



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE *E. COLI*
ENTEROPATOGÉNICA (EPEC) EN HAMBURGUESAS
CONGELADAS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:
SARAHÍ IRIARTE SIERRA**



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: AURORA IRMA ORTEGON AVILA

VOCAL: Profesor: GLORIA DIAZ RUIZ

SECRETARIO: Profesor: MARTHA GILES GOMEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: Profesor: ALEIDA MINA CETINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO A 1ER PISO LABORATORIO 1C ANEXO
CEPARIO**

ASESOR DEL TEMA:

M en B. Martha Giles Gómez

SUSTENTANTE:

Sarahi Iriarte sierra

ÍNDICE

1.	RESUMEN	11
2.	INTRODUCCION Y JUSTIFICACIÓN	13
3.	MARCO TEORICO.....	16
3.1.1.	<i>Escherichia coli</i>	16
3.1.2.	<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC).....	19
3.1.3.	Fisiopatología.....	19
3.1.4.	Mecanismo de patogenicidad.....	20
3.1.5.	Adherencia inicial.....	20
3.1.6.	Pilus formador de penachos BFP (Bundle-Forming Pillus).....	20
3.1.7.	Inyección de factores y transducción de señal.....	20
3.1.8.	Proteínas secretadas.....	21
3.1.9.	Formación de pedestales.....	22
3.1.10.	Mecanismo de transmisión de EPEC.....	23
3.1.11.	Población susceptible.....	23
3.1.12.	Métodos de diagnóstico.....	24
3.1.13.	Serotipificación.....	24
3.1.14.	Fenotipo de adherencia localizada (LA).....	24
3.1.15.	Tinción fluorescente para actina (FAS).....	25
3.1.16.	ARNr 16s.....	26
3.1.17.	Aplicaciones en el diagnóstico microbiológico.....	28
3.1.18.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
3.1.19.	PCR Múltiple.....	31
3.1.19.	Características de los primers en la PCR-múltiple.....	31
3.1.20.	Electroforesis en gel de agarosa.....	32
3.1.21.	Carne y productos cárnicos.....	33
3.1.22.	Composición nutricional de la carne.....	33
3.1.23.	Consumo de carne.....	34
3.1.24.	Carne molida.....	36
3.1.25.	Salud pública.....	37
3.1.26.	Límites microbiológicos en la carne molida.....	38
4.	HIPOTESIS.....	39

5.	OBJETIVOS	39
5.1.1.	Objetivo general.....	39
5.1.2.	Objetivos individuales.....	39
6.	METODOLOGÍA.....	40
6.1.1.	Reactivación celular.....	41
6.1.2.	Características coloniales.....	41
6.1.3.	Características microscópicas.....	41
6.1.4.	Características fenotípicas en medios de cultivo selectivos.....	41
6.1.5.	Conservación a largo plazo.....	42
6.2.	Identificación fenotípica.....	42
6.2.1.	Pruebas bioquímicas convencionales.....	42
6.2.2.	Identificación por el sistemas miniaturizado (API 20E).....	44
6.2.3.	Identificación por el sistema estandarizado VITEK.....	45
6.3.	IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA.....	45
6.3.1.	Extracción de DNA cromosomal de la cepa pura.....	45
6.3.2.	Electroforesis en gel de agarosa.....	46
6.3.3.	Amplificación del gen ARNr 16s.....	47
6.3.4.	Purificación del producto de PCR del gen ARNr 16s.....	49
6.3.5.	Secuenciación del gen ARNr 16s.....	49
6.3.6.	Análisis de secuencia del gen ARNr 16s.....	50
6.3.7.	Análisis filogenético del gen ARNr 16s.....	50
6.4.	PCR-Múltiple de la cepa pura <i>E. coli</i> Enteropatógena para los genes <i>bfp</i> y <i>eae</i>	51
6.4.1.	Diseño de primers (genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>).....	51
6.4.2.	Estandarización del PCR para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>	52
6.4.2.1.	Gradiente de temperatura de alineamiento.....	52
6.4.3.	Secuenciación de los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>	54
6.4.4.	Realización de dendogramas para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>	55
6.4.5.	Amplificación por PCR-Múltiple para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de la cepa <i>E. coli</i> Enteropatógena. Gradiente de concentración de primers.....	55
6.4.6.	Amplificación por PCR-Múltiple para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de la cepa <i>E. coli</i> Enteropatógena. Gradiente de concentración de MgCl ₂	56
6.5.	Amplificación por PCR-Múltiple para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de la cepa <i>E. coli</i> Enteropatógena en hamburguesas de carne de res congeladas (marca SuKarne). 56	56

