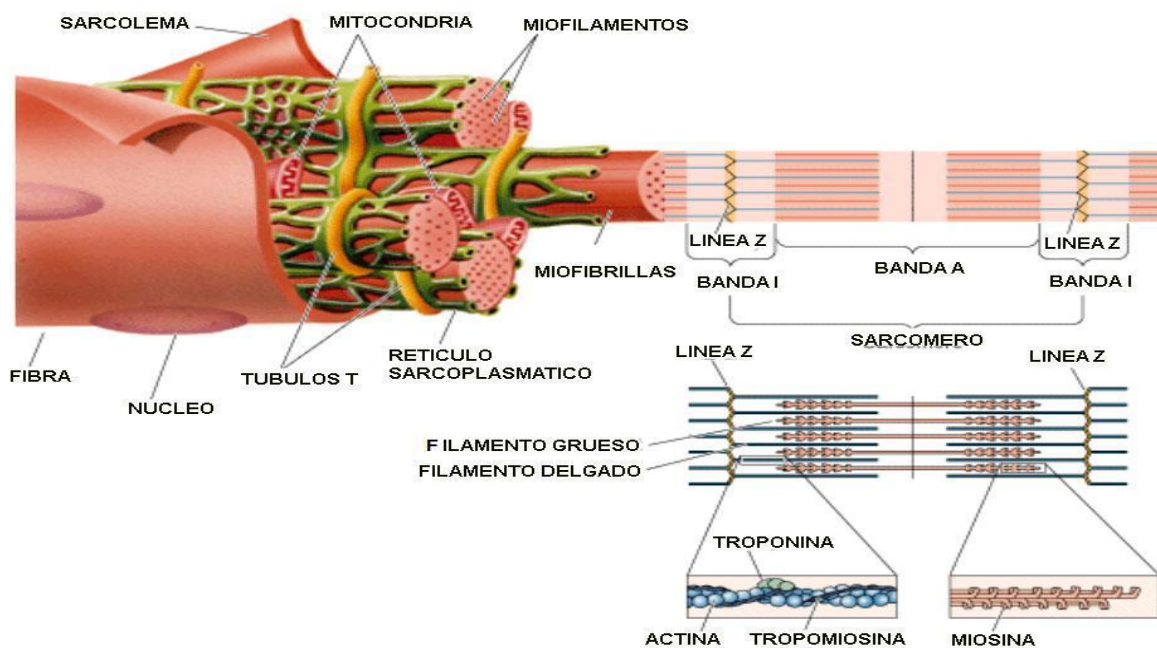


Figura 2. Organización del músculo esquelético².

Las miofibrillas están inmersas en un fluido, el sarcoplasma. La estructura celular está rodeada de una membrana muy delgada, el plasmalema, recubierta de una fina capa de tejido conjuntivo, el sarcolema. Cada célula muscular puede presentar cien o más núcleos, que se hallan inmediatamente debajo de la membrana celular y que poseen una forma elipsoidal, con su eje mayor orientado paralelamente a la fibra. El sarcoplasma contiene mioglobina que confiere a la musculatura estriada su color rojo.

² Imagen tomada de internet: <http://www.bsas.org.uk/downloads/annlproc/Pdf2001/247.pdf>

Las fibras musculares están rodeadas de una fina película de tejido conectivo a la que se denomina endomisio. Se utiliza el término de perimisio para definir la lámina de tejido conectivo que envuelve los grupos de fibras musculares y el epimisio para referirse a la fuerte lámina de tejido conectivo que rodea cada músculo.

Asociados a la estructura del tejido conjuntivo se encuentran los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios. Cada fibra muscular está unida a una terminación nerviosa motriz y mediante estimulación es controlada la contracción muscular.

Las fibras musculares están unidas a finos hilos que al confluir, en los extremos finales de los músculos, forman gruesos cordones o tendones que normalmente se relacionan con las estructuras óseas (Prändl, 1992).

2.1.2 Características físicas y químicas de la carne

Se designa con el nombre de carne fresca a la carne que no ha sido sometida a ningún tratamiento que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas. Los principales parámetros sensoriales que se deben tomar en cuenta para decidir si la carne es fresca o no son: el color que debe ser rojo cereza, no debe tener olores ni sabores extraños, debe tener un aspecto homogéneo sin zonas necróticas ni quemaduras por congelación (Kerry et al., 2002).

El músculo contiene aproximadamente un 75% de agua, del 15 al 20 % de proteínas, 3,5% de sustancias no proteínicas solubles y un porcentaje de grasa que varía del 5 al 40 dependiendo del tipo y raza del animal, de su alimentación y de su edad (Tabla 1). (Charley, 2004).

Tabla 1. Composición de la carne de res y de cerdo³

	Agua	Proteínas	Grasa
Res			
Magra	74 %	20.3 %	4.6 %
Filete	59.4 %	16.6 %	22.8 %
Pulpa	68.7 %	20.2 %	10.6 %
Cerdo			
Magra	71.5 %	20.7 %	7.1 %
Lomo	54.5 %	15.9 %	29.5 %
Pierna	59.5 %	16.6 %	22.5%

Se considera que el valor nutritivo de las proteínas de la carne es superior al de las proteínas vegetales, aunque las diferencias entre ellas no son en realidad muy grandes. Las proteínas de la carne contienen aminoácidos esenciales que hacen que su valor biológico sea mayor (Tabla 2) (Prändl, 1992).

Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales en las proteínas musculares de la carne de res ⁴

Aminoácidos	Contenido en las proteínas musculares (%)	Aminoácidos	Contenido en las proteínas musculares(%)
Histidina	3.3	Fenilalanina	5.0
Isoleucina	6.0	Treonina	5.0
Leucina	3.5	Triptófano	1.4
Lisina	10.0	Valina	5.5
Metionina	3.2		

La cantidad y la estructura de la grasa animal dependen sobre todo de la especie, de la raza y de la alimentación, por lo que puede variar entre un 0.5% y un 25%, o

³ Tabla tomada de: Oskar Prändl. Tecnología e higiene de la carne (Madrid: Acriba 1992) 101- 195

⁴ Tabla tomada de: Oskar Prändl. Tecnología e higiene de la carne (Madrid: Acriba 1992) 101- 195

incluso un contenido mayor. La grasa animal está constituida principalmente por triglicéridos, que son ésteres de ácidos grasos de longitud de cadena media y larga, no todos son esenciales para el ser humano. Dentro de la definición de grasa animal también se encuentran los lípidos estructurales que contribuyen a la formación de ciertas estructuras celulares. La acumulación de la grasa muscular ocurre en el tejido conjuntivo y es visible en forma de veteado (Kerry et al., 2002).

El contenido mineral de la carne se encuentra asociado a compuestos orgánicos. En la carne fresca el contenido de minerales se eleva al 1%, aproximadamente, que corresponde a fosfatos y sulfatos de potasio, además de sodio, magnesio, calcio, cloro, hierro y zinc y también se puede presentar oligoelementos como el flúor, el bromo, yodo, silicio, así como el manganeso y el cobre (Tabla 3) (Prändl, 1992).

Tabla 3. Contenido de minerales en la carne fresca⁵

Minerales	Contenido en 100 g de carne fresca
Potasio	300 – 400 mg
Sodio	40 -80 mg
Calcio	5 – 7 mg
Magnesio	10 – 30 mg
Hierro	10 – 20 mg
Cloro	40 – 80 mg
Azufre	150 – 300 mg
Fosforo	100 mg
Zinc	3 -5 mg

El contenido acuoso de la carne está entre un 70 – 80 %, que en su mayor parte, está en forma de agua libre, donde se hallan disueltos diversos complejos solubles

⁵ Tabla tomada de: Oskar Prändl. Tecnología e higiene de la carne (Madrid: Acriba 1992) 101- 195

y son difundidas algunas sustancias. La cantidad de agua ligada se cifra en aproximadamente un 5 %.

El sabor y aroma de la carne desempeñan un importante papel en la alimentación dado que estimulan la secreción de las glándulas salivales y del jugo gástrico estimulando el apetito. El aroma resulta de la combinación de numerosas sustancias con sabor y aromáticas que individualmente no tendrían este aroma; entre estas sustancias se encuentran: aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres, derivados del benceno, furanos, lactonas, etc.

El aroma depende principalmente del componente graso de cada especie, se debe, en consecuencia, a sustancias aromáticas liposolubles que se forman por calentamiento de los componentes de la grasa (Kerry et al., 2002).

2.1.3 Cambios post – mortem de la carne

Cuando ocurre la muerte del animal, y ante el cese del aporte de oxígeno a través de la sangre, únicamente son posibles los procesos anaerobios. El contenido de oxígeno del músculo es demasiado bajo para poder mantener una fosforilación oxidativa para convertir ADP en ATP, sin un suministro continuo de oxígeno a través de la sangre. La contracción muscular requiere energía almacenada en el ATP, el cual es hidrolizado para dar monofosfato inorgánico y ADP. La disociación del grupo fosfato terminal del ATP es la única forma de liberar la energía acumulada en ese enlace (Prändl, 1992).

2.1.4 Fenómenos que conducen a la rigidez cadavérica

Los fenómenos que acontecen en la musculatura de los animales inmediatamente después del sacrificio se deben, por una parte a los procesos metabólicos

anteriormente descritos y por otra a la falta de suministro sanguíneo y a los consiguientes trastornos metabólicos.

Los procesos bioquímicos del músculo tras el sacrificio están marcados por el proceso de degradación y resíntesis del ATP. La síntesis del ATP se realiza, ante la pérdida del suministro de oxígeno, exclusivamente por vía anaeróbica. A diferencia de lo que sucede en la fosforilación oxidativa, a partir del ácido pirúvico se produce ácido láctico que no puede ser transformado. La acumulación del ácido láctico lleva a una disminución del pH de la carne.

Después del agotamiento de las reservas de glucógeno y de la fosfocreatina se produce una rápida disminución de la concentración de ATP, con lo cual el efecto suavizante desaparece. El músculo pierde su flexibilidad y elasticidad y su extensibilidad se reduce hasta alcanzar solamente en un 5 – 10 % su longitud normal, de esta forma el músculo llega a un estado de rigidez cadavérica.

El periodo de aparición del rigor mortis depende de factores como, la cantidad de glucógeno almacenada, si esta cantidad es alta el rigor mortis se tarda en aparecer, pero llegaría al valor de pH adecuado (aproximadamente 5) (Prändl, 1992).

2.1.5 Resolución del rigor mortis y maduración de la carne.

Después de un periodo de tiempo más o menos variable hay una progresiva “resolución” del rigor mortis cuando los músculos se ablandan. Las miofibrillas se vuelven más fácilmente fragmentables mediante la homogenización controlada del músculo en disoluciones acuosas (índice de fragmentación). Con tiempos de maduración más largos después de la muerte del animal, el índice de fragmentación aumenta y la carne se vuelve más tierna (Warris, 2003).

La maduración de la carne tiene lugar, normalmente, durante el almacenamiento de las canales. Se lleva a cabo a una temperatura de -1 a 2 °C. Sin embargo, para

acelerar este proceso se recomiendan temperaturas más elevadas (mayores a 15°C). (Prändl, 1992)

Los cambios que conducen a la maduración comienzan incluso antes de la aparición del rigor mortis. El colágeno y la elastina no muestran ningún cambio durante la maduración, aunque se llega a producir una cierta solubilización ácida de colágeno a través del ácido láctico derivado de la glicólisis, esto contribuye a que la carne sea más tierna.

La suavidad de la carne está relacionada con la facilidad de extracción de las proteínas miofibrilares. Esto hace suponer que la menor dureza de la carne es debida a la separación de los filamentos de actina del disco Z y a la relajación de las conexiones transversales entre los filamentos de actina y miosina. Se considera que el ablandamiento de la carne interviene también la posibilidad de que la red del retículo sarcoplásmico pueda perder su integridad en torno a las miofibrillas individuales.

La maduración de la carne, además de conducir a la disminución de la dureza y a la elevación del pH, aumenta la capacidad de retención de agua. El incremento del pH y de la capacidad de retención de agua es, fundamentalmente, debido a la degradación de las proteínas para dar péptidos y aminoácidos, y a la liberación de iones de sodio y de calcio por parte del retículo sarcoplásmico. Con todo ello, aumenta el pH y se incrementa la presión osmótica en las células musculares. La liberación de iones se manifiesta también por la elevación de la conductibilidad eléctrica.

Entre los hechos que caracterizan a la maduración de la carne es de destacar el desarrollo del aroma. Los procesos post-mortem acontecidos hasta la aparición del rigor mortis conducen a la degradación del ATP a través del ADP y el AMP hasta la formación de inosín-monofosfato (IMP), fósforo inorgánico y amoniaco. El IMP, al degradarse da lugar a la ribosa, al fosfato y a la hipoxantina. A esta última molécula se le atribuye un efecto favorable sobre las características sensoriales de

la carne. También se producen compuestos que contribuyen al aroma al degradarse proteínas y grasas (Prändl, 1992).

2.1.6 Microbiología de la carne

La microbiología de la carne se ocupa de la presencia, origen e identificación de los microorganismos existentes en la carne. La sistemática de los microorganismos establecida cada vez con mayor detalle en los últimos años permite que la microbiota de la carne pueda ser identificada más minuciosamente. Como también se ha investigado más profundamente el comportamiento fisiológico de la microbiota, hoy día pueden diferenciarse las características metabólicas y con ellas la importancia funcional de los microorganismos de la carne (Nørrung et al., 2008).

El perfil microbiológico de la carne depende del sacrificio, del proceso de empacado, y las condiciones de almacenamiento de la carne.

La tasa microbiana constituye un parámetro fidedigno para calificar la calidad de la carne. Se han dividido a los microorganismos en cuatro grupos:

- A. Microorganismos indeseables que tienen características generadoras de enfermedades, reciben el nombre de patógenos. Las enfermedades producidas por los patógenos de origen animal para el hombre se conocen como zoonosis.
- B. Microorganismos indeseables causantes de alteraciones, no tiene propiedades patógenas pero amenazan con su metabolismo la capacidad de conservación de la materia prima.
- C. Microorganismos tolerables, aquellos que no participan ni en alteraciones de la salud, ni en la descomposición de la materia prima. Se trata de microorganismos que sólo desarrollan una actividad metabólica escasa.

D. Microorganismos beneficiosos que en virtud de su metabolismo influyen ventajosamente sobre las materias primas o productos terminados, contribuyendo con ello a mejorar o asegurar la calidad.

Esta clasificación, basada exclusivamente en criterios funcionales, ocasiona naturalmente superposiciones, al menos entre los grupos b y d.

La presencia de determinados microorganismos permite la detección de contaminación; estos microorganismos reciben el nombre de indicadores de calidad. Los microorganismos que están presentes habitualmente en el contenido intestinal como por ejemplo *Escherichia coli*, indican de contaminación con partículas de heces (Prändl, 1992).

La carne alberga asimismo multitud de especies microbianas. Estas se encuentran principalmente en la superficie corporal, sobre todo en las regiones húmedas de las aberturas naturales, y también son abundantes los microorganismos que se encuentran en el tracto gastrointestinal. La inmensa mayoría de estos microorganismos son anaerobios estrictos (Doyle et al., 2001).

2.1.7 Microorganismos patógenos en la carne

La carne puede contener microorganismos patógenos; estos constituyen un riesgo tanto para el consumidor como para los que manipulan la carne. La detección y exclusión de tales riesgos es solo posible en parte mediante el reconocimiento de los animales que se realiza antes de su sacrificio y con la posterior inspección de las canales (Sofos, 2008).

2.1.8 Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus principales síntomas son diarrea y vómito, pero también se puede presentar choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble etc.

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias. Las bacterias más comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de *E. coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos.

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de estos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Gonzalez Flores et al., 2005).

2.1.9 Salmonella spp

Todos los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos con flagelos peritricos, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Su hábitat natural es el tracto intestinal de los mamíferos y de las aves. Sus principales características metabólicas involucran la fermentación de

glucosa con producción de ácido y la capacidad de producir sulfuro de hidrógeno. El género *Salmonella* actualmente está compuesto de dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* consiste en seis subgrupos, grupo I (*S. enterica* subsp. *enterica*) II, IIA, IIIB, IV, y VI. Solo la *S. enterica* subsp. *enterica* es considerada de relevancia clínica, y esta subespecie incluye al patógeno asociado con la fiebre tifoidea *S. enterica* serovar Typhi. Las otras subespecies y la *Salmonella bongori* están usualmente asociadas con el ambiente o con los reptiles y no es considerada como problema de salud pública.

La invasión celular es un importante factor que influencia la virulencia de los serotipos de *Salmonella*, el fenotipo invasivo está determinado por un gran cluster de genes en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1), la cual está presente en todas las especies invasivas de *Salmonella* (Levin, 2010).

La capacidad de supervivencia del microorganismo, sus escasas exigencias en lo referente al sustrato y su capacidad de multiplicarse fuera de los organismos vivos han hecho fracasar todos los intentos de erradicar la salmonelosis.

La salmonelosis es una infección aguda difundida a nivel mundial, con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con gran importancia en la salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Se presenta principalmente en áreas donde no se ha alcanzado las condiciones de higiene adecuadas. La transmisión puede producirse mutuamente entre los animales y los hombres, pero la forma de transmisión más importante es por medio de los alimentos ya que los brotes causados por estos son los que afectan a centenares de personas y, aunque la salmonelosis puede ser causada por cualquiera de los casi 2500 serotipos que existen hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son la *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium (Gutierrez Cogo et al., 2000).

La incidencia de la Salmonelosis de origen alimentario a partir de la década de los ochenta ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha

alcanzado proporciones epidémicas en varios países. Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella* así como de otros patógenos en los alimentos (Zaidi et al., 2006).

La contaminación con *Salmonella* se puede prevenir evitando la multiplicación de la bacteria en los primeros momentos de la producción o mejorando las condiciones del sacrificio de los animales.

2.1.10 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo móvil, Gram positivo con flagelos peritricos. Tiene la capacidad de crecer a temperaturas de 4°C, se puede encontrar en agua, suelo, animales, y en una gran variedad de alimentos.

Esta bacteria es de interés de salud pública ya que es el agente causante de la listeriosis, una infección que se caracteriza por provocar monocitosis, crecimiento del microorganismo en macrófagos, septicemia, y la formación de abscesos en las vísceras. La infección en mujeres embarazadas puede provocar la invasión del feto y provocar abortos. La forma más común de la listeriosis es la meningitis, la cual se desarrolla principalmente en neonatos, y tiene una tasa de mortalidad que va del 20 al 40%, además del desarrollo de secuelas, como retardo psicomotor.

Entre las siete especies de *Listeria*, solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenos para los humanos y animales. Los factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad del organismo y a la habilidad de entrar, sobrevivir y crecer dentro de las células mamíferas es la hemolisina α (listeriolisina O).

Para el desarrollo de la enfermedad se requieren niveles de contaminación de 10^2 a 10^4 células del microorganismo por gramo de alimento. Sin embargo, la dosis infectiva varía dependiendo de la patogenicidad y virulencia de la cepa involucrada y de los factores de riesgo del hospedero (Levin, 2010).

Los brotes de listeriosis a nivel mundial, tiene como principal vehículo acarreador, alimentos como productos lácteos y cárnicos. En México no se conoce la incidencia de listeriosis.

El control de este microorganismo durante la producción y el almacenamiento de alimentos es un punto crítico en la protección contra la *Listeria*, pero la resistencia del microorganismo al estrés ambiental y a algunas medidas antimicrobianas aplicadas en la producción o en el almacenamiento hacen difícil el control de esta (Callejo et al., 2008).

Una particularidad de la epidemiología de esta bacteria es la distribución desproporcionada de los subtipos que se han aislado de pacientes que presentan listeriosis (Alcázar Montañez et al. 2006).

2.1.11 *Escherichia coli*.

Es un bacilo Gram negativo, es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. *E. coli*, en su hábitat natural, vive en los intestinos de la mayor parte de mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo.

En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. En humanos, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las

mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 h después de la primera comida.

Se distinguen 6 tipos según su poder patógeno: Enteroagregativa (EAEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteropatógena (EPEC), Enterotoxigénica (ETEC), adherente difusa (DAEC). La cepa más peligrosa es una enterohemorrágica O157:H7, que ha causado graves infecciones en personas de países desarrollados. Se puede diferenciar de otras *E. coli* por la producción de una potente toxina que daña el revestimiento de la pared intestinal y causa diarrea con sangre. El tipo EPEC es uno de los agentes causantes de diarreas en países en vías de desarrollo como México, esto se debe en gran medida a que en el ámbito local se desconocen muchos aspectos relevantes acerca de la virulencia y el diagnóstico eficaz de este agente, lo que repercute en el control adecuado de la enfermedad diarreica en niños (Vidal et al., 2007).

La contaminación de los alimentos con esta bacteria se puede prevenir mejorando los procesos de producción de los alimentos (Levin, 2010).

2.1.12 *Staphylococcus aureus*.

Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo y es la especie predominante en los brotes de infección estafilocócica. Esta enfermedad es causada por la producción de enterotoxinas que están presentes en el microorganismo (A, B, C, D y E). La enterotoxina A es la más frecuente. Todas estas enterotoxinas son termoestables y resistentes a las proteasas gastrointestinales como la pepsina, esto explica su habilidad de permanecer activas después de la ingestión. La cantidad de enterotoxina requerida para que aparezcan los síntomas es muy baja aproximadamente de 20 ng a 1 µg, lo cual corresponde aproximadamente a 10^5 UFC / g de alimento (Pelisser et al., 2009).

Las enterotoxinas se dividen en dos grupos. Los miembros del grupo 1 son consideradas toxinas eméticas y se conocen como SEA, SEB, SEC₁, SEC_{bov}, SED, y SEE y son las causantes del 95% de las enfermedades por enterotoxinas de *Staphylococcus*, en humanos. El grupo 2 incluye 15 enterotoxinas encontradas recientemente.

Los síntomas típicos de las infecciones con las enterotoxinas de este microorganismo son autolimitantes e involucran vómito, dolor abdominal y diarrea (Levin, 2010).

2.1.13 *Campylobacter jejuni*:

Es un bacilo gram negativo, móvil es microaerófilo que puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración por varias semanas, pero solo unos pocos días a temperatura ambiente. Es sensible a las temperaturas ambientales, a la desecación, a los ácidos, a los desinfectantes, al oxígeno en dosis excesivas, por lo cual requiere de una atmósfera especial para su crecimiento además de no desarrollarse en alimentos con un bajo pH. Existen 14 especies de *Campylobacter*, pero *C. jejuni* es la que frecuentemente se relaciona con las enfermedades en humanos.

Se encuentra en el intestino de muchos animales domésticos, particularmente en aves como el pollo, donde coloniza el intestino y da como resultado animales saludables que se convierten en hospederos.

Es uno de los principales agentes infecciosos de la campilobacteriosis, que se presenta principalmente en países industrializados. Suele ser auto limitante, pero se pueden presentar complicaciones como artritis, meningitis, neumonía y una forma severa del síndrome de Guillain–Barré que involucra parálisis neuromuscular de las extremidades.

2.1.14 *Yersinia enterocolítica*.

Es un bacilo Gram negativo, móvil que crece en temperaturas menores a 25°C, no forma esporas, es anaerobio facultativo, es móvil por flagelos peritricos, es oxidasa negativo y catalasa negativo, su temperatura ideal de crecimiento esta ente 30 - 37°C, tiene la capacidad de reproducirse a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ y aun pH entre 7 y 8. Se conocen 5 biotipos y hasta 70 serotipos, basados en antígenos O, y su patogenicidad está asociada a los biotipos 1, 2 y 4 y a los serotipos O:3, O:8, y O:9 (Prändl, 1992). Causa la infección llamada yersiniosis se presenta con fiebre, diarrea y dolor abdominal durante 1-3 semanas, en algunos casos se presenta adenitis mesentérica (inflamación de los ganglios del mesenterio) que puede imitar a la apendicitis (Ferri, 2003).

En los Estados Unidos, los cerdos son reservorios comunes de los serotipos O:3 y O:9, en Dinamarca, Bélgica y Suecia, el serotipo O:3 es el predominante en estos animales, pero en los Estados Unidos, se ha detectado con mayor frecuencia el serotipo O:8.

Otra característica relacionada con el crecimiento del microorganismo es que puede alcanzar niveles de infección en cuatro días en la carne de cerdo y también ha sido aislada a partir de carne empacada al vacío, en alimentos congelados cuando éstos han tenido procesos repetidos de congelación y descongelación. También se ha encontrado en la leche y en los productos derivados.

En México, se desconoce la presencia de *Yersinia enterocolítica* en cerdos, así como los biotipos y serotipos que están presentes en el país (Elizalde et al., 2001).

2.1.15 *Brucella abortus*:

Son bacilos inmóviles, gram negativos que de acuerdo con su comportamiento bioquímico y de fagotipificación se clasifican en 6 especies que están asociadas a varios huéspedes principales, *B. abortus* al ganado bovino, *B. melitensis* al caprino, *B. suis* a los porcinos, *B. canis* a los caninos, y *B. neotomae* a roedores salvajes, recientemente, *B. maris* se asocia a mamíferos marinos (Medellin Vega, 2006). Puede sobrevivir en carne fresca durante semanas, y en carne sazónada y curada se mantiene viable al cabo de 150 días.

La brucelosis es una enfermedad de difusión mundial, capaz de transmitirse desde los animales al hombre, pero no a la inversa. La enfermedad también se adquiere tomando leche infectada (Prändl, 1992). También se conoce como fiebre ondulante, puede incapacitar físicamente y puede volverse crónica para producir una invalidez permanente.

Las brucelas sobreviven en ambientes extracelulares e intracelulares. Las relaciones compatibles con los hospederos, incluyendo, periodos de incubación variables, portadores asintómicos y resistencia a los tratamientos, están entre algunos de los problemas más importantes.

A pesar de los esfuerzos que se están haciendo desde hace mucho tiempo para controlar y erradicar la brucelosis, esta infección sigue siendo una zoonosis importante en el mundo entero. Su persistencia se puede atribuir a la diversidad existente en el género *Brucella*; a la gran variedad y a la distribución geográfica de los animales sensibles; y a la supervivencia y a los mecanismos de transporte de un hospedero a otro que presentan estas bacterias (Medellin Vega, 2006).

2.2 Métodos físicos de conservación de alimentos.

El deterioro de los alimentos se puede prevenir aplicando una o más de las siguientes estrategias: inhibición del crecimiento microbiano, destrucción (inactivación irreversible) de células microbianas, o remoción mecánica de los microorganismos de los alimentos.

Los métodos físicos de conservación de alimentos son aquéllos que utilizan tratamientos físicos para inhibir, destruir o remover microorganismos indeseables sin involucrar aditivos antimicrobianos o productos del metabolismo como conservadores.

Los tratamientos físicos más comúnmente usados son: el secado, la congelación, y la refrigeración que solo inhiben el crecimiento microbiano, las células microbianas pueden ser destruidas o inactivadas irreversiblemente por los tratamientos con rayos UV, microondas, radiaciones ionizantes, y con nuevos tratamientos que no utilizan calor como los tratamientos a altas presiones hidrostáticas o con pulsos eléctricos. La remoción de microorganismos se puede llevar a cabo por medio de filtración de alimentos líquidos por membrana (Doyle et al., 2001).

2.2.1 Congelación.

Muchos alimentos se conservan mediante este método, el cual no produce cambios sensoriales notables.

La congelación de alimentos no ocurre a una temperatura definida pero sí en un rango establecido. Dependiendo de la composición del alimento, el agua comienza a congelarse entre -1 a -3 °C. Como un efecto de la congelación la actividad del

agua (A_w) decrece, por lo que en los alimentos congelados solo pueden crecer los microorganismos tolerantes a temperaturas bajas y los xerotolerantes.

Durante la congelación los microorganismos pueden sufrir múltiples daños, los cuales pueden causar su inactivación directamente o en un corto tiempo.

El enfriamiento rápido de alimentos puede causar la muerte inmediata de una porción de las bacterias. Las bacterias Gram negativas específicamente las mesófilas son más susceptibles a daños de membrana por efecto de la congelación. Durante la congelación del agua ocurre un shock osmótico y la formación de cristales intracelulares causa daños mecánicos. La concentración de líquidos celulares cambia el pH y la fuerza iónica (Archer, 2004).

La calidad de los alimentos congelados depende de la calidad de su materia prima antes de la congelación. Aunque algunos microorganismos se eliminan durante la disminución de la temperatura, durante el almacenamiento a la temperatura de congelación se conserva la viabilidad de los sobrevivientes. La congelación conserva la viabilidad de ciertos patógenos como por ejemplo *Salmonella enteritidis* en helado hecho en casa y comercial (Archer, 2004).

Entre los factores más importantes que afectan la congelación es la composición del alimento donde se encuentra el microorganismo. Ciertos compuestos aumentan y otros disminuyen el efecto de la congelación, por ejemplo el glicerol, la sacarosa y las proteínas tienen efecto crioprotector.

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento microbiano. Durante el almacenamiento de la carne la temperatura desciende hasta un rango donde el crecimiento de los microorganismos es mínimo.

Aunque la congelación reduce considerablemente la carga microbiana en alimentos no se puede considerar un proceso de esterilización, los microorganismos sobrevivientes pueden crecer bajo ciertas condiciones durante la descongelación de alimentos congelados. La población puede ser igual o exceder

el nivel que existía antes y durante la congelación. Durante la descongelación se libera del alimento una solución rica en nutrientes, a través de la membrana dañada de las células microbianas y esto favorece el crecimiento microbiano. Por lo tanto, los productos descongelados pueden ser vulnerables a un rápido deterioro microbiano, y volver a congelar los alimentos es una práctica peligrosa (Doyle et al., 2001).

2.2.3 Presión hidrostática.

La alta presión hidrostática tiene el potencial para producir alimentos de alta calidad que sean microbiológicamente seguros con una larga vida de anaquel.

Los microorganismos responden de manera diferente a la alta presión. Las esporas bacterianas son el grupo más resistente y no pueden ser desactivadas solamente por presión hidrostática alta.

La alta presión hidrostática genera daños en la membrana de los microorganismos, estos daños generan una pérdida en la funcionalidad de la membrana celular. También afecta a la morfología de la célula, a las reacciones bioquímicas del microorganismo, así como a los mecanismos genéticos. Todos estos daños generan que la célula del microorganismo se inactive ya sea completa o parcialmente. El que la célula puede recobrase de estos daños dependerá de las condiciones después del tratamiento, por lo que generalmente se adicionan compuestos como el cloruro de sodio para inhibir el crecimiento de las bacterias dañadas (Patterson, 2005).

El tratamiento con alta presión hidrostática se aplica a jugos de frutas para reducir la cantidad de hongos y levaduras que puedan estar presentes así como para eliminar a los patógenos como *E. coli* O157:H7. También se pueden tratar a los vegetales pero debido a su pH alto se mantiene la posibilidad del crecimiento de

organismos formadores de esporas. En los alimentos delicatessen puede estar presente *Listeria monocytogenes* u otros patógenos, por lo que los tratamientos a alta presión son un buen paso final para la conservación de estos. Las ostras también son un ejemplo de alimentos tratados con alta presión para la eliminación de *Vibrio* spp (Patterson, 2005).

2.3 Detección e identificación de microorganismos patógenos.

La detección y la investigación de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituye uno de los principales retos para el sistema de salud pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materia primas empleadas en su elaboración e, incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento.

Tradicionalmente, las infecciones se detectan mediante el cultivo de muestras de alimento que se creen contaminadas y la identificación de las bacterias que crecen en los medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependa de factores ambientales o genéticos. Por otro lado, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPCN), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Además, la obtención de resultados puede tomar días incluso semanas.

Por esta razón es necesario emplear métodos más rápidos y con más sensibilidad, como los métodos moleculares, para detectar a los microorganismo patógenos (Doyle et al., 2001).

2.4 Desarrollo e impacto de los métodos rápidos de detección de microorganismos patógenos.

En la actualidad el análisis de alimentos para detectar microorganismos patógenos son rutinarios, pero la mayoría de estos análisis se basan en métodos dependientes de cultivo, crecimiento y conteo de células bacterianas viables. Sin embargo, el avance de la biotecnología ha hecho grandes cambios en los métodos de detección, desarrollando ensayos que sean específicos, rápidos y algunas veces más sensibles que los métodos convencionales. Estos ensayos son llamados “métodos rápidos”.

Sin embargo, es importante conocer el impacto de estos métodos rápidos, los continuos problemas en la detección de patógenos en los alimentos, las limitaciones, y la importancia de validar estos métodos antes de su aplicación (Doyle et al., 2001).

2.5 Problemas en el análisis de alimentos.

El análisis microbiológico en alimentos, especialmente para especies particulares de patógenos, presenta problemas importantes prácticamente en todos los métodos de utilizados para el análisis. Esto puede ser causado, por el hecho de que las bacterias no están distribuidas uniformemente, por la heterogeneidad en los componentes, por la forma física y por la viscosidad que los alimentos presentan. Todo esto no permite un análisis reproducible o un aislamiento consistente de los microorganismos patógenos.

En suma a los problemas antes mencionados, el análisis se complica por la presencia de microbiota nativa. Esta microbiota no posee riesgos de salud significativos, pero su presencia en ocasiones interfiere con el aislamiento selectivo y la identificación de ciertos patógenos, los cuales se encuentran en

niveles más bajos. Estas interferencias se convierten en problemas críticos cuando los alimentos se someten a los análisis de detección de patógenos como *Shigella*, y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Otro problema que se presenta es el daño que provocan los procesos o tratamientos usados en la fabricación de alimentos, como el calor, el frío, el secado, la congelación, los aditivos y conservadores, que causan un daño letal en las células bacterianas. Estas células dañadas son sensibles a muchos compuestos o antibióticos usados en los medios de enriquecimiento selectivo, y esto puede causar que otras células presentes en la muestra crezcan en mayor número que las células del patógeno.

Para superar todos estos problemas, los métodos convencionales de identificación tienen que ser constantemente modificados o adaptados a cada especie de bacteria a identificar. La modificación más efectiva a través de los años es el enriquecimiento de la muestra, para aumentar la detección de especies específicas de patógenos. Este proceso usualmente comienza con el preenriquecimiento de la muestra en medios no selectivos para reparar las células dañadas, después sigue el paso de enriquecimiento, donde se inoculan alícuotas del medio preenriquecido a medios de enriquecimiento selectivo para el patógeno de interés, en estos medios la microbiota nativa se inhibe y permite el crecimiento del patógeno.

Como resultado a todos estos pasos previos, el análisis con métodos convencionales se lleva a cabo en un gran período de tiempo, por lo que el realizar ensayos rápidos para asegurar la calidad del alimento se convierte en un problema (Doyle et al., 2001).

2.6 Métodos moleculares

Antes de 1980 y la llegada del PCR, la identificación de microorganismos patógenos se llevaba a cabo mediante enriquecimiento e aislamiento de los microorganismos de muestras clínicas y de alimentos, para después llevar a cabo pruebas bioquímicas o inmunológicas para confirmar la identidad del microorganismo (Díaz Ruíz et al., 2003).

En los años recientes los métodos moleculares han cambiado la perspectiva sobre la diversidad microbiana y han permitido describir y monitorear distintos microorganismos en diversos ambientes.

Con estos métodos ha sido posible determinar la estructura de comunidades microbianas, ya que se usan métodos que no dependen de cultivos microbianos. También estos métodos nos permiten saber si los microorganismos identificados están activos.

Si los microorganismos que se quiere identificar se encuentran en alimentos muy complejos, se hace estudios *in situ* para evitar problemas al momento de extraer los microorganismos.

Debe mencionarse que dentro de las técnicas de la biología molecular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es por excelencia de las más utilizadas.

2.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR es un método de síntesis de ADN *in vitro* con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos de tiempos y

temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable (Figura 4).

Debido a estos ciclos el número de pasos es altamente repetitivo por lo que se han desarrollado máquinas denominadas termocicladores para controlar los cambios de temperatura y los tiempos (Figura 3).

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo (Figura 5), para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone



Figura 3. Termociclador Biometra el cual se puede programar para controlar la temperatura y el tiempo de reacción

las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs (Figura 6). Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, la cual generalmente oscila entre 50 y 60°C.