6.5.1. Preenriquecimiento de la carne congelada para hamburguesas de la marca SuKarne.	57
6.5.2. Muestras de carne de la marca SuKarne previamente inoculadas.	58
6.5.3. Estandarización de la concentración de inóculo inicial de la cepa EPEC.	59
6.5.4. Pruebas a diferentes concentraciones de inóculo.	60
6.5.5. Toma de muestras en carne inoculada y sin inocular.	61
6.5.6. Cuantificación del desarrollo de coliformes a partir de las muestras.	62
6.5.7. Extracción de DNA cromosomal a partir de la muestra.	62
6.5.8. PCR Múltiple a partir de la muestra inoculada.	62
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	63
7.1.1. Desarrollo presentado en medios generales.	63
7.1.2. Tinción de Gram.	66
7.1.3. Pruebas bioquímicas convencionales en tubo	66
7.1.4. Identificación por el sistema API 20E.	67
7.1.5. Identificación por el sistema VITEK de la cepa EPEC.	71
7.2. Identificación molecular.	72
7.2.1. Extracción de DNA cromosomal.	73
7.2.2. PCR amplificación del gen ARNr 16s y purificación.	74
7.2.3. Secuenciación del gen ARNr 16s.	75
7.2.4. Análisis filogenético.	76
7.2.4.1. Árbol filogenético por Neighbor-Joining de gen ARNr 16s.	76
7.2.5. PCR múltiple a partir de DNA cromosomal extraído de la cepa pura.	79
7.2.5.1. Diseño de primers.	79
7.2.6. Optimización y amplificación de los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> -Gradiente de temperatura.	81
7.2.6.1. Gradiente de temperatura para el gen <i>eae</i>	81
7.2.6.2. Gradiente de temperatura para el gen <i>bfp</i>	82
7.2.6.3. Optimización de temperatura de alineamiento para los primers en ambos genes.	83
7.2.6.4. Gradiente de MgCl ₂	84
7.2.6.5. Prueba de concentración de primers.	86
7.2.6.6. Secuenciación de genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>	88
7.2.7. Construcción de dendogramas.	88
7.2.7.1. Dendograma gen <i>eae</i>	88