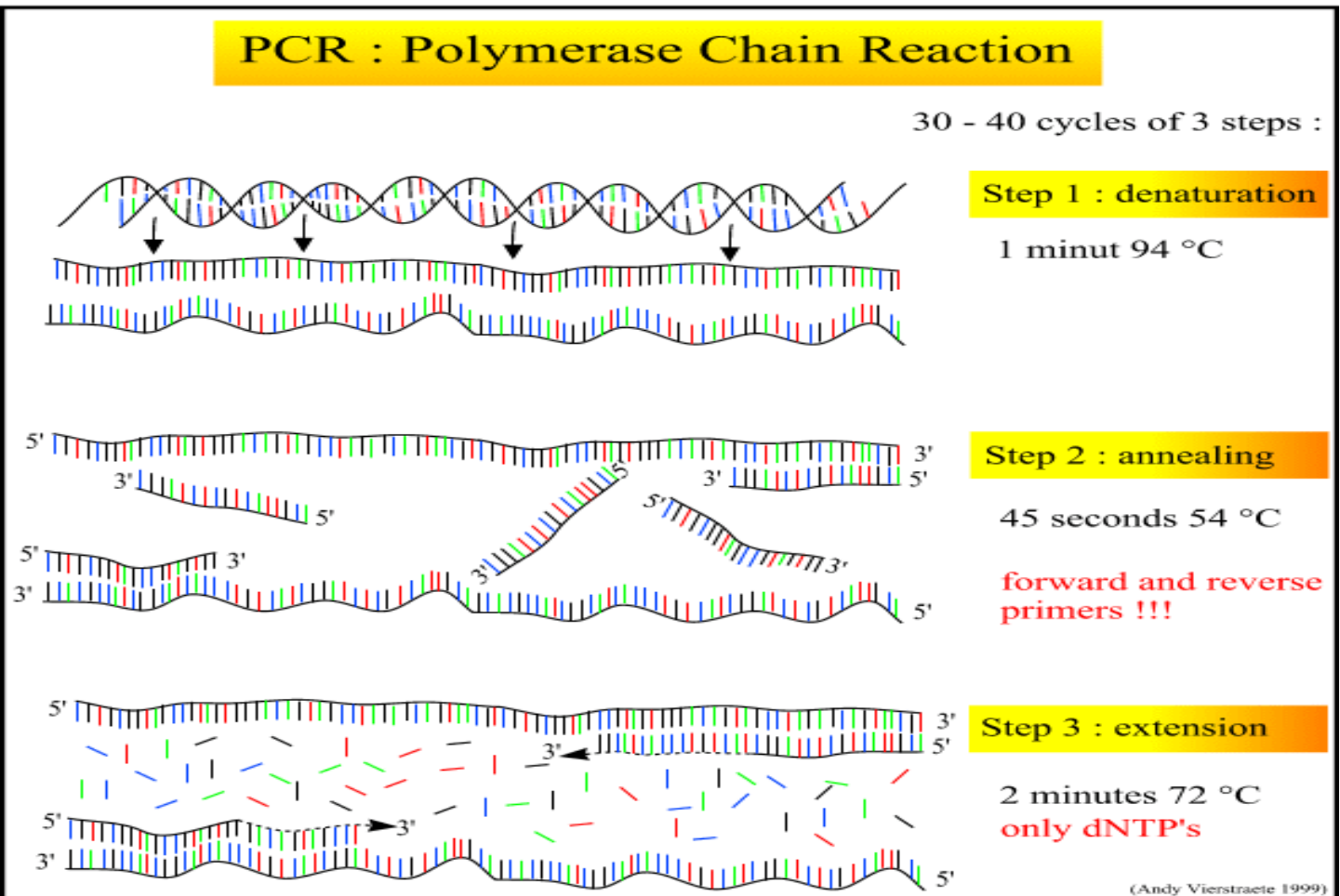


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁶

⁶ <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Figura 7).

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultra pura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 µl), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable.

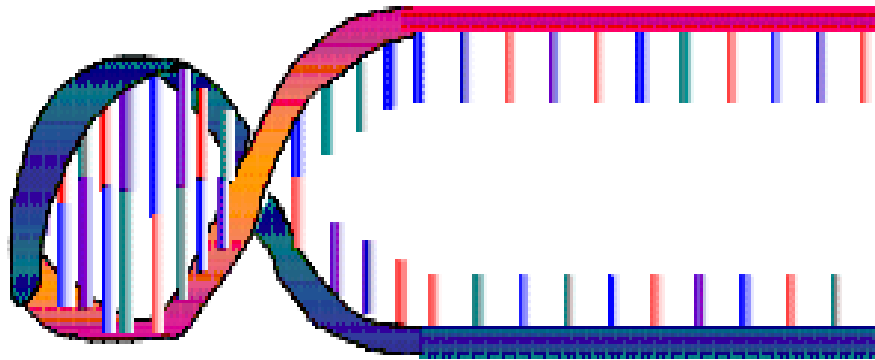


Figura 5. Desnaturalización. Se rompen los puentes de hidrogeno dejando a la doble hélice como cadena sencilla.⁷

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas. Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas.

⁷Imagen tomada: Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Hugo A. Barrera Saldaña. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL Vol. VII No. 3 (2004) 323- 325

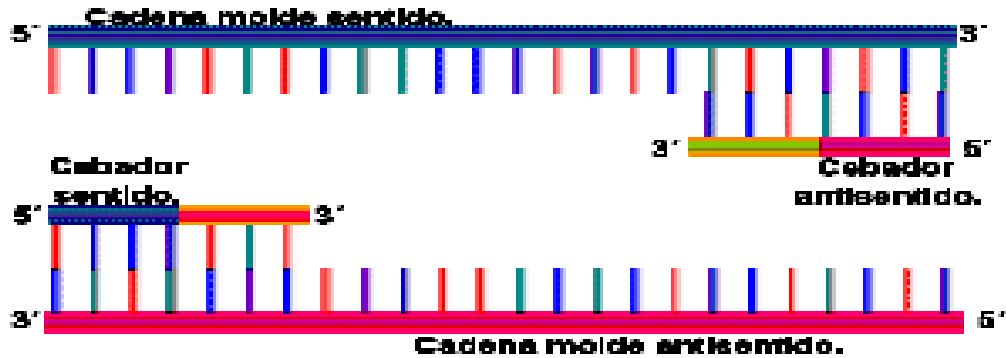


Figura 6. Alineamiento. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde.⁸

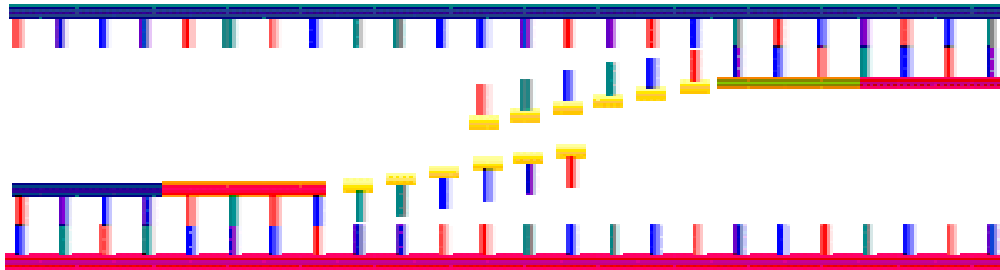


Figura 7. Extensión. A la temperatura óptima de la ADN Polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.⁹

En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, y 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias de ésta. Pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente.

⁸Imagen tomada: Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Hugo A. Barrera Saldaña. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL Vol. VII No. 3 (2004) 323- 325

⁹Imagen tomada: Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Hugo A. Barrera Saldaña. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL Vol. VII No. 3 (2004) 323- 325

2.6.2 Preparación de la muestra para PCR.

Para elegir el cómo preparar la muestra correctamente, primero se debe conocer que patógeno contamina el alimento, si se encuentra en niveles altos o si se será necesario para amplificar la bacteria hacer un enriquecimiento a la muestra. Por ejemplo; células de *Listeria monocytogenes* se pueden encontrar en un bajo número en una muestra de carne y aún así causar una grave enfermedad, pero sería imposible recuperar las células necesarias para hacer una reacción de PCR. Un cultivo enriquecido puede aumentar el número de células bacterianas y el PCR puede detectarlas más rápidamente que un método estándar bacteriológico (Maurer, 2006). Una vez colectadas las células del patógeno el templado para la reacción del PCR ya sea DNA o RNA debe ser extraído. El primer paso en la extracción del templado de un patógeno requiere lisis (ruptura) de las células para liberar los ácidos nucleicos (DNA o RNA). Organismos específicos pueden requerir protocolos específicos para una eficiente extracción del templado; ya que algunas veces esto depende de la membrana celular de la bacteria. Las bacterias Gram negativas tienen una membrana celular delgada, por lo cual el calor o los detergentes pueden lisar las células. Muchos protocolos reportados en publicaciones recientes para extracción de templado de *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* usan estas técnicas para lisis de las células (tabla 4.)

2.6.3 Detección de los productos de PCR.

La detección de los productos de PCR puede ser realizada de varias formas. La más utilizada es la electroforesis. Después de la reacción de PCR la muestra se carga en un gel de agarosa y el fragmento de DNA, si esta presente en la muestra, es separada por electroforesis basada en el tamaño. Los marcadores de peso molecular se incluyen en el gel para estimar el tamaño del producto. El gel de agarosa y el buffer contiene bromuro de etidio el cual se enlaza a la doble cadena y fluoresce por acción de la luz UV (Maurer, 2006).

Tabla 4. Extracción de ácidos nucleicos muestras de alimentos para PCR¹⁰.

Categorías de alimentos	Muestras	Método para concentrar al patógeno	Extracción de DNA (RNA)	Patógeno
Lácteos Inhibidores del PCR: grasa, proteínas, calcio, quelantes, células muertas, niveles bajos de patógenos, otras bacterias	Leche desnatada, pasteurizada, seca, queso suave y fuerte.	Centrifugación diferencial o sin concentrar al patógeno.	Extracción con solventes o extracción con isotiocianato de guanidina	<i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Campylobacter</i>
	Leche fresca	Enriquecimiento y centrifugación.	Kit comercial	<i>Salmonella</i>
	Queso suave	Ninguno	Lisis con detergentes (Yoduro de sodio)	<i>Listeria</i>
Carne y pollo Inhibidores de PCR: grasa, proteínas colágeno, sangre, bajos niveles de bacterias	Pollo y carnes rojas	Enriquecimiento y centrifugación	Kit comercial	<i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i>
	Homogenizados de piel de pollo, piernas completas de pollo, salchichas de pollo, pierna de pavo, carne picada.	Centrifugación	Extracción con detergentes e isotiocianato de guanidina.	<i>Campylobacter</i>
	Pollo completo fresco	Enriquecimiento y centrifugación.	Células lisadas por calor	<i>Campylobacter</i>
	Musculo de pollo y pavo, órganos internos y carcasas frescas	Enriquecimiento.	Calor, lisis alcalina y kit comercial	<i>Salmonella</i>
	Jamón	Separación inmuno-magnética	Extracción con detergente y lisozima.	<i>Listeria</i>
	Carne de puerco picada, y pierna de puerco fresca	Enriquecimiento y centrifugación	Buffer comercial de extracción y calor	<i>Yersinia</i>

¹⁰ Tabla tomada de: John Maurer. PCR Methods in foods. (EUA: Springer 2006) 43- 45

Tabla 4. Extracción ácidos nucleicos de muestras de alimentos para PCR. (cont.)¹¹

Categorías de Muestras alimentos	Muestras	Método para concentrar al patógeno	Extracción de DNA (RNA)	de Patógeno
Carne y pollo	Salchichas	Homogenización del alimento y después filtración y centrifugación	Kits comerciales que incrementan los niveles de Mg ²⁺ en las muestras	<i>Clostridium</i>
	Productos del mar Inhibidores de PCR: compuestos fenólicos, aldehídos, proteínas y grasas, bajos niveles de bacterias	Salmón ahumado	Homogenización	Extracción con detergentes y Tween 20, los inhibidores de PCR se remueven por extracción con solventes o columna de purificación
	Camarón congelado, budín de pescado, arenques salados	Enriquecimiento	Extracción con calor y detergente	<i>Listeria</i>
	Mariscos y ostras	Homogenización del alimento y centrifugación a alta velocidad	Tiocianato de guanidina y purificación con sílica	<i>Hepatitis A</i> <i>Virus de Norwalk</i>
	Ostras frescas	Homogenización y después centrifugación	Kit comercial	<i>Norovirus</i>
Frutas y verduras Inhibidores de PCR: quelantes Y pocas bacterias	Frambuesas	Columna de filtración y centrifugación	Kit comercial	<i>Protozoa</i>
	Lechuga	Homogenización centrifugación y precipitación con polietilenglicol	Kit comercial	<i>Hepatitis A</i> <i>Virus de Norwalk</i>

¹¹ Tabla tomada de: John Maurer. PCR Methods in foods. (EUA: Springer 2006) 43- 45

Los métodos moleculares han permitido la detección de patógenos asociados a la carne y sus productos; gracias a estos se ha podido detectar a *E. coli* O157:H7 en carne molida, hamburguesas congeladas (Marzocca et al., 2006), carne de puerco, pavo y pollo (Suo et al. 2010) *Staphylococcus aureus* en salchichas y salami (Pelisser et al. 2009), *Yersinia enterocolítica* en carne de puerco, carne de res y salchichas (Lambertz et al. 2008), diferentes serovariedades de *Salmonella* en pollo congelado (Moussa et al. 2010), carne molida (Trkov et al., 1999), pavo y carne de puerco (Suo et al. 2010), *Campylobacter jejuni* en pollo, chuletas, salchichas fermentadas, pechuga de pollo, carne molida (Bohaychuk et al., 2005) y a *Listeria monocytogenes* en carne de res, salchichas, albóndigas, hamburguesas, (Ingianni et al., 2007), carne de puerco, pollo, (Suo et al., 2010) y nuggets de pollo (Rodrigues et al., 2002).

2.6.4 Condiciones que afectan el éxito de la PCR.

El propósito de la PCR es incrementar la concentración de un fragmento específico de DNA de un organismo. La polimerasa incrementa exponencialmente la concentración de DNA en la muestra a causa de los ciclos de temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción. El DNA sintetizado inicialmente sirve como templado para los siguientes ciclos. Sin embargo, si las condiciones no son las óptimas, la polimerasa no puede sintetizar el DNA suficiente para que la reacción sea detectada como positiva; cuando esto sucede se dice que es un "falso-negativo". Los falsos-negativos pueden ser provocados por muchas causas. Usar los primers incorrectos, la composición del buffer, la concentración del magnesio (Mg^{2+}), la concentración de los desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTP's), la temperatura de alineación equivocada y un templado erróneo pueden causar falsos positivos y falsos negativos en la reacción. Siempre se deben incluir dos controles negativos: el DNA de un organismo que no posea la región a amplificar y un control sin templado de DNA. Esto puede ayudar a determinar la especificidad de la reacción y si es que existe una contaminación en

las muestras. También se debe incluir un control positivo con DNA de un organismo el cual siempre sea amplificado con la reacción. Estos controles pueden ayudar a identificar el problema cuando la reacción es inhibida. Para cada reacción de PCR se debe determinar la concentración ideal de Mg^{2+} , la especificidad de los primers, el buffer y las condiciones de temperatura. La concentración del templado también influye en el resultado de la reacción (Maurer, 2006).

2.6.5 Inhibidores del PCR.

La reacción del PCR puede ser inhibida cuando ciertas sustancias se unen o degradan un componente de la reacción y evitan que este participe en la reacción. Estas sustancias son llamados “inhibidores del PCR” e incluyen a los quelantes del Mg^{2+} , a las sustancias que se unen o degradan a la polimerasa o al templado de DNA, los ácidos húmicos, urea, el grupo hemo presente en la sangre, sales, entre otros. Los medios selectivos o de enriquecimiento pueden contener sustancias que son inhibidores de la reacción por lo que es importante lavar las células que se recuperaron. Algunos de estos inhibidores, presentan una solubilidad similar al del DNA por lo que no pueden ser eliminados durante los protocolos más usados de extracción y permanecen como contaminantes en el extracto de DNA. (Moreira, 1998)

Cuando se aíslan bacterias o DNA de un alimento, la gran variedad de componentes en la matriz complican la preparación de la muestra, además de promover la inhibición de la reacción. Estos inhibidores presentes en el alimento pueden tener diferentes efectos sobre la reacción de PCR, pero en general, se presentan más dificultades para detectar los niveles bajos de células bacterianas (Davalieva et al. 2010). Un buen protocolo de preparación de muestra se debe concentrar en recuperar al patógeno retirando los inhibidores que puedan estar presentes en el alimento. Algunos de estos métodos son la purificación con

resinas de intercambio iónico, la extracción con sílica entre otros pero estos suelen aumentar el costo del protocolo. En la actualidad existen una gran variedad de kits comerciales con los cuales se extrae el DNA fácilmente y con los cuales la presencia de inhibidores en el extracto final es mínima.

Se pueden utilizar algunos aditivos en la reacción que ayudan a que estos inhibidores no tengan efecto durante la reacción algunos de ellos son, el Tween 20 que estabiliza a la Taq, además, si quedaron trazas de SDS en el extracto este las neutraliza, el DMSO que disminuye la formación de estructuras secundarias en la hebra molde de DNA y ayuda en la amplificación de las zonas ricas en GC, y la albumina que funciona como captadora de iones y otros inhibidores (Maurer, 2006).

3. Justificación.

La carne es uno de los principales productos de consumo humano y debido a la importancia de ésta en la transmisión de enfermedades es necesario buscar métodos efectivos de conservación, así como de detección. Esto permitirá estudiar los efectos de los métodos en la eliminación de los microorganismos patógenos.

Este estudio forma parte de un proyecto más grande en el cual se evalúan los cambios que ocurren durante la congelación de la carne para utilizarlos como control.

4. Hipótesis.

Ya que la congelación no es un método para eliminar microorganismos, se observará una reducción en las concentraciones de *Salmonella* y de *Listeria*, pero las bacterias sobrevivientes permanecerán durante el almacenamiento.

5. Objetivos.

Determinar el efecto de la congelación de la carne fresca en la sobrevivencia de *Salmonella entérica* subespecie Typhimurium y de *Listeria monocytogenes*.

5.1 Objetivos particulares

1. Desarrollar un método de identificación para *Salmonella entérica* subespecie Typhimurium y de *Listeria monocytogenes*. presentes en la carne de res.
2. Determinar el efecto de la congelación y del almacenamiento en congelación en la sobrevivencia de cepas de *Listeria monocytogenes* y de *Salmonella*, mediante estudios de reto.
3. Determinar el efecto de la congelación y del almacenamiento en congelación en la presencia de cepas *Salmonella entérica* subespecie Typhimurium y de *Listeria monocytogenes*., mediante estudios de reto, usando la PCR.

6. Materiales y Métodos.

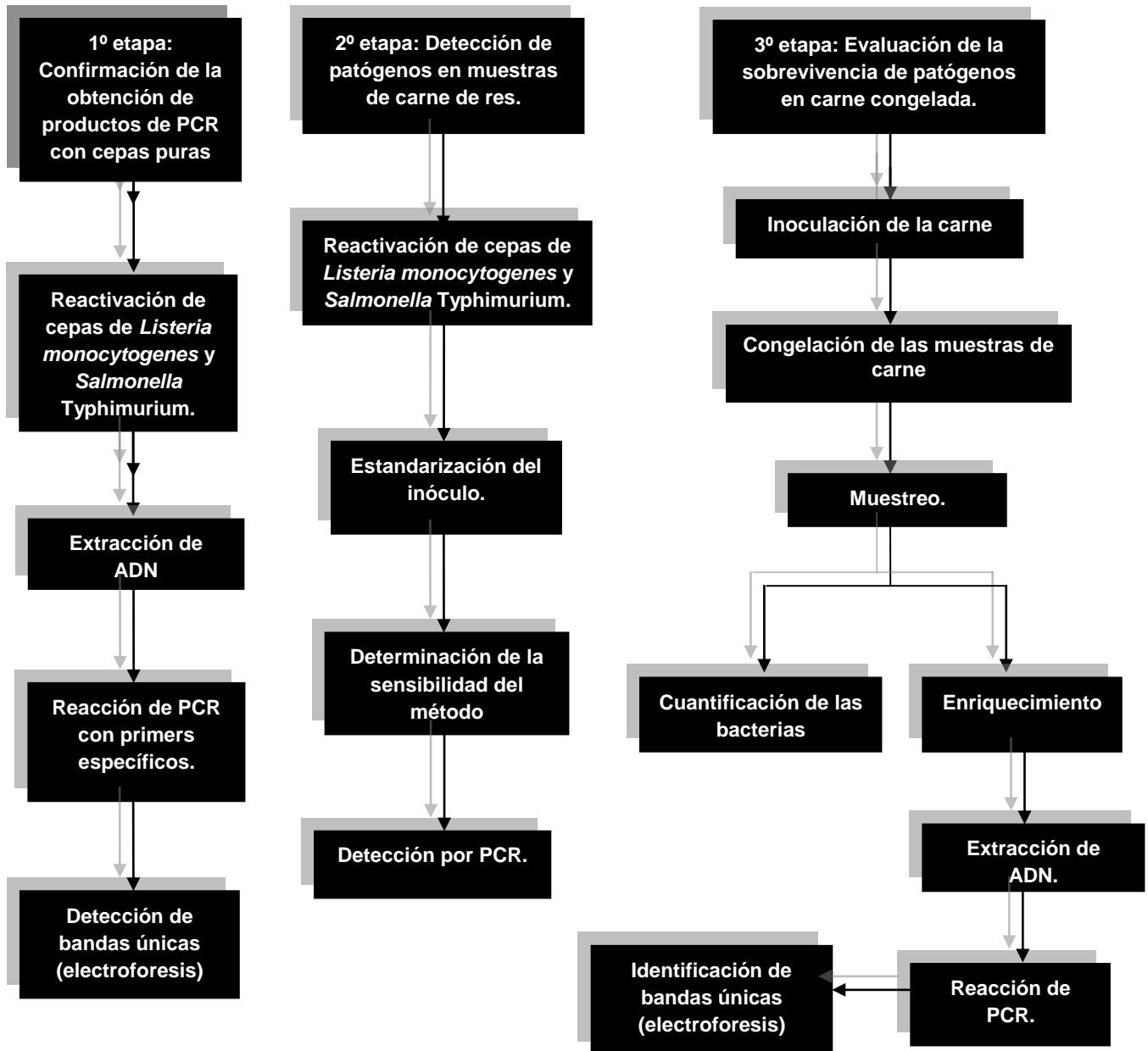


Figura 8. Diagrama general de la metodología utilizada en el estudio.

Antes de realizar la detección por PCR de las dos bacterias se realizaron experimentos para confirmar que se obtuvieran los productos de PCR específicos de cada bacteria. Después se montó una técnica para extraer DNA de calidad para realizar la reacción de PCR. Se evaluó la sobrevivencia de las bacterias mediante el método tradicional y se realizó la detección por PCR a partir de medios de enriquecimientos.

6.1 Cepas.

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó una cepa de *Salmonella* Typhimurium y una cepa de *Listeria monocytogenes* pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química. Las bacterias se encontraban conservadas en glicerol y congeladas a -63°C . Para la reactivación de las cepas, se inocularon 20 μL del cultivo en 5 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI; BD Sparks MO. Estados Unidos) y se incubaron durante 18 horas 37°C ; después se tomaron 50 μL del cultivo activado de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y 80 μL del cultivo activado de *Listeria monocytogenes*, se inocularon en 4.5 mL de caldo BHI y se incubaron por 8 horas a 37°C .

6.2 Primera etapa: Detección de patógenos por PCR de cepas puras.

6.2.1 Extracción de DNA de cepas puras.

Se extrajo DNA de cepas puras mediante el método que se describe a continuación.

Se transfirieron 1.5 mL de los cultivos de *Salmonella* y de *Listeria* preparados como se indica en la sección anterior, se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron, por segunda vez 1.5 mL de

los cultivos, se centrifugaron, en las condiciones descritas. Se descartó el sobrenadante y se continuó el procedimiento con el pellet obtenido. El pellet obtenido se lavó con solución salina al 0.1%, se agitó en vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. El pellet lavado se resuspendió en 500 μ L buffer TES (Tris 0.05 M, EDTA 0.005 M, NaCl 0.05 M).

Se adicionaron 20 μ L de lisozima (20 mg/mL) (Sigma Aldrich), para lisar la célula y se incubó en thermomix a 37°C de 15 a 60 minutos; a partir de los primeros 15 minutos se fueron retiraron los microtubos que presentaron viscosidad el tiempo no sobrepaso los 60 minutos.

Se agregaron 8 μ L de pronasa (20 mg/mL) (Sigma Aldrich) para degradar proteínas. La pronasa es una proteasa no específica, la cual tiene actividad proteolítica tanto para proteínas nativas como para proteínas desnaturalizadas, y se agregaron 8 μ L de RNAasa (Sigma Aldrich) (20 mg/mL) para eliminar el RNA, y se incubó a 65°C por 1 hora.

Se adicionaron 120 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % incubando los microtubos a 65°C por 10 minutos. Los tubos se enfriaron, para después adicionar 600 μ L de la mezcla de fenol-cloroformo en una proporción 24:24 (Sigma- Aldrich), se agitaron vigorosamente para formar una emulsión blanca y después se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos para separar la mezcla en 2 fases. Se retiro el mayor volumen posible (aprox 500 μ L) de la fase acuosa (fase superior) y se colocó en un microtubo limpio (los pasos donde se agrega fenol-cloroformo se repitieron 2 veces).

Se agregaron 500 μ L de etanol almacenado en congelación (-4°C) con lo cual se favoreció la precipitación del DNA, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Los tubos se dejaron invertidos toda la noche a temperatura ambiente para que se evaporara el etanol. Se resuspendió el pellet en 50 μ L de agua destilada estéril y se incubó a 55°C por 1 hora. Para verificar la integridad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, la cual

se realizó a 90 volts por 30 minutos y se tiñó en una solución de bromuro de etidio al 2%. El gel se digitalizó con un equipo Kodak image station.

Se cuantificó el DNA de las muestras espectrofotométricamente. Se midió la absorbancia del DNA a 260 nm, y la absorbancia 280 nm para medir la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Se tomaron 15 µL de las muestras de DNA y se colocaron en una celda para medir la absorbancia.

6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cepas puras.

Con esto se buscaba verificar el funcionamiento adecuado de los primers así como la correcta formulación de la reacción

Se realizó la reacción de PCR utilizando primers específicos para *Salmonella* y para *Listeria*, en la tabla 5 se muestran las secuencias de cada uno de los primers. Los primers Its para *Salmonella* amplifican las regiones ITS (espaciador interno transcrito) que son secuencias localizadas entre el rADN 16S y el 23S que tienen un tamaño de 231 pb. Los primers Hyl para *Listeria monocytogenes* que amplifican un fragmento de 210 pb correspondiente al gen de la hemolisina, listeriolisina O (Tabla 5).

Tabla 5. Primers utilizados en la reacción de PCR

Bacteria blanco	Primer	Secuencia del Primer	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	Itsf Itsr	5'-TATAGCCCCATCGTGTSGTCAGAAC-3' 5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'	Chiu et al. 2005
<i>Listeria monocytogenes</i>	Hylf Hylr	5'-CGCAACAAACTGAAGCAAAGG-3' 5'-TTGGCGGCACATTTGTCAC-3'	Park et al. 2006

Los tubos de reacción contenían, buffer de la enzima (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM) en una concentración 1X, MgCl₂ una concentración de 2.5 mM, Tween-20 al 0.01%, glicerol al 12%, dNTP's con una concentración 0.2 mM los primers a una concentración de 10 pmol y la Taq polimerasa a una concentración de 2 u/μL (Tabla 6).

Tabla 6. Formulación de los tubos de reacción de PCR para la identificación de *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en tubo de reacción (1X)	Cantidad (μL)
Buffer de la enzima	10X	1X	5
MgCl ₂	25mM	2.5mM	5
Tween-20	0.1%	0.01%	5
Glicerol	50%	12%	12
dNTP's	10mM	0.2 mM	1
Primer f	20X	10 pmol	1
Primer r	20X	10 pmol	1
Taq polimerasa	5 u/μL	2 u/μL	1
ADN	variable		10
H ₂ O estéril			9
Volumen total			50

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Biometra modelo T personal. La temperatura inicial de reacción fue de 94°C por 3 minutos para desnaturalizar el DNA, seguido de 35 ciclos de amplificación que consistieron en la desnaturalización a 94°C por 30 segundos, el alineamiento a 61°C por 35 segundos y la extensión a 72°C por 35 segundos.

Para observar los productos obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se realizó a 70 volts por 1 hora y se tiñó en una solución de

bromuro de etidio al 2%. Por último el gel se fotografió y se capturó con un equipo Kodak Image Station.

6.3 Segunda etapa: Desarrollo de un método para la detección de patógenos por PCR en muestras de carne de res.

6.3.1 Estandarización del inóculo.

Se estandarizaron los inóculos de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y de *Listeria monocytogenes*, para tener un control de la cantidad de células que se iban a inocular en la muestras de carne.

Las bacterias se reactivaron y propagaron como se describe en la sección anterior. Después se realizaron diluciones en solución salina al 0.1% desde 10^{-1} hasta 10^{-3} de *Listeria monocytogenes*, y desde 10^{-1} hasta 10^{-2} de *Salmonella entérica* subsp. Typhimurium. De las diluciones 10^{-3} de *Listeria* y 10^{-2} *Salmonella* se tomaron 22.5 μL y se agregaron a un vial con 4.5 mL de solución salina 0.1%.

Para el conteo, se utilizó el Agar Xilosa-lisina-desoxicolato (XLD: BD Sparks MO. Estados Unidos) para *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y el Agar Oxford (Acumedia Neogen. Lansing Michigan, EU) para *Listeria monocytogenes*, después de 24 horas en incubación a 37°C, se contaron las colonias rojas con centro negro en las placas de agar XLD y las colonias blancas con con halo negro en las placas de agar Oxford. Solo se tomaron en cuenta las placas que estuvieran dentro del rango de 25 a 250 colonias.

6.3.2 Preparación de las muestras de carne.

Las muestras de carne utilizadas para la realización de los experimentos fue filete de res fresco adquirido en una tienda de autoservicio del sur de la ciudad. La carne tenía un color rojo cereza, la superficie de la carne era brillante, firme al tacto, la poca grasa que contenía era de color blanco, aunque algunas zonas de las piezas de carne presentaban un color café. Las muestras se cortaron en trozos de 25 g, y se guardaron en bolsas de stomacher.

6.3.3 Sensibilidad del método.

Con el fin de calcular los límites de detección de la reacción de PCR se inocularon por duplicado las muestras de carne con *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Las muestras se inocularon en la superficie con 100 μL de cada dilución de bacterias, las concentraciones iban desde 10^1 hasta 10^4 UFC/g. el inóculo se esparció en la superficie mediante un pequeño masaje al corte de carne. Una de las muestras se sometió a enriquecimiento, recuperando un mililitro del homogenizado de la carne con solución salina y agregándolo a 9 ml de caldo BHI. Se sometió a incubación se recuperaron las células, se extrajo el DNA y se realizó una reacción de PCR. La muestra 2 se sometió a extracción de DNA sin un enriquecimiento previo y se realizó una reacción de PCR.

6.3.4 Inoculación y enriquecimiento de las muestras de carne.

Las cepas se reactivaron y propagaron como se describió previamente. Para *Salmonella* se realizaron las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-2} en solución salina 0.1%. De la dilución 10^{-2} se tomaron 125 μL para inocular 25 g de carne. Para *Listeria monocytogenes* se hizo el mismo procedimiento pero tomando los 125 μL

de la dilución 10^{-3} . La carne fue inoculada en la superficie y con un pequeño masaje se extendió el inóculo.

Las muestras de carne después de ser inoculadas se diluyeron en 250 mL de solución salina al 0.1% y se homogenizaron por 4 minutos a velocidad media en el Stomacher (Seward). Se tomó 1 mL del homogenizado y se agregó a un tubo que contenía 9 mL de BHI, se incubaron por 14 horas a 37°C para después recuperar las células mediante centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos.

6.3.5 Extracción de DNA de la carne.

6.3.5.1 Método enzimático.

Para realizar la extracción de DNA de las muestras de carne primero se probó un método químico enzimático en el que se consideró la biomasa recuperada después de la centrifugación de 3 mL de las muestras sometidas a enriquecimiento (ver sección anterior), y en el segundo caso se trabajó con 25 g de carne inoculada y se homogenizó con 10 mL de buffer de fosfatos a pH 8 en el stomacher durante 6 minutos a velocidad media, se consideraron 1.5 mL del homogenizado y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se trabajó con el pellet.

Se adicionaron 200 μ L de solución de lisozima (Sigma-Aldrich 20 μ g / μ L) y 20 μ L de solución de mutanolisina (Sigma-Aldrich 1 UI/ μ L), se agitaron los tubos en el vortex y se incubaron a 37°C por 1 hora o hasta ver viscosidad.

Se adicionaron 100 μL de solución de proteinasa K (Sigma-Aldrich 1 mg/mL), se agitaron en vortex. Se adicionaron 20 μL de solución de RNAasa (Sigma-Aldrich 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se agitaron en el vórtex y se incubaron a 65°C por 1 hora. Después se adicionaron 120 μL de SDS al 10% y se incubaron por 10 minutos.

Los tubos se enfriaron y se adicionaron 300 μL de NaCl 5M y 650 μL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich 24:24:1), los tubos se agitaron manualmente durante 20 segundos y después 10 segundos en vórtex. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 500 μL) donde se encuentra el DNA y se transfirió a un microtubo limpio; se repitió este procedimiento 3 veces.

A la fase acuosa recuperada después de los tratamientos anteriores se le agregaron 500 μL de isopropanol (J.T Baker) a temperatura ambiente, se agitó suavemente y se dejó reposar 1 hora. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14000 rpm y se retiró todo el sobrenadante. Se dejó secar el pellet durante una noche a temperatura ambiente. El ADN precipitado se resuspendió en 50 μL de agua estéril y se incubó 1 hora a 65 °C

Se comprobó la calidad del DNA realizando una electroforesis con un gel de agarosa al 1%. Se realizó a 90 volts por 30 minutos. Después el gel se tiñió en una solución de bromuro de etido al 2%. El gel se fotografió con un equipo Kodak image station. El DNA fue cuantificado con espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 260 nm de la muestra de DNA.

6.3.5.2 Extracción de DNA utilizando un kit comercial (Fast ID).

Después se utilizó un sistema comercial (Kit FastID [K1-0001-0200]), la biomasa recuperada de la centrifugación de 3 mL de la muestra de carne enriquecida; para las muestras no enriquecidas se trabajó con 25 g de carne inoculada y se sometieron a homogenización en el Stomacher por 4 minutos a velocidad media con 20 mL de solución salina al 0.1% y se consideraron 1.5 mL del homogenizado, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se trabajó con el pellet.

Se agregó una cantidad aproximada de 10 µg de lisozima (Sigma-Aldrich) y 500 µL del buffer de lisis el cual contiene sales caotrópicas y detergentes que ayudan a la ruptura de la membrana de la célula, los tubos se incubaron a 65°C por 30 minutos y después se agregaron 10 µL de proteínasa K (Sigma-Aldrich 1 mg/mL), los tubos se incubaron a 65°C por 30 minutos.

Se agregaron 500 µL de cloroformo (J.T Baker) y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos. Se retiraron 500 µL del sobrenadante y se colocaron en un microtubo (Binding Column); se agregaron 500 µL del buffer Genomic Bind, el cual contiene una alta concentración de sales. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. La columna se lavó, agregando 800 µL de buffer genomic wash, centrifugando los tubos a 10000 rpm por 5 minutos, y después la columna se lavó 3 veces con 800 µL de etanol al 75% y se centrifugaron cada vez a 10000 rpm por 5 minutos.

La columna se secó en la microcentrifuga a alta velocidad (aprox. 10000 rpm) por unos pocos segundos. La columna ya seca se colocó en un microtubo limpio y se

agregaron 100 μ L de buffer TE (Tris-EDTA), los tubos se incubaron por 10 minutos a 65 °C y después se centrifugaron 1 minuto a 10000 rpm para obtener el DNA.

La integridad del DNA se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, la cual se realizó a 90 volts por 30 minutos, después se tiñó en una solución de bromuro de etidio al 2%. El gel se fotografió en un equipo Kodak image station. Después el DNA se cuantificó en el espectrofotómetro.

Después se realizó la reacción de PCR como se describió anteriormente.

6.4 Tercera etapa: Evaluación de la sobrevivencia de bacterias patógenas en carne congelada.

Las muestras de filete utilizadas para evaluar la sobrevivencia de *Salmonella* y de *Listeria*, se adquirieron en un supermercado del sur de la ciudad. La carne se compró la noche antes de comenzar el muestro y se guardo en refrigeración. El día del muestreo la carne se cortó en un ambiente estéril.

Se prepararon 14 muestras de 10 g y 14 muestras de 25 g. Se inocularon siete muestras de 10 g y siete de 25 g con 10^5 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium y las muestras restantes se inocularon con 10^4 UFC/g de *Listeria monocytogenes*. Una vez inoculadas las muestras, se conservaron en las condiciones descritas en la Tabla 7 y se cuantificaron las bacterias sobrevivientes.

En cada tiempo se realizó enriquecimiento de la carne para posteriormente extraer el DNA con el Kit Fast ID, con el cual se realizó el PCR para la detección de los

patógenos; y cuenta en placa para verificar que aún existían células viables en las muestras.

Tabla 7. Condiciones en las cuales se llevo a cabo el muestreo para evaluar la sobrevivencia de

T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Carne recién inoculada	2 horas en refrigeración.	24 horas en congelación.	1 semana de congelación.	2 semanas de congelación	3 semanas de congelación.	4 semanas de congelación

6.4.1 Cuantificación de bacterias sobrevivientes.

Para la cuenta en placa las muestras de 10 g se diluyeron en 90 mL de solución salina 0.1%, se sometieron a homogenización en el stomacher (Seward) por 4 minutos, después se realizaron diluciones decimales correspondientes. Se sembraron 100 µL de las diluciones correspondientes en placas de agar XLD para *Salmonella* y en placas de agar Oxford para *Listeria*. Se incubaron a 37°C por 24 horas. Se contaron las colonias rojas con centro negro en las placas de agar XLD y las colonias blancas con ennegrecimiento en las placas de agar Oxford. Solo se tomaron en cuenta las placas que estuvieran dentro del rango de 25 a 250 colonias.

6.4.2 Detección de bacterias patógenas por PCR.

Las muestras de 25 g se sometieron a enriquecimiento, para posteriormente recuperar las células y realizar la extracción de DNA con el Kit Fast ID, para después hacer la reacción de PCR, todo esto ya ha sido descrito anteriormente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Primera Etapa: Detección de patógenos por PCR (cepas puras).

7.1.1 Extracción de DNA de cepas puras.

Las cepas de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y *Listeria monocytogenes* con las que se trabajó se encontraban conservadas en glicerol y congeladas a -63°C. Para recuperarlas se tomaron 20 µL de cada cultivo conservado y se sembraron en caldo BHI y se dejaron 24 horas en incubación a 37° C. Esto fue suficiente para tener un crecimiento adecuado para después realizar la extracción de DNA.

El protocolo de extracción químico - enzimático utilizado permitió extraer DNA de las cepas puras, de acuerdo con las lecturas que se obtuvieron en el espectrofotómetro (tabla 8); sin embargo al realizar la electroforesis de las muestras para verificar la integridad del DNA las bandas correspondientes a las muestras de DNA extraído de *Listeria monocytogenes* son muy tenues, y para el caso de *Salmonella* Typhimurium las bandas que se observaron no fueron definidas (figura 9), lo indicaba fragmentación en el DNA.

La lectura de la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro también ayudó a determinar la concentración de DNA que se tenía en cada una de las muestras extraídas, así como la pureza de estas muestras, la cual se calculó con el cociente de el valor de la absorbancia a 260 nm entre el valor de la absorbancia a 280 nm, este cociente debe estar entre 1.8-2.0 (Amagliani et al. 2007) para poder decir que el DNA es puro y que no debería contener concentraciones altas de proteínas, las cuales podrían tener un papel como inhibidores en la reacción de PCR.

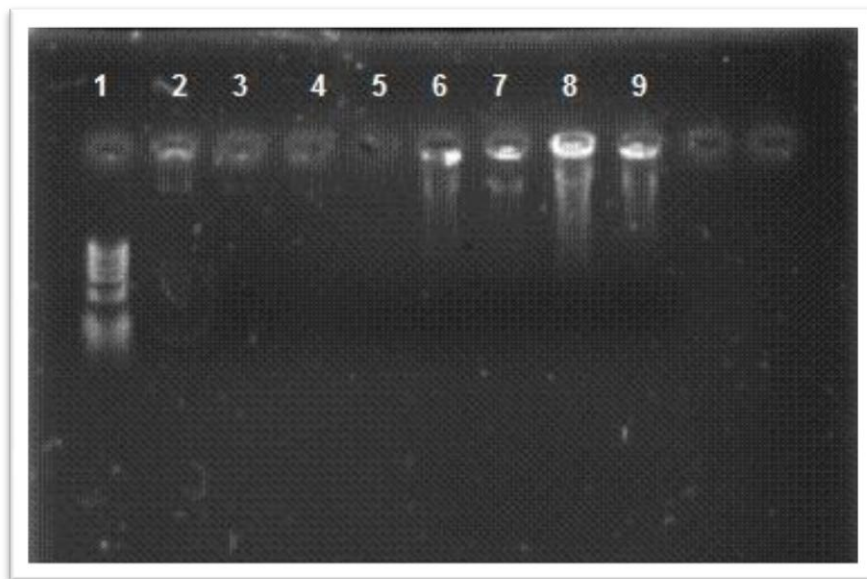


Figura 9. Gel de Agarosa donde se muestra el DNA extraído de cepas puras de *Listeria monocytogenes* (carriles 2 a 5) y *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium (carriles 6 a 9).

En la tabla 8 se puede observar la pureza de las muestras de DNA extraído, ningún valor de pureza está dentro del límite que se considera óptimo (1.8-2.0) por lo cual podemos decir que las muestras contenían proteínas que no se eliminaron con los lavados de fenol-cloroformo, y estas podrían tener un efecto inhibitorio en la reacción de PCR que se realizaría posteriormente con esas muestras de DNA. Las muestras presentan una concentración adecuada, tanto la muestra 2 de *Salmonella* como la 2 de *Listeria* presentaron una concentración baja con respecto a las otras tres muestras; para realizar la reacción de PCR se escogieron las muestras con mayor concentración.

Tabla 8. Se presenta los resultados obtenidos de 4 muestras de cada cepa.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Concentración (ng/μL)	Pureza
<i>Salmonella 1</i>	0.3821	0.2416	95.53	1.582
<i>Salmonella 2</i>	0.1181	0.0527	29.53	2.241
<i>Salmonella 3</i>	0.4116	0.2492	102.90	1.652
<i>Salmonella 4</i>	0.5353	0.3338	133.83	1.604
<i>Listeria 1</i>	0.2254	0.1491	56.35	1.512
<i>Listeria 2</i>	0.1093	0.0640	27.33	1.708
<i>Listeria 3</i>	0.2037	0.1369	50.93	1.488
<i>Listeria 4</i>	0.3832	0.2745	95.80	1.396

7.1.2 Reacción de PCR con primers específicos para detectar *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium*.

Se escogió la muestra 4 tanto para *Salmonella* como para *Listeria* para realizar con a la reacción de PCR ya que su concentración fue alta (Tabla 8). Para la muestra de *Salmonella* se diluyó a 100 ng/μL y 70 ng/μL, con respecto a *Listeria* también se diluyó a 70 ng/μL y 95.8 ng/μL, con el fin de contar con una concentración de DNA adecuada para que la reacción de PCR se llevara a cabo de forma efectiva.

Los tubos de reacción se prepararon con los volúmenes descritos en la tabla 6 de la sección anterior; y en la tabla 9 se muestran las concentraciones de templado utilizado en la reacción de PCR que se llevó a cabo como se describe en la sección 4.10.

Tabla 9. Concentraciones del templado de *Listeria* y *Salmonella*.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Concentración en tubo de reacción (ng/μL)
<i>Salmonella</i>	70	14
<i>Salmonella</i>	100	20
<i>Listeria</i>	95.8	19.16
<i>Listeria</i>	70	14

La mezcla de reacción contenía Tween 20 y glicerol, los cuales son coadyuvantes en la reacción. El Tween 20 estabiliza la Taq polimerasa, además evita la formación de estructuras secundaria en la hebra molde de DNA, elevando el rendimiento de la reacción pero se puede presentar un incremento en la inespecificidad de ésta. El glicerol aumenta la eficiencia de la amplificación, además de aumentar la especificidad de la reacción (Cortazar Martínez et al., 2004). Al terminar la reacción se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar que se hubieran obtenido productos de PCR (Figura 10). En este gel se pudieron observar las bandas correspondientes a los productos amplificados de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium (312 pb. Chiu et al., 2005) y *Listeria monocytogenes* (210 pb. Park et al. 2006); las bandas se observaron definidas y en el caso de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium la banda fue intensa, en cambio la banda de *Listeria monocytogenes* no fue tan intensa. En ambas concentraciones de DNA se observó lo mismo en la electroforesis, lo cual indica que la concentración no fue un factor que influyera.

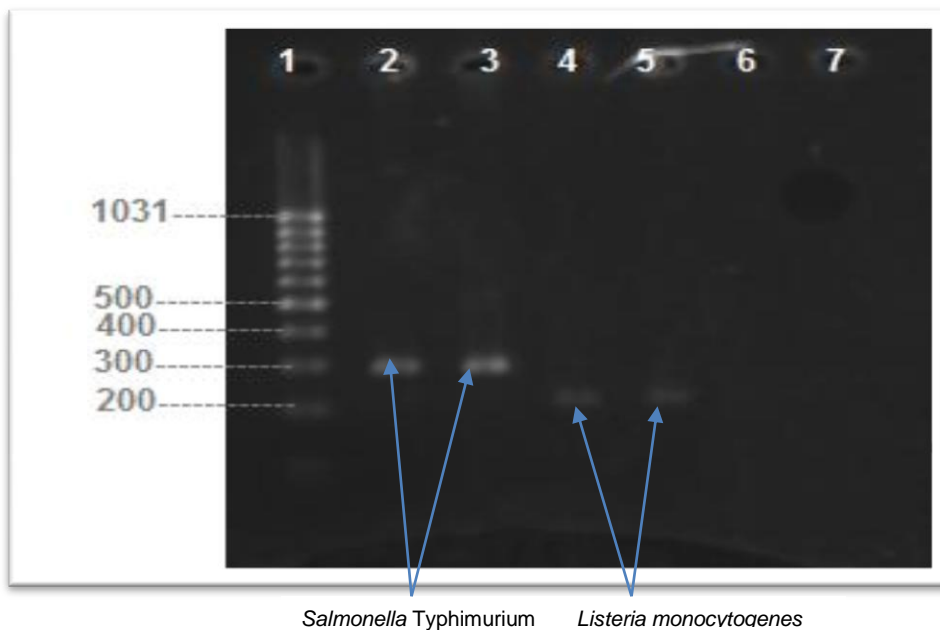


Figura 10. Gel de agarosa al 2% donde se observan las bandas correspondientes a los productos amplificados de la reacción de PCR de cepas puras de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium de la región ITS (internal transcribed spacer) (carriles 2 y 3) y de *Listeria monocytogenes* de la región correspondiente al gen de la hemolisina, listeriolisina O (carril 4 y 5.)

Al haber obtenido las bandas correspondientes al DNA de las bacterias utilizadas se verificó: el correcto funcionamiento de los primers utilizados, la formulación de la reacción, las condiciones en las cuales se llevó a cabo la reacción, y el que las concentraciones utilizadas de DNA fueron las adecuadas.

7.2 Segunda Etapa: Desarrollo de un método para la detección de patógenos en muestras de carne de res.

7.2.1 Estandarización del inóculo.

Las cepas utilizadas se reactivaron como se describe en la sección 4.1. Para esta parte de la metodología se realizó un conteo en placa tanto para *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium como para *Listeria monocytogenes* (Figura 11) y así determinar la cantidad de microorganismos que se inocularon en las muestras de carne.

Se hizo la estandarización de los inóculos. Para *Listeria* estaban dentro del orden de 10^4 UFC/g de muestra (Zhang et al., 2009) (Tabla 10); y para *Salmonella* la estandarización del inóculo fue del orden de 10^5 UFC/g (Bohaychuk et al., 2005) (Tabla 11); la estandarización del inóculo se realizó de esta forma ya que en un principio el inóculo de *Salmonella* también estaba en el orden de 10^4 UFC/g pero al hacer el conteo inicial se sobre estimaba el conteo de células.

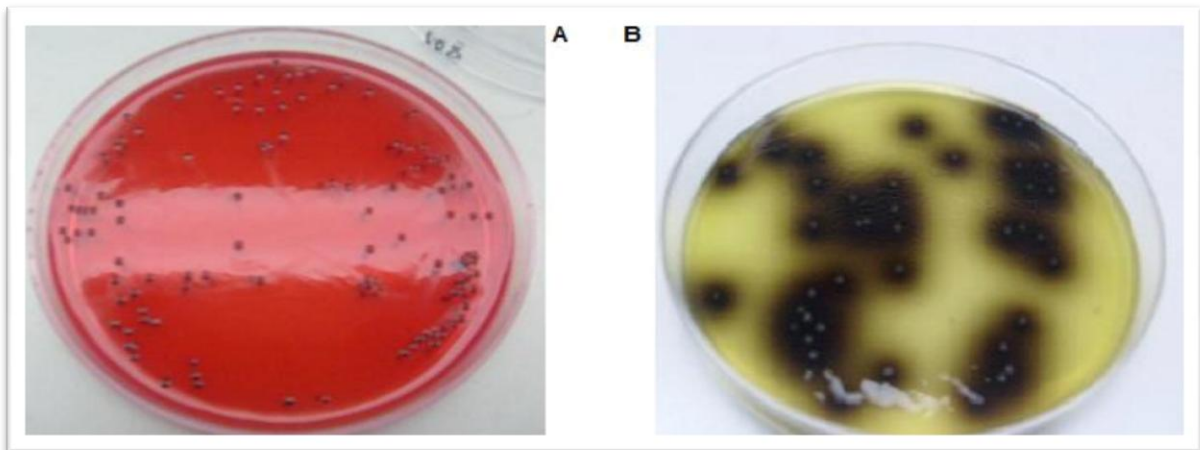


Figura 11. A) Caja de Agar XLD con colonias características de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium B) Caja con agar Oxford con colonias características de *Listeria monocytogenes*

Tabla 10. Estandarización del inóculo de *Salmonella Typhimurium*

Dilución	No. de colonias	Promedio	Cuenta UFC/mL
10 ⁻¹	>250	-----	-----
	>250		
10 ⁻²	124	129.5	1.30x10 ⁵
	135		
10 ⁻³	11	16.5	1.65x10 ⁵ (I)
	22		
10 ⁻⁴	4	3.5	3.5x10 ⁵ (II)
	3		

I y II. Valor estimado

Tabla 11. Estandarización del inóculo de *Listeria monocytogenes*

Dilución	No. de colonias	Promedio	Cuenta UFC/mL
10 ⁻¹	129	143.5	1.44x10 ⁴
	158		
10 ⁻²	14	15	1.5x10 ⁴ (III)
	16		
10 ⁻³	1	1.5	1.5x10 ⁴ (IV)
	2		
10 ⁻⁴	0	0	-----
	0		

III y IV. Valor estimado

Las cantidades inoculadas de las bacterias fueron altas considerando que una muestra de alimento podría estar contaminada con una baja cantidad de células del microorganismo, pero con estas concentraciones de inóculo se aseguro una alta concentración de células bacterianas para que al realizarse la extracción de DNA se obtuviera una cantidad adecuada de templado y la reacción de PCR se llevara a cabo de forma correcta.

7.2.2 Sensibilidad del método.

Este experimento se realizó inoculando carne fresca de res con diferentes concentraciones de inóculo, a las cuales se les extrajo el DNA para después realizar una reacción de PCR, para así poder determinar cuáles serían los límites máximos y mínimos de detección de bacterias que la reacción de la PCR.

Para la extracción del DNA de la carne se utilizó como primera alternativa la extracción químico enzimática, con la cual se obtenía un buen resultado en cuanto a la cantidad de DNA extraído pero la pureza no era muy buena (Tabla 12) El control positivo del método fue una muestra de masa de maíz nixtamalizado ya que el método fue utilizado con anterioridad en la extracción de DNA de muestras de esta naturaleza.

Tabla 12. Concentraciones de DNA de muestras de masa y de carne, obtenido mediante la extracción químico enzimática.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Concentración (ng/μL)	Pureza
Masa	1.2856	1.2166	321.40	1.1
Masa	0.557	0.5964	139.25	0.9
C/S	0.2148	0.3632	53.70	0.6
C/L	0.4599	0.5107	114.98	0.9

C/S: Carne inoculada con Salmonella. C/L: Carne inoculada con Listeria

En la figura 12 se muestra la electroforesis que se realizó después de la extracción, para las muestras de maíz nixtamalizado que se encuentran en los carriles 2 y 3 se observó que para la muestra del carril 2 estaba degradada y para la muestra que se encuentra en el carril 3 se observa un banda muy tenue en la parte superior; para la muestra de carne inoculada con *Salmonella* (carril 4) la banda se observa tenue pero definida, al igual que para la muestra de carne inoculada con *Listeria* (carril 5). Las muestras correspondientes a la carne inoculada se diluyeron para obtener una concentración de 50 ng/μL. Al agregarse

a los tubos de reacción las dos muestras se encontraban en una concentración de 10 ng/ μ L. Al realizar la electroforesis en gel de agarosa no se observaron las bandas correspondientes a los productos amplificados. Al ser el DNA extraído de una matriz tan compleja como lo es la carne, las muestras pueden tener compuestos como las proteínas, los ácidos grasos, el grupo hemo entre otros que actuaron como inhibidores de la reacción haciendo más difícil la detección de los patógenos (Maurer, 2006).

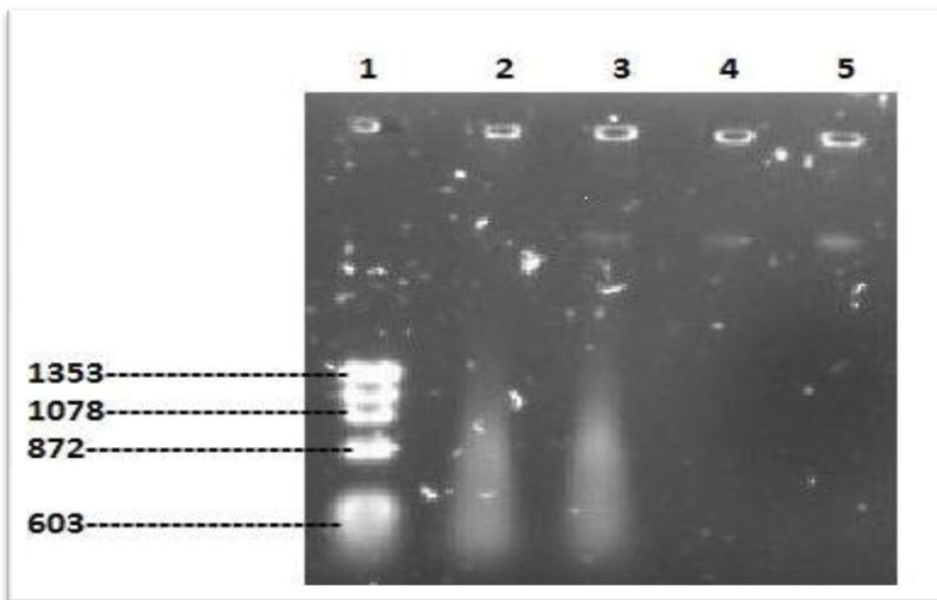


Figura 12. Gel de agarosa al 1% donde se observa el DNA extraído mediante el método químico enzimático de masa de maíz nixtamalizado (carril 2 y 3) y carne inoculada con *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium (carril 4) y *Listeria monocytogenes* (carril 5)

Al no haber obtenido resultado de amplificación con las muestras de DNA extraídas con el método químico enzimático se decidió hacer la extracción con un método comercial (Kit Fast ID). Este kit se fundamenta en adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas, dando como resultado DNA de alta pureza. La electroforesis que se hizo después de la extracción de DNA de las muestras utilizadas para delimitar los límites de detección del método (Figura 12) nos permitió observar bandas intensas correspondientes al DNA extraído de las muestras inoculadas tanto con *Salmonella* como con *Listeria*.

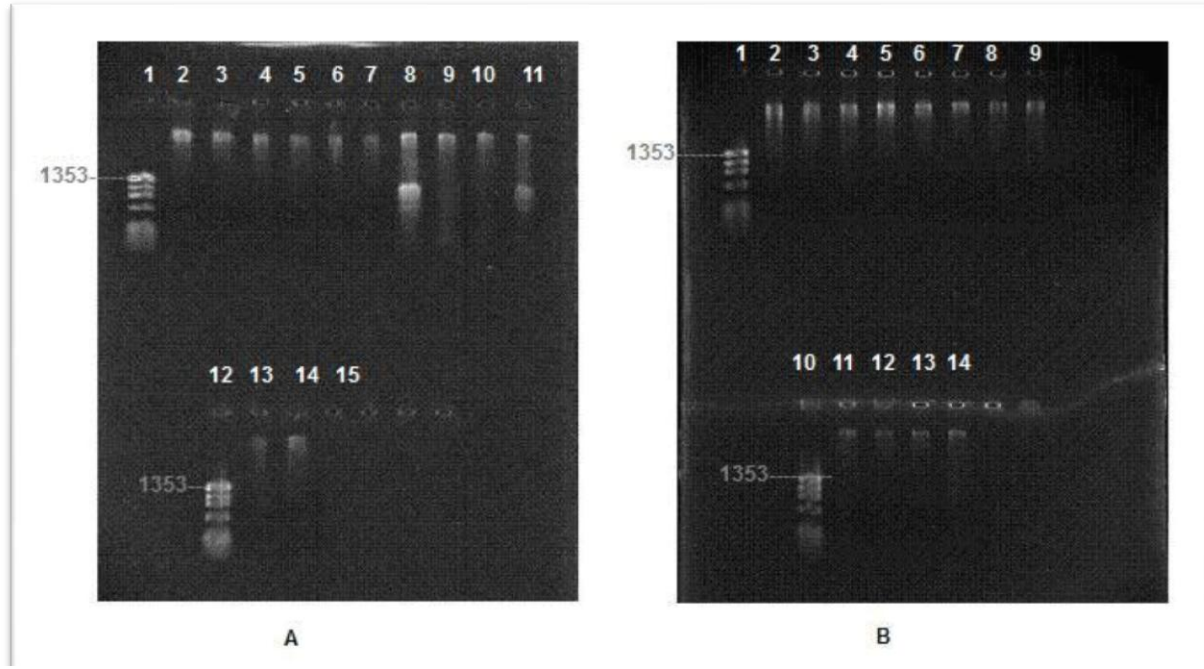


Figura 13. A) Gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas correspondientes a la extracción de DNA con el kit comercial Fast ID de *Salmonella* para determinar los límites de detección del método. Carril 1. Marcador, carril 2 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^1 , carril 3 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^1 , carril 4 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^1 y sometida a enriquecimiento, carril 5 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^2 , carril 6 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^2 , carril 7 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^2 y sometida a enriquecimiento, carril 8 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^3 , carril 9 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^3 , carril 10 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^3 y sometida a enriquecimiento, carril 11 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^4 , carril 12 marcador molecular, carril 13 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^4 , carril 14 DNA de carne inoculada con *Salmonella* 10^4 y sometida a enriquecimiento. B) Gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas correspondientes a la extracción de DNA con el kit comercial Fast ID de *Listeria* para determinar los límites de detección del método. Carril 1. Marcador, carril 2 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^1 , carril 3 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^1 , carril 4 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^1 y sometida a enriquecimiento, carril 5 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^2 , carril 6 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^2 , carril 7 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^2 y sometida a enriquecimiento, carril 8 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^3 , carril 9 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^3 , carril 10 marcador molecular, carril 11 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^3 y sometida a enriquecimiento, carril 12 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^4 , carril 13 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^4 , carril 14 DNA de carne inoculada con *Listeria* 10^4 y sometida a enriquecimiento.

El DNA extraído se cuantificó, y aunque no se obtuvieron concentraciones muy altas de DNA y la pureza no fue la ideal, de acuerdo con el método espectrofotométrico, se decidió trabajar con las muestras que presentaban una mejor concentración de DNA para realizar la reacción de PCR con estas muestras (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Concentración de DNA con el kit comercial Fast ID de *Listeria monocytogenes* obtenido para determinar los límites de detección del método.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Concentración (ng/ μ L)	Pureza 260/280
L10 ¹ En	0.1417	0.1279	35.43	1.1
L10 ¹	0.1302	0.0808	32.55	1.6
L10 ² En	0.091	0.0639	22.75	1.4
L10 ²	0.188	0.1183	47.00	1.6
L10 ³ En	0.1009	0.0563	25.23	1.8
L10 ³	0.1301	0.0766	32.53	1.7
L10 ⁴ En	0.0521	0.0278	13.03	1.9
L10 ⁴	0.1235	0.0848	30.88	1.5

L10¹ En: Carne inoculada con 10¹ UFC/g y con enriquecimiento. L10¹: Carne inoculada con 10¹ UFC/g. L10² En: Carne inoculada con 10² UFC/g y con enriquecimiento. L10²: Carne inoculada con 10² UFC/g. L10³ En: Carne inoculada con 10³ UFC/g y con enriquecimiento. L10³: Carne inoculada con 10³ UFC/g. L10⁴ En: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g y con enriquecimiento. L10⁴: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g.

Las muestras de DNA inoculadas 10¹ y 10² de *Salmonella* sometidas a enriquecimiento se ajustaron a una concentración de 50 ng/ μ L, ya que se obtuvo una alta concentración de DNA, las muestras restantes se diluyeron en una proporción de 7:3 (Tabla 15 y 16), y después se realizó una reacción de PCR.

Tabla 14. Concentración de DNA de *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* obtenido para determinar los límites de detección del método.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Concentración (ng/μL)	Pureza
S10 ¹ En	1.3892	0.6596	347.30	2.1
S10 ¹	0.1331	0.0872	33.28	1.5
S10 ² En	0.3486	0.1661	87.15	2.1
S10 ²	0.0797	0.0497	19.93	1.6
S10 ³ En	0.1063	0.0747	26.58	1.4
S10 ³	0.0669	0.0478	16.73	1.4
S10 ⁴ En	0.1889	0.075	47.23	2.5
S10 ⁴	0.1097	0.0721	27.43	1.5

S 10¹ En: Carne inoculada con 10¹ UFC/g y con enriquecimiento. S10¹: Carne inoculada con 10¹ UFC/g.
 S10² En: Carne inoculada con 10² UFC/g y con enriquecimiento. S10²: Carne inoculada con 10² UFC/g.
 S10³ En: Carne inoculada con 10³ UFC/g y con enriquecimiento. S10³: Carne inoculada con 10³ UFC/g.
 S10⁴ En: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g y con enriquecimiento. S10⁴: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g.

Tabla 15. Concentraciones del templado de *Listeria monocytogenes* en la reacción de PCR para la determinación de los límites de detección.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Concentración en tubo de reacción (ng/μL)
L10 ¹ En	10.63	2.13
L10 ¹	9.77	1.95
L10 ² En	6.83	1.37
L10 ²	14.10	2.82
L10 ³ En	7.57	1.51
L10 ³	9.76	1.95
L10 ⁴ En	3.91	0.78
L10 ⁴	29.26	1.85

L10¹ En: Carne inoculada con 10¹ UFC/g y con enriquecimiento. L10¹: Carne inoculada con 10¹ UFC/g. L10² En: Carne inoculada con 10² UFC/g y con enriquecimiento. L10²: Carne inoculada con 10² UFC/g. L10³ En: Carne inoculada con 10³ UFC/g y con enriquecimiento. L10³: Carne inoculada con 10³ UFC/g. L10⁴ En: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g y con enriquecimiento. L10⁴: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g.

Tabla 16. Concentraciones del templado de *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* en la reacción de PCR para la determinación de los límites de detección

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Concentración en tubo de reacción (ng/ μ L)
S10 ¹ En	50	10
S10 ¹	9.98	2.00
S10 ² En	50	10
S10 ²	5.98	1.20
S10 ³ En	7.97	1.59
S10 ³	5.02	1.00
S10 ⁴ En	14.17	2.83
S10 ⁴	8.23	1.65

S 10¹ En: Carne inoculada con 10¹ UFC/g y con enriquecimiento. S10¹: Carne inoculada con 10¹ UFC/g.
 S10² En: Carne inoculada con 10² UFC/g y con enriquecimiento. S10²: Carne inoculada con 10² UFC/g.
 S10³ En: Carne inoculada con 10³ UFC/g y con enriquecimiento. S10³: Carne inoculada con 10³ UFC/g.
 S10⁴ En: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g y con enriquecimiento. S10⁴: Carne inoculada con 10⁴ UFC/g.

Después de haber realizado la reacción de PCR se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se pudieron observar las bandas correspondientes a los productos amplificados (Figuras 14 y 15).

Tanto para *Listeria* como para *Salmonella* fue posible detectar todas las concentraciones ya que se observaron bandas definidas correspondientes a los productos amplificados; las muestras correspondientes a las concentraciones de 10² de *Listeria* con y sin enriquecimiento no presentaron bandas intensas. Con respecto a las concentración de 10⁴ sin enriquecimiento tanto para *Listeria* como *Salmonella* no fue posible observar bandas correspondientes a los productos amplificados, esto se puede deber a que no existió una buena recuperación de células (Ruiz-Rueda et al. 2010), con lo cual no hubo una alta concentración de DNA correspondientes a las bacterias, o a que las muestras no presentaban un valor de pureza ideal y podrían contener inhibidores de la reacción de PCR (Maurer, 2006).

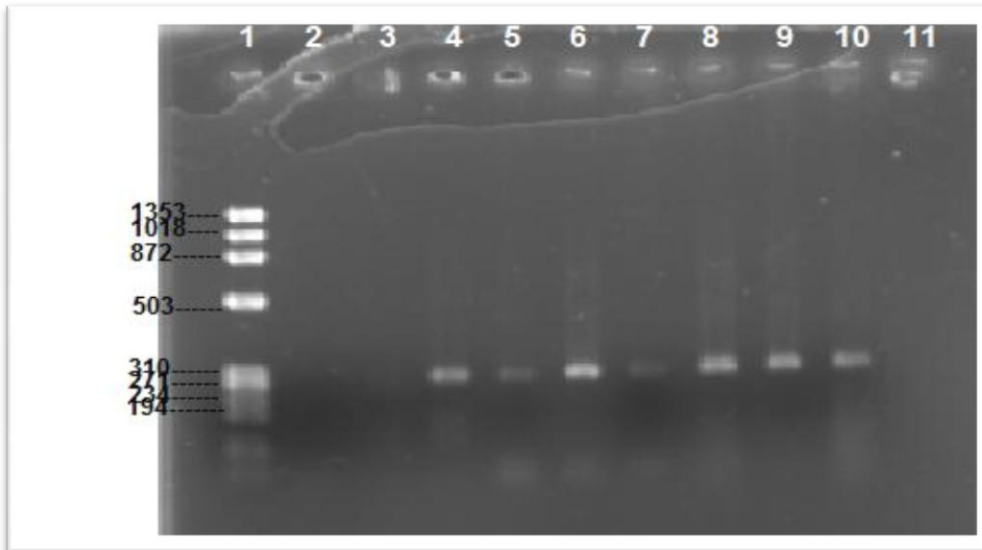


Figura 14. Gel de agarosa al 2% donde se muestran los productos de PCR de correspondientes a los límites de detección de Salmonella. Carriles 1 marcador, 2 control negativo, 3 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^4 UFC/g de Salmonella, 4 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^4 UFC/g de Salmonella, 5 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^3 UFC/g de Salmonella, 6 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^3 UFC/g de Salmonella, 7 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^2 UFC/g de Salmonella, 8 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^2 UFC/g de Salmonella, 9 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^1 UFC/g de Salmonella, 10 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^1 UFC/g de Salmonella

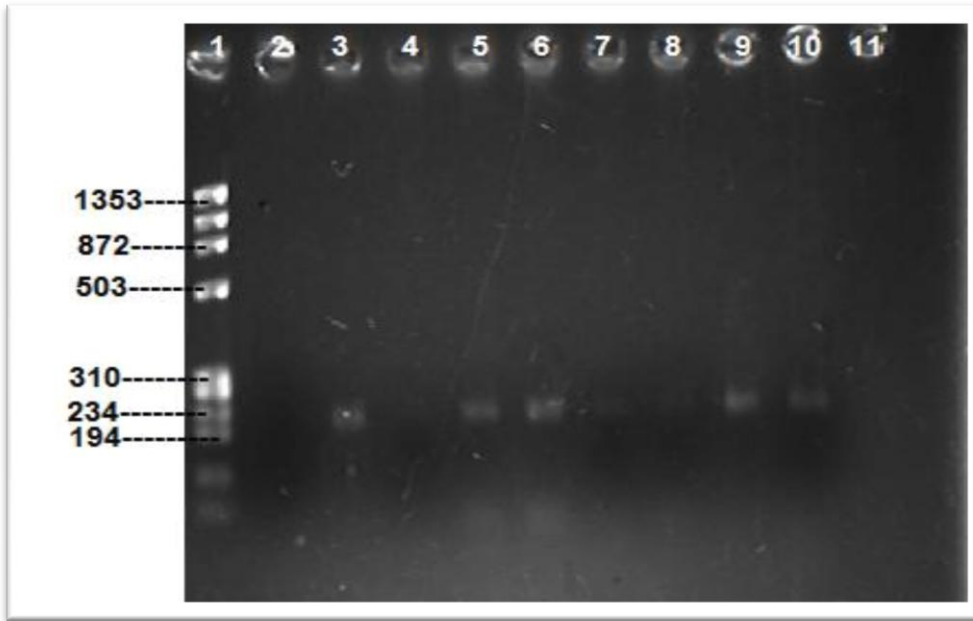


Figura 15. Gel de agarosa al 2% donde se muestran los productos de PCR de correspondientes a los límites de detección de *Listeria*. Carriles, 1 marcador, 2 control negativo, 3 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^4 UFC/g de *Listeria*, 4 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^4 UFC/g de *Listeria*, 5 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^3 UFC/g de *Listeria*, 6 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^3 UFC/g de *Listeria*, 7 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^2 UFC/g de *Listeria*, 8 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^2 UFC/g de *Listeria*, 9 producto amplificado de DNA de carne sin enriquecimiento inoculada con 10^1 UFC/g de *Listeria*, 10 producto amplificado de DNA de carne con enriquecimiento inoculada con 10^1 UFC/g de *Listeria*.

7.3 Tercera etapa: Evaluación de la sobrevivencia de patógenos en carne congelada.

7.3.1 Muestreo.

7.3.1.1 Sobrevivencia de las bacterias en la carne congelada..

La carne se inoculó con un cultivo de *Listeria monocytogenes* (10^4 UFC/g) y con de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium (10^5 UFC/g) y se almacenó a -14°C durante 4 semanas (Tabla 17). Para *Listeria* se observa un descenso en la cuenta a las 2 horas de haber empezado el almacenamiento (Figura 16). Esta disminución de la cantidad células de *Listeria monocytogenes* con respecto a la cantidad con la cual se comenzó el muestreo se observó en cada tiempo de monitoreo, pero esta disminución fue de menos de un ciclo logarítmico. En cambio para *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium esta disminución también se presentó, pero el conteo se mantuvo dentro del mismo orden del inóculo inicial. La disminución para los dos microorganismos es significativa ($p < 0.05$) a lo largo de todo el muestreo. Durante el tiempo de muestreo se observó que aunque la disminución de *Listeria* fue menor a un ciclo logarítmico las células pierden viabilidad de forma más rápida que *Salmonella* que su disminución se hace de forma gradual.

En el caso de *Listeria monocytogenes* después de 4 semanas de almacenamiento en congelación su cuenta fue de 6.9×10^2 UFC/g de carne y para *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium fue de 2.3×10^3 UFC/g de carne.

Tabla 17. Cuantificación de bacterias sobrevivientes durante el almacenamiento a baja temperatura de carne de res.

Tiempo	Salmonella	Listeria
0	6.5×10^3	1.5×10^3
2 hr	1.01×10^4	1.05×10^3
24hr	5.3×10^3	8.5×10^2
1 semana	3.2×10^3	7.0×10^2
2 semanas	2.8×10^3	5.5×10^2
3 semanas	2.0×10^3	4.9×10^2
4 semanas	2.3×10^3	6.9×10^2

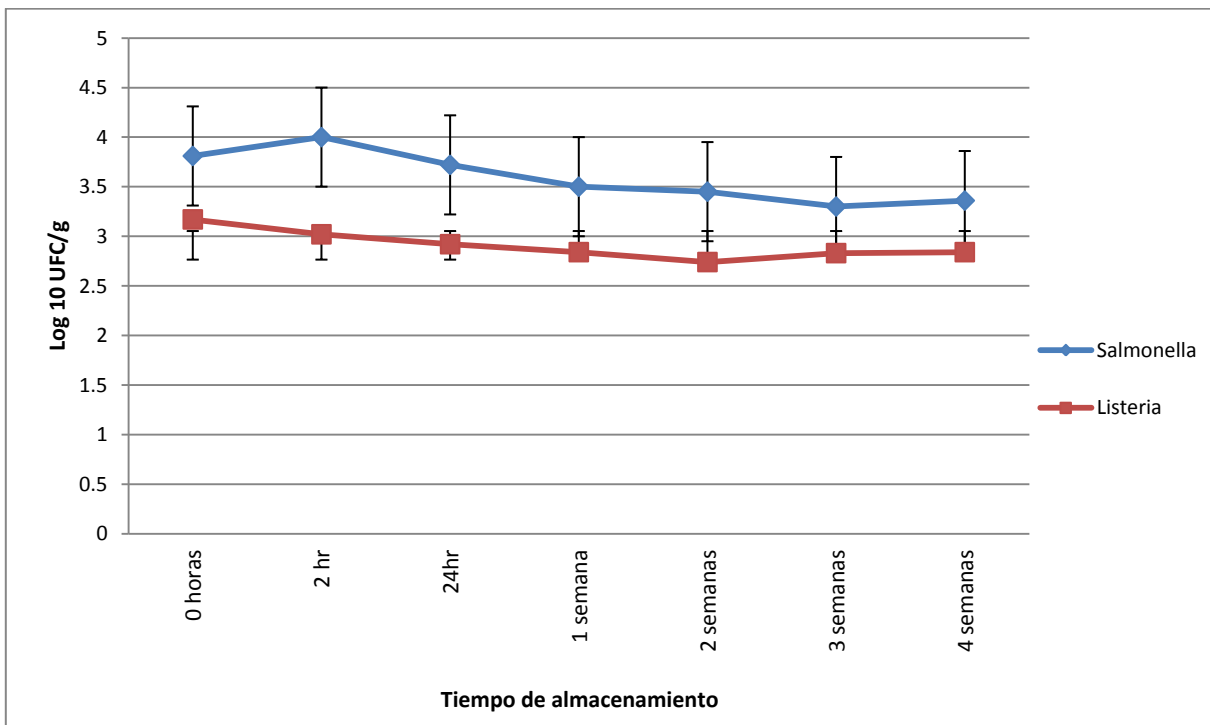


Figura 16. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium durante el almacenamiento de carne en congelación a -14°C . Se presentan promedios de 2 muestras y desviaciones estándar.

Aunque el periodo de almacenamiento no fue largo y sabiendo que la carne se puede conservar en congelación durante un periodo de entre 6 y 12 meses (Willenberg, 2006). En algunos estudios recientes se observó que *Listeria monocytogenes* sobrevive en Salchichas tipo Frankfurt empacadas al vacío y almacenadas a 4° durante 30 días (Simpson et al., 2010), en tocino precocido empacado al vacío y almacenado a -20° y 4°C durante 25 semanas (Toarmina et al., 2010), en fresas congeladas por periodos de al menos 4 semanas (Flessa et al., 2005). En el caso de *Salmonella* en estudios recientes se ha visto que en nuggets de pollo pre-cocidos congelados a -20° C las células de *Salmonella* pueden sobrevivir hasta 16 semanas (Domínguez et al., 2009), en jugo de naranja irradiado y conservado a temperatura de refrigeración *Salmonella* sobrevive por 14 días y aun despues se pueden encontrar células viables (Niemira et al., 2003), También se ha encontrado que diferentes serovariedades de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* pueden sobrevivir en jugos concentrados de uva, manzana, piña y en pure de platáno por al menos 12 semanas a niveles detectables (Oyarzábal et al., 2003).

Durante los primeros 3 tiempos del muestreo en las placas de Agar XLD y Agar Oxford crecían colonias diferentes a las características de *Salmonella* y de *Listeria* (Figura 17), estas colonias eran de color amarillo y de consistencia cremosa. La presencia de estas colonias diferentes sugería que las muestras de carne tenían una microbiota inicial, por lo cual, se decidió hacer un conteo en agar cuenta en placa. Aunque con esta cuenta en placa no se puede diferenciar entre grupos de microorganismo, nos ayudó para conocer la calidad microbiológica de las muestras utilizadas. Al compara los conteos en medios selectivos con los conteos en agar cuenta en placa se observa que con respecto a *Salmonella* la diferencia entre los conteos llega a ser de hasta un ciclo logarítmico y para *Listeria* esta diferencia es de hasta 2 ciclos logarítmicos. Estas diferencias indican que la cantidad de microbiota inicial en la carne estaba presente en un número considerable.

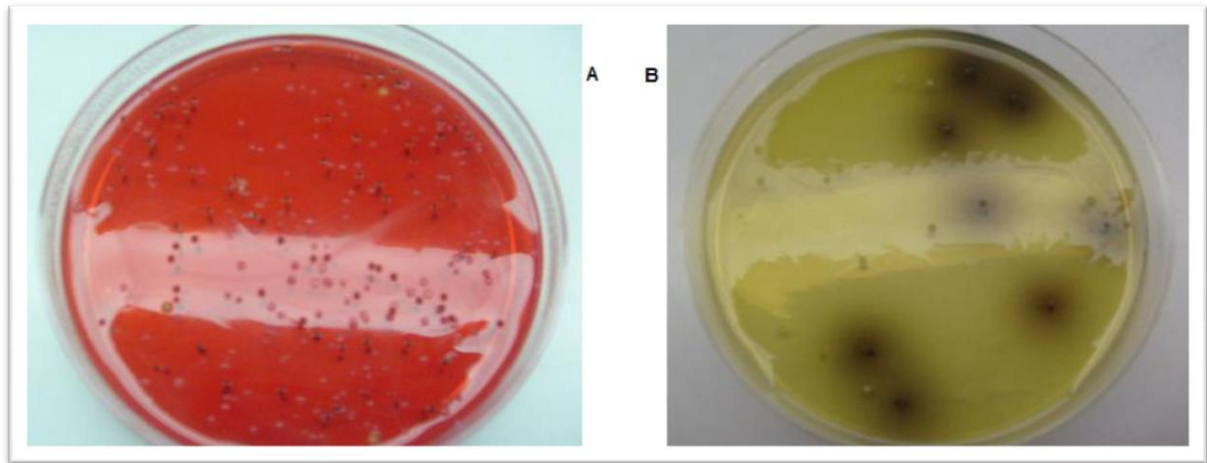


Figura 17. A) Caja de agar XLD donde se pueden observar colonias características de *Salmonella* y colonias diferentes de color amarillo. B) Cajas con agar Oxford donde se observan colonias características de *Listeria monocytogenes* y colonias diferentes de color amarillo

Las cajas de agar cuenta en placa presentaban dos tipos de colonias; colonias pequeñas, puntiformes, y de consistencia cremosa, y colonias grandes de consistencia cremosa. Se realizó la cuenta de los dos tipos de colonias así como el conteo total (Tabla 18)

Tabla 18. Cuantificación de bacterias en el agar cuenta en placa, a 30°C, condiciones aerobias

Semana	Colonias pequeñas		UFC/g	Colonias grandes		UFC/g	Cuenta total (UFC/g)
1	192	140	1.7×10^4	77	53	6.5×10^3	2.31×10^4
2	86	55	7.1×10^3	63	58	6.1×10^3	1.3×10^4
3	142	129	1.4×10^5	50	31	4.1×10^4	1.8×10^5
4	255	259	2.6×10^4	47	51	4.1×10^3	3.1×10^4

Aunque se puede observar que durante el muestreo el conteo de microorganismos disminuyó y aumentó de una semana a otra (Figura 18); dentro de estos microorganismos se pueden encontrar *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* (Prändl, 1992). La diferencia que se observa no es significativa, por lo que se

puede decir que la cantidad total de microorganismos presentes en las muestras se mantuvo constante durante todo el muestreo, además su presencia no afecto la cuantificación de las bacterias sobrevivientes inoculadas en las muestras.

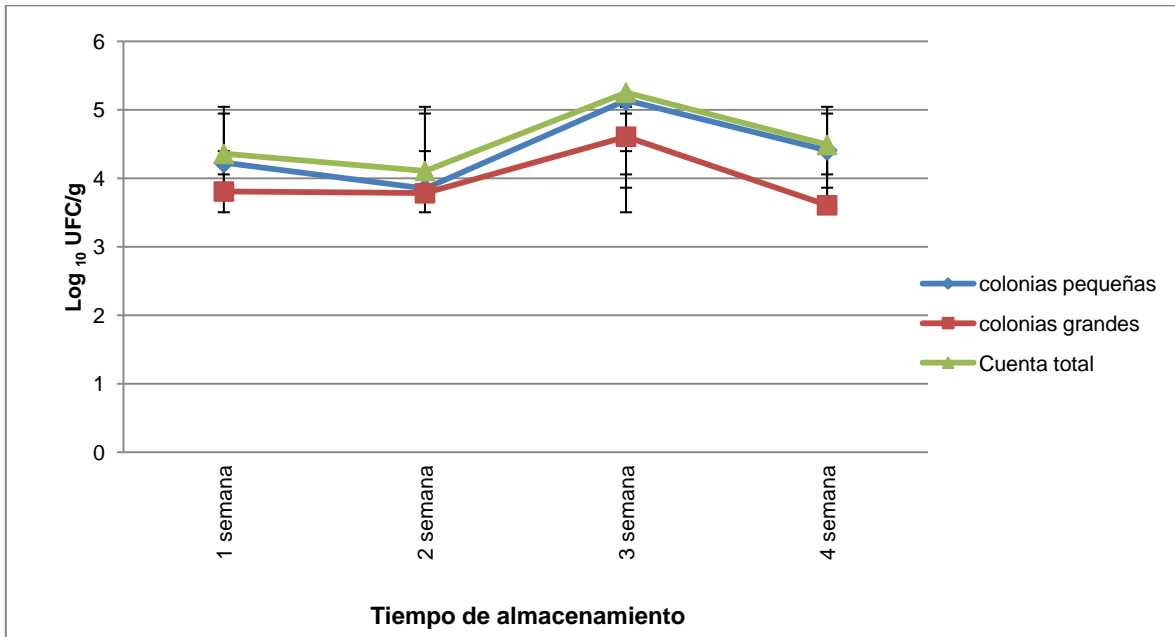


Figura 18. Cuantificación microorganismos mesófilos aerobios. Cuenta en placa, a 30°C, condiciones aerobias.

7.3.1.2 Detección por PCR de *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.

En las mismas muestras que el punto anterior se identificó a *Salmonella* y a *Listeria monocytogenes* por PCR. La carne se sometió a enriquecimiento para después extraer el DNA con el kit comercial Fast ID. En la Figura 19 se pueden observar bandas intensas para cada una de las muestras de DNA extraído, a excepción de las muestras correspondientes a las semanas 3 y 4 de muestreo de *Listeria monocytogenes*, donde las bandas que se observaron no fueron bien definidas.

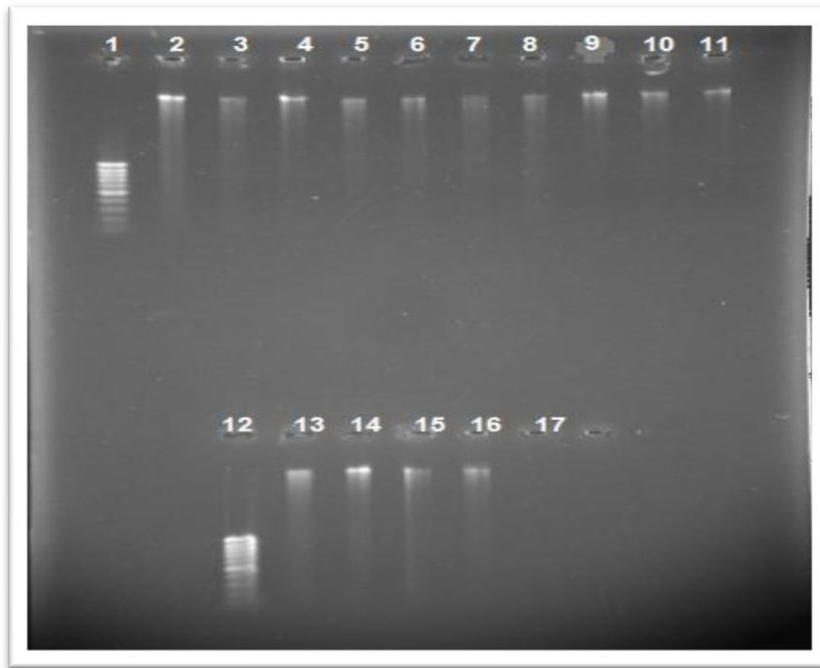


Figura 19. Gel de agarosa al 1% donde se observa el DNA extraído de muestras de carne inoculadas con *Listeria monocytogenes* (carril 2 a 8) y con *Salmonella Typhimurium* (carril 9 a 16) Almacenadas a -14°C por 4 semanas. Carriles: 1 marcador molecular, 2 DNA extraído de una muestra de carne recién inoculada con *Listeria monocytogenes*, 3 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y congelada por 2 horas, 4 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y almacenada en congelación por 24 horas, 5 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y almacenada en congelación por 1 semana, 6 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y almacenada en congelación por 2 semanas, 7 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y almacenada en congelación por 3 semanas, 8 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Listeria monocytogenes* y almacenada en congelación por 4 semanas, 9 DNA extraído de una muestra de carne recién inoculada con *Salmonella Typhimurium*, 10 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y con 2 horas de congelación, 11 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y con 24 horas de congelación, 12 marcador molecular, 13 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y almacenada en congelación por 1 semana, 14 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y almacenada en congelación por 2 semanas, 15 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y almacenada en congelación por 3 semanas, 16 DNA extraído de una muestra de carne inoculada con *Salmonella Typhimurium* y almacenada en congelación por 4 semanas.

Se cuantificó el DNA presente en las muestras mediante el método espectrofotométrico (Tablas 19 y 20). Las concentraciones de DNA obtenidas fueron adecuadas para poder realizar una reacción de PCR. El cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm no fue la ideal, pero suficiente para realizar la reacción de PCR.

Tabla 19. Concentración de DNA del extracto de carne inoculada *Listeria monocytogenes* obtenido con el kit comercial Fast ID

Muestra	Abs 260	Abs 280	Calidad 260/280	Concentración (ng/μL)
Listeria T0	0.1983	0.1129	1.756	49.575
Listeria T1	0.0991	0.0558	1.776	24.775
Listeria T2	0.1201	0.0673	1.785	30.025
Listeria T3	0.0965	0.0606	1.592	24.125
Listeria T4	0.0973	0.0615	1.582	24.325
Listeria T5	0.0773	0.0529	1.461	19.325
Listeria T6	0.0970	0.0593	1.636	24.25

Tabla 20. Concentración de DNA del extracto de carne inoculada con *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* obtenido con el kit comercial Fast ID

Muestra	Abs 260	Abs 280	Calidad	Concentración (ng/μL)
Salmonella T0	0.1698	0.1074	1.581	42.45
Salmonella T1	0.1377	0.0921	1.495	34.425
Salmonella T2	0.0594	0.0352	1.688	14.85
Salmonella T3	0.0915	0.0501	1.826	22.875
Salmonella T4	0.1137	0.0748	1.520	28.425
Salmonella T5	0.0959	0.061	1.572	23.975
Salmonella T6	0.112	0.072	1.553	28

Antes de realizar la reacción de PCR las muestras de DNA se diluyeron en una proporción de 7 partes de agua estéril por 3 de DNA. Las muestras ya diluidas se encontraron en un rango de concentración desde 14 ng/ μ L hasta 4 ng/ μ L, y al agregarse al tubo de reacción las muestras tuvieron una concentración promedio de 1.6 ng/ μ L.

Se realizó la reacción de PCR con el DNA extraído de las muestras inoculadas con los diferentes patógenos. En la electroforesis en gel de agarosa al 2% que se realizó después de la reacción de PCR, se pudieron observar las bandas correspondientes a la región del gen de la hemolisina, listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* (Figura 20) aproximadamente en 210 pb, estas bandas no fueron muy intensas pero sí bien definidas durante todo el muestreo. En el caso de *Salmonella* Typhimurium (Figura 21) se observaron bandas intensas correspondientes a la región ITS (espaciador interno transcrito) aproximadamente a 312 pb definidas durante todo el muestreo. La intensidad que presentaron las bandas era esperable ya que los conteos en placa para *Listeria* fueron del orden de 10^2 con lo cual se esperaban banda poco intensas, en cambio, la intensidad de las bandas de *Salmonella* fue mayor al presentar conteos mas altos que los de *Listeria*.

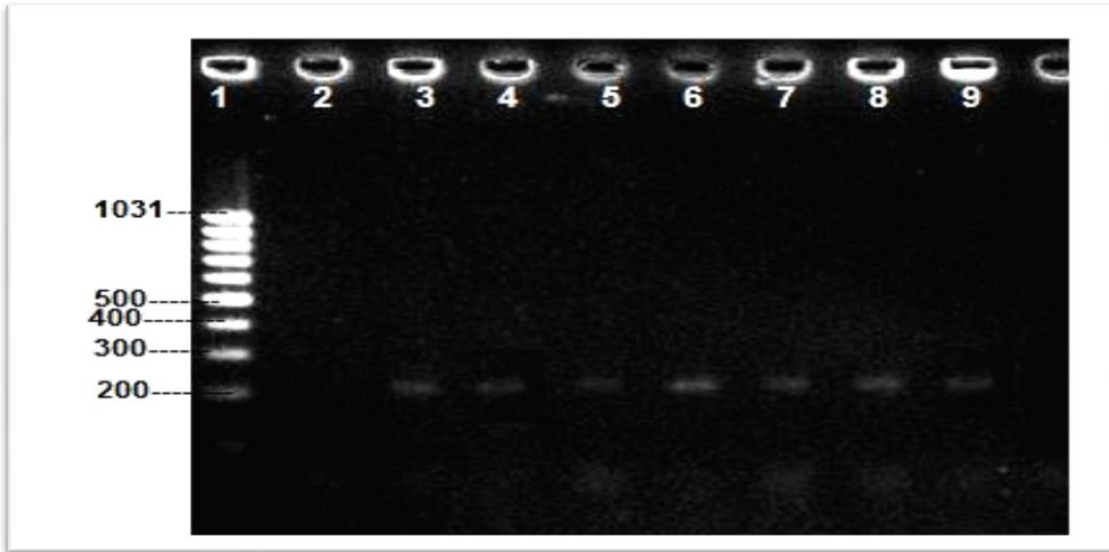


Figura 20. Productos de PCR característicos de la región correspondiente al gen de la hemolisina, listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* identificadas en las muestras de carne utilizadas en el muestreo. Carril 1 marcador, carril 2 control negativo, carril 3 Tiempo 0 (0 horas), carril 4 Tiempo 1 (2 horas de almacenamiento en congelación), carril 5 Tiempo 2 (24 horas en congelación), carril 6 Tiempo 3 (1 semana en congelación), carril 7 Tiempo 4 (2 semanas en congelación), carril 8 Tiempo 5 (3 semanas en congelación), carril 9 Tiempo 6 (4 semanas en congelación).

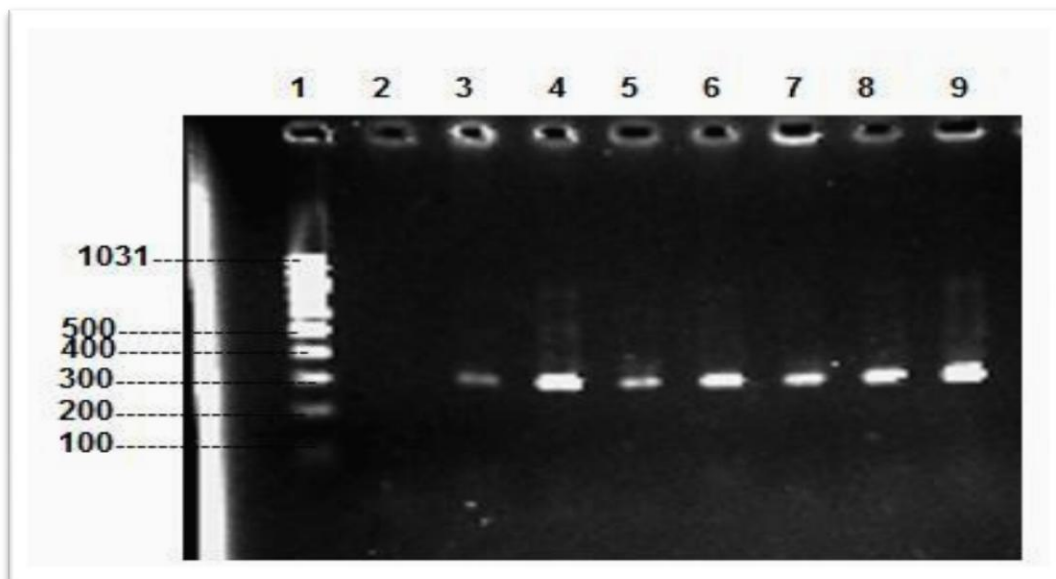


Figura 21. Productos de PCR característicos de la región ITS (internal transcribed spacer) características del *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* identificadas en las muestras de carne utilizadas en el muestreo. Carril 1 marcador, carril 2 control negativo, carril 3 Tiempo 0 (0 horas), carril 4 Tiempo 1 (2 horas de almacenamiento en refrigeración), carril 5 Tiempo 2 (24 horas en congelación), carril 6 Tiempo 3 (1 semana en congelación), carril 7 Tiempo 4 (2 semanas en congelación), carril 8 Tiempo 5 (3 semanas en congelación), carril 9 Tiempo 6 (4 semanas en congelación).

Se realizó una reacción de PCR a las colonias diferentes a las colonias típicas que crecieron en las cajas donde se cuantificaron las bacterias sobrevivientes, para verificar que no se tratara de *Salmonella* o de *Listeria*. Se tomó 1 colonia de las cajas de agar Oxford correspondiente al tiempo 4 de muestro (1 semana de congelación) y 2 colonias de las cajas de agar XLD correspondientes al tiempo 3 de muestreo (24 horas de congelación); se les extrajo el DNA con el método químico - enzimático y se realizó la reacción de PCR con los primers específicos para cada bacteria patógena. Se cuantificaron las muestras de DNA extraído con el espectrofotómetro y se calculó la calidad del DNA (Tabla 21).

Tabla 21. Concentración de DNA obtenidos de la extracción realizada a las colonias “no típicas” que crecieron en las cajas de agar Oxford y agar XLD.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Calidad	Concentración (ng/μl)
SC	0.0487	0.0371	1.313	12.175
SG	0.0196	0.0123	1.593	4.9
LG	0.0888	0.0533	1.666	22.2

SC: Colonia de tamaño pequeño tomada del agar XLD, SG: Colonia de tamaño grande tomada del agar XLD, LG; Colonia grande tomada del agar Oxford

Como se obtuvo una concentración baja de DNA las muestras no se diluyeron y se tomaron 10 μl necesarios para realizar la reacción de PCR. La concentración de DNA en el tubo de reacción de la colonia pequeña tomada del agar XLD fue de 2.43 ng/μL, para la colonia grande tomada del mismo medio fue de 0.98 ng/μL, y para la colonia grande tomada del agar Oxford fue de 4.44 ng/μL.

Se realizó la reacción de PCR con los primers propios de cada tipo de bacteria y después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar si se obtuvieron productos de PCR (Figura 22). En la electroforesis se pudo observar que para las colonias grande y de consistencia cremosa (SG), pequeña y puntiforme (SC) tomadas de la caja de agar XLD y para la colonia grande y de consistencia cremosa (LG) tomada de la caja de agar Oxford se obtuvieron bandas tenues pero definidas de aproximadamente 312 pb correspondientes a los

productos de PCR obtenidos para *Salmonella*, para la colonia (SC) también se pudo observar una banda de poca intensidad de aproximadamente 210 pb que pueden ser correspondientes a los productos de PCR de *Listeria monocytogenes*.

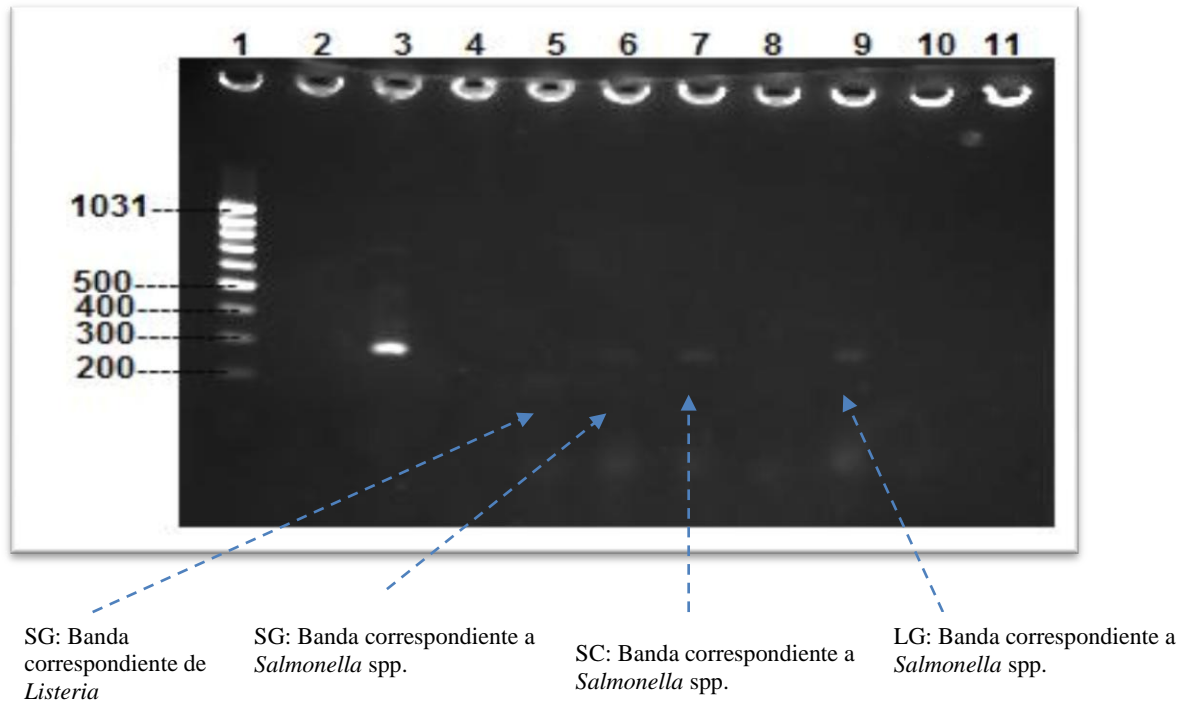


Figura 22. Gel de agarosa al 2%, carril 1 marcador molecular, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo de *Salmonella*, carril 4 control positivo de *Listeria*, carril 5 colonia (SG) tomada de la caja de agar XLD con primers de *Listeria*, carril 6 colonia (SG) tomada de la caja de agar XLD con primers de *Salmonella*, carril 7 colonia (SC) tomada de la caja de agar XLD con primers de *Salmonella*, carril 8 colonia (SC) tomada de la caja de agar XLD con primers de *Listeria*, carril 9 colonia (LG) tomada de la agar Oxford con primers de *Salmonella*, carril 10 colonia (LG) tomada de la caja de agar Oxford con primers de *Listeria*.

Las bandas correspondientes a *Salmonella* spp. y aunque las colonias de las cuales se extrajo el DNA tenían morfología diferente algunas especies de *Salmonella* crecen agar XLD con colonias amarillas aunque esto es muy poco común (Thushani et al., 2003). En el caso de la colonia tomada del agar Oxford, aunque este medio contiene antibióticos para hacerlo selectivo solo para *Listeria*,

el crecimiento de una colonia identificada como *Salmonella* sería un indicio de que la especie de *Salmonella* presente en la carne presenta una resistencia a estos antibióticos. Se descartó una contaminación de las muestras de DNA tanto en la realización de la reacción de PCR como la electroforesis ya que todo el material utilizado estaba estéril y se utilizaron reactivos recientes.

8. Conclusiones.

Se puso a punto una técnica de PCR para la detección de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium. Y *Listeria monocytogenes* en carne de res congelada, usando un kit comercial para extraer y purificar el DNA, usando los primers ITS (espaciador interno transcrito) para *Salmonella* y el Hyl (Listeriolisina) para *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

En cuanto a los límites de detección del método fue posible detectar concentraciones de microorganismos presentes en la carne en el orden de 10^1 UFC/g, después de un enriquecimiento en caldo BHI durante 14 horas a 37°C.

Durante el almacenamiento en congelación de carne inoculada con *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium y con *Listeria monocytogenes*: Se detectó la presencia de ambas bacterias en todas las muestras de carne congelada analizadas durante las 4 semanas que duró el muestreo

Durante la evaluación de la sobrevivencia en congelación a -14°C de bacterias patógenas en carne congelada el número de UFC/g de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium disminuyó de 6.5×10^3 a 2.3×10^3 UFC/g y para el caso de *Listeria monocytogenes* la cantidad de UFC/g disminuyó 1.5×10^3 a 6.9×10^2 .

Al realizar la reacción de PCR con el DNA de extraído de las muestras sometidas a congelación se obtuvieron las bandas esperadas tanto para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium.

El número de UFC/g de bacterias mesófilas se mantuvo constante durante el almacenamiento a -14°C.

Se confirmó que las bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium, sobreviven durante la congelación de la carne y que la cuenta de mesófilos aerobios disminuye lentamente en las mismas condiciones.

Se cuenta entonces con un control para comparar con el efecto de la aplicación de presión hidrostática ultra alta en la carne antes de su congelación.

9. Preparación de reactivos

-Buffer de Fosfatos 0.1 M pH 6 (500 mL).

Preparar por separado las soluciones 0.1 M de Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y de Fosfato ácido de sodio (NaH_2PO_4). Tomar 46.6 mL de NaH_2PO_4 y 3.4 mL de Na_2HPO_4 mezclarlos y aforar con agua destilada a 500 mL.

-EDTA 0.5 M pH 8.

Para preparar 100 mL: Pesar 18.612 g de EDTA (J.T Baker) y disolver en unos 70-80 mL de agua. Ajustar el pH a 8 con lentejas de NaOH y luego aforar a 100 mL con agua destilada.

-SDS 10%.

Para 1 L pesar 100 g de SDS en 900 mL de agua destilada. Calentar a 68°C para ayudar a que se disuelva. Ajustar el pH a 7.2 añadiendo unas gotas de HCl concentrado. Aforar el volumen a un litro con agua y guardar. Pesar el SDS usando un cubrebocas y se dispersan fácilmente.

-Solución de cloruro de sodio 5M. (NaCl 5M).

Para preparar 500 mL de solución pesar 146.25 g de cloruro de sodio (J.T Baker) disolverlo y aforar a 500 mL.

-Proteinasa K (1mg/mL).

Disolver 100 mg de la enzima Proteinasa K (Sigma- Aldrich) en 5 mL de agua estéril y después guardar en en microtubos de 1 mL y congelar.

-Mutanolisina (1UI/mL).

Diluir 10 mg de la enzima mutanolisina (Sigma - Aldrich) en 10 mL de agua estéril y guardar en microtubos de 1 mL.

-Pronasa (20 mg/mL).

La pronasa (Sigma – Aldrich) es una mezcla de serin-proteasas y proteasas ácidas de *Streptomyces griseus*.

Pretratamiento: La pronasa-autodigerida se prepara disolviendo la enzima en polvo en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5); NaCl 10 mM para tener una concentración de 20 mg/mL de enzima. Una vez disuelta incubar a a 37°C por una hora. Posteriormente guardar la enzima en alícuotas pequeñas a -20°C.

-RNA'asa (20 mg/mL).

Pesar la cantidad de enzima RNA asa (Sigma –Aldrich) de acuerdo al volumen a preparar y aforar con agua estéril. Por ejemplo: 0.2 g de enzima para preparar 10 mL. Una vez preparada la enzima guardar a -20°C en alícuotas pequeñas.

La preparación de la enzima deberá hacerse en frío, es decir manteniendo el matraz y la enzima siempre en hielo.

-Lisozima (20 mg/mL).

Pesar la cantidad de enzima Lisozima (Sigma-Aldrich) de acuerdo al volumen a preparar y aforar con agua estéril. Por ejemplo: 0.2 g de enzima para preparar 10 mL. Una vez preparada la enzima guardar a -20°C en alícuotas pequeñas.

La preparación de la enzima deberá hacerse en frío, es decir manteniendo el matraz y la enzima siempre en hielo.

El matraz y la espátula que se utilizen deben enjuagarse antes con agua estéril.

-Etanol al 75%.

Tomar 75 mL de etanol absoluto (J.T. Baker) y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

-Primers.

Diluir los primers (Invitrogen) en 200 μ L de agua estéril para dejarlos en una concentración 20X después se guardaron en tubos de 600 μ L.

Para dejar los primers a una concentración 1X los primers se toman 2 μ L en 38 μ L de agua estéril.

-Glicerol al 12%.

Se preparo 100 mL de una solución al 50% de glicerol (J.T Baker) (solución stock) y tomar 4.8 mL de la solución stock y aforar a 20 mL para tener la solución de glicerol al 12%. Guardar en microtubos de 600 μ L.

-Tween-20 al 0.01%.

Se preparo una solución al 0.1% de Tween-20 (Sigma- Aldrich) (solución stock) y tomar 2 mL de la solución stock y aforar a 20 mL para obtener la solución de Tween 20 al 0.01%. Guardar en microtubos de 600 μ L

-Buffer TBE 10X.

Para preparar 1 L se pesan: 68 g de Tris (Sigma), 55.4 g de ácido bórico (Sigma) y se mezclan con 40 mL de EDTA (J.T Baker) y se afora a 1 L con agua destilada.

-Buffer TBE 1X.

Para preparar 500 mL de buffer diluir 50 mL de buffer 10X en 450 mL de agua destilada.

-Buffer TES 10X.

Para preparar 100 mL se pesan: 0.605 g de Tris (Sigma), 0.2922 g de NaCl (J.T Baker) y 1 mL de EDTA (J.T Baker) 0.5 M pH 8, y se aforan a 100 mL con agua destilada.

10. Bibliografía

1. Alcázar Montañez, C. D., Salud, R. L., Nuñez Espinosa, F., Alonso Morales, R. (2006). Detección de Salmonella spp y Listeria monocytogenes en quesos frescos y semimaduros que se expenden en la vía pública en la ciudad de México. *Veterinaria México* , 417-429.
2. Amagliani, G., Gianmmarini, C., Omiccioli, E., Brandi, G., Magnani, M. (2007). Detection of Listeria monocytogenes using a comercial PCR Kit and differrent DNA extraction methods. *Food Control* , 1137-1142.
3. Archer, D. L. (2004). Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of food Microbiology* , 127-138.
4. Arguedas-Villa, C., Stephan, R., & Tasara, T. (2010). Evaluation of cold growth an8.d related gene transcription response associated with Listeria Monocytogenes strains of different rigins. *Food Microbiology* , 653-660.
5. Beuchat, L. R. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology* , 134-142.
6. Bohaychuk, V., Gensle, G., King, R., Wu, J., McMullen, L. (2005). Evaluation of detection methods for screening meat and poultry products for the presence of foodborne pathogens. *Journal of food protection* , 2637-2647.
7. Callejo, M., Prieto, M., Martinez, C., Aguirre, L., Rocca, F., Palmieri, O. (2008). Estudios Mediante PCR Multiple de serotipos de Listeria Monocytogenes aislados en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* , 89-92.
8. Charley, H. (2004). *Tecnología de Alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos*. México: Limusa.
9. Cortazar Martínez, A., Silva Rincón, E. P. (2004). *Métodos Físico-Químicos en biotecnología*. México D.F.
10. Davalieva, K., & Efremov, G. (2010). Influence of salt and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostables DNA polymerases. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical engineering* , 57-62.
11. Díaz Ruíz, G., Wachter Rodarte, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 30-40.
12. Dominguez, S., & DW., S. (2009). Survival of salmonella in processed chicken products during frozen storage. *Journal of Food Protection* , 2088-2099.

13. Doyle, M. P., Beuchant, L. R., & Montville, T. L. (2001). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press.
14. Elizalde, P., Díaz, E., Hernández, L., Jaramillo, C. (2001). Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*. *Saúde Pública* , 380-384.
15. El-Kest, S., Math, E. (1992). Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganism: a review. *Journal of Food Protection* , 639-648.
16. Ferri, F. F. (2003). *Consultor Médico*. Madrid, España: Hartcourt/Oceano.
17. Flessa, S., Lusk, D., Harris, L. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh an frozen strawberries. *Food Microbiology* , 255-262.
18. Gonzalez Flores, T., Rojas Herrera, R. A. (2005). Enfermedades Transmitidas por Alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* , 388-399.
19. Gutierrez Cogo, L., Montiel Vázquez, E., Aguilera Pérez, P., González Andrade, M. d. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* , 490-495.
20. Ingianni, A., Quartuccio, M., Madeddu, A., Sanna, A., Dessi, S., Pompei, R. (2007). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in processed meat by combined cultural molecular method. *American Journal of Infectious Diseases* , 159-164.
21. Kerry, J., Kerry, J., Ledward, D. (2002). *Meat Processing: Improving Quality*. Boca Raton: Acriba.
22. Lambertz, S., Nilsson, C., Hallanvuo, S., Lindbal, M. (2008). Real-Time PCR method for detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Applied and Environmental Microbiology* , 6060-6067.
23. Levin, R. E. (2010). *Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques*. Boca Raton: CRC Press.
24. Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., & Alvarez, E. (2006). Detección de *E. coli* O157:H7. *Revista Argentina de Microbiología* , 38-40.
25. Maurer, J. (2006). *PCR Methods in foods*. Georgia: Springer.
26. Medellin Vega, D. (2006). *Brucella abortus: antecedentes y avances en aspectos de patogenesis, diagnóstico y control*. Bogota: Pontificia universidad javeriana.

27. Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acid Research* , 3309-3310.
28. Moussa, I., Gassem, M., Al-Doss, A., Mahamoud, W., Mawgood, A. (2010). Using molecular techniques for rapid detection of Salmonella serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh. *African Journal of Biotechnology* , 610-612.
29. Niemira, B., Sommers, C., Boyd, G. (2003). Effect of freezing, irradiation, and frozen storage on survival of Salmonella in concentrated orange juice. *Journal of Food Protection* , 1916-1919.
30. Nørrung, B., Buncic, S. (2008). Microbial Safety of meat in the European Union. *Meat Science* , 14-24.
31. Oyarzábal, O., Nogueira, M., Gombas, D. (2003). Survival of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella in Juice concentrate. *Journal of Food Protection* , 1595-1598.
32. Patterson, M. (2005). Microbiology of Pressure-treated food. *Journal of Applied Microbiology* , 1400-1409.
33. Pelisser, M., Klein, C., Acoli, K., Zotti, T., Maisonnave, A. C. (2009). Occurrence of Staphylococcus aureus and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology* , 145-148.
34. Prändl, O. (1992). *Tecnología e higiene de la carne*. Madrid: Acriba.
35. Roche. (Diciembre de 2006). *Roche*. Recuperado el 1 de Julio de 2011, de Roche applied science: www.roche-applied-science.com
36. Rodrigues, D., Landgraf, M., Destro, M. (2002). Evaluation of two commercial methods for the detection of Listeria sp. and Listeria monocytogenes in chicken nuggets. *Canadian Journal of Microbiology* , 275-278.
37. Rodríguez Sánchez, I., Barrera Saldaña, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* , 323-325.
38. Ruiz-Rueda, O., Soler, M., Calvo, L. (2010). Multiplex Real-Time PCR for the Simultaneous Detection of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in Food Samples. *Food Analysis Methods* .
39. Sheridan, J. (1997). THE EFFECT OF FREEZING ON THE SURVIVAL OF PATHOGENS IN DIFFERENT MEAT TYPES AND THE EFFECT OF VARYING LEAN FAT RATIO. *The society of food hygiene and technology* .

40. Simpson Beauchamp, C., Byelashov, O., Geornaras, I., Kendall, P., Scanga, J., Belck, K., y otros. (2010). Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage frankfurters. *Food Microbiology* , 144-149.
41. Sofos, J. N. (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat science* , 3-13.
42. Sun Park, y., Rok Lee, S., Kim, G., Young. (2006). Detection of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimichi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *The Journal of Microbiology* , 92-97.
43. Suo, B., He, Y., Tu, S.-I., Shi, X. (2010). A Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction, for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foodborne pathogens and disease* .
44. Thushani, W., Ariyawansa, K., Arampath, P. (2003). Recovering ability of freeze-stressed *Salmonella* Typjimurium and *Staphylococcus aureus* cells in frozen shrimp. *Journal of science* , 61-67.
45. Toarmina, P., Dorsa, W. (2010). Survival and death of *Listeria monocytogenes* on cooked bacon at three storage temperatures. *Food microbiology* , 667-671.
46. Trkov, M., Jeras-ek, B., Rijpens, N., Kuchta, T. (1999). Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology* , 393-399.
47. Vidal, J., Canizález-Román, A., Gutierrez-Jiménez, Javier, Fernando, N.-G. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México* , 376-386.
48. Warris, P. (2003). *Ciencia de la carne*. Zaragoza: Acriba.
49. Willenberg, B. J. (2006). Freezing Basics. *Outreach and extentionción. University of Missouri* .
50. Zaidi, M. B., López Macías, C., Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 121-125.
51. Zhang, D., Zhang, H., Yang, L., Guo, J., Li, X., Feng, Y. (2009). Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using multiplex PCR method. *Journal of Food Safety* , 348-363.