7.2.7.2. Dendograma gen <i>bfp</i>	90
7.2.8. Extracción de ADN cromosomal a partir de la muestra sin inocular.	93
7.2.9. Análisis molecular a partir de la muestra de carne inoculada.....	94
7.2.1. Determinación de sensibilidad del método.....	95
8. CONCLUSIONES	100
9. BIBLIOGRAFIA	101
10. ANEXOS	105
11. Anexo I.....	105
EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE LA CEPA PURA	105
12. Anexo II.....	108
PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE DNA.....	108
13. Anexo III.....	110
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DEL ALIMENTO	110
14. Anexo IV	112
Composición de sustratos de las tiras API 20E.....	112
15. ANEXO VI.....	113
Sustratos empleados en la tarjeta de identificación para Gram-Negativos por el sistema VITEK	113
Anexo VI	115
Secuencia parcial del ANR 16s de la cepa <i>Escherichia coli</i> Enteropatogénica en formato FASTA del programa BioEdit.....	115
Secuencia consenso del gen <i>eae</i> en formato FASTA del programa BioEdit.....	115
Secuencia del Fw del gen <i>bfp</i> en formato FASTA del programa BioEdit.....	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Identificación bioquímica de <i>E. coli</i>	16
Tabla 2.- Características de los grupos de <i>E. coli</i> causantes de diarrea.....	18
Tabla 3.- Frecuencia de aislamientos de EPEC.....	25
Tabla 4.-Composición nutricional de diversos tipos de carnes por 100 g.....	33
Tabla 5.-Compuestos de la carne de res.....	34
Tabla 6.-Datos del consumo de carne per cápita.....	34
Tabla 7. - Límites microbiológicos permisibles en carne molida.....	38
Tabla 8.-Mezcla de reacción para amplificación del gen ARNr 16s.....	48
Tabla 9.-Condiciones de amplificación del gen ARNr 16s en termociclador.....	48
Tabla 10. Mezcla para secuenciación del gen ARNr 16s.....	49
Tabla 11.-Oligonucleótidos seleccionados para cada gen y sus características teóricas..	52
Tabla 12.- Mezcla de reacción para el gen <i>eae</i> de <i>E. coli</i> Enteropatógena.....	53
Tabla 13.-Mezcla de reacción para el gen <i>bfp</i> de <i>E. coli</i> Enteropatógena.....	53
Tabla 14.-Condiciones de amplificación del gradiente de temperatura para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de <i>E. coli</i> Enteropatógena.....	54
Tabla 15.-Composición del caldo tripton de doble fuerza (BAM, 2011).....	58
Tabla 16.-Resultados del desarrollo presentado por las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229 en medios generales, medios selectivos y diferenciales.....	64
Tabla 17.-Resultados de la tinción de Gram a las cepas EPEC y ATCC 11229.....	66
Tabla 18.-Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas EPEC y la <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	67
Tabla 19.-Resultados del método API 20E para las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229..	68
Tabla 20.-Resultados de las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229, del método API 20E obtenidos del programa APIweb.....	69
Tabla 21 .-Resultados obtenidos por la cepa EPEC de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK (Biomerieux).....	71
Tabla 22.-Resultado obtenido por la cepa EPEC empleando el sistema VITEK (Biomerieux).....	71
Tabla 23.-Datos obtenidos de las muestras purificadas del gen ARNr 16s analizadas por el Nanodrop para las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	75
Tabla 24.- Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen ARNr 16s.....	78
Tabla 25.-Oligonucleótidos sintetizados y sus características otorgadas por el proveedor.....	80
Tabla 26.-Reporte de síntesis para cada oligonucleótido.....	80
Tabla 27.-Condiciones óptimas para la amplificación múltiple.....	84
Tabla 28.-Mezcla de reacción para la PCR múltiple de los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de <i>E. coli</i> Enteropatógena.....	87
Tabla 29.-Condiciones de amplificación para los genes <i>eae</i> y <i>bfp</i> de <i>E. coli</i> Enteropatógena.....	87
Tabla 30.-Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen <i>eae</i>	89
Tabla 31.-Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen <i>bfp</i>	92

Tabla 32.-Resultados de cuantificación del desarrollo de <i>E. coli</i> Enteropatógena, en muestra de carne inoculada concentración 10^4	96
Tabla 33.-Resultados de cuantificación del desarrollo de <i>E. coli</i> Enteropatógena, en muestra de carne inoculada. Concentración 10^3	96
Tabla 34.-Resultados de cuantificación del desarrollo de <i>E. coli</i> Enteropatógena, en muestra de carne inoculada concentración de 10^1	97
Tabla 35.-Resultados de cuantificación del desarrollo de <i>E. coli</i> Enteropatógena, en muestra de carne inoculada 10^0	97

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.-Distribución de casos de Intoxicación Alimentaria Bacteriana por año.....	13
Figura 2.-Modelo esquemático de las etapas de la infección por EPEC.....	21
Figura 3.-Microscopia electrónica de barrido de células de EPEC	22
Figura 4.-Estructura secundaria del ARNr 16s.	28
Figura 5.-Grafica de la producción de carne per cápita vs Consumo de carne per cápita en países en desarrollo.....	35
Figura 6.-Fuentes de abastecimiento de carne a nivel mundial en 2007.....	36
Figura 7.-Diagrama de metodología general.	40
Figura 8.-Galerías con los estándares negativos y positivos.....	45
Figura 9.-Marcador de peso molecular O' GeneRuler de 1 kb DNA	47
Figura 10.-Metodología seguida con las muestras de carne sin inocular e inoculada.....	57
Figura 11.-Esquema general del preenriquecimiento para las muestras de carne congeladas para hamburguesas (SuKarne).	58
Figura 12.-Esquema seguido para la estandarización del inóculo.....	59
Figura 13.- Esquema seguido durante la prueba a diferentes concentraciones de inóculo con EPEC.	61
Figura 14.-Desarrollo en agar Luria de la morfología colonial presentada por las cepas empleadas en el estudio en agar Luria. EPEC, <i>E. coli</i> ATTC 11229.....	63
Figura 15.-Colonias de las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229 en distintos medios de cultivo y tinción de Gram.....	65
Figura 16.-Galerías API 20E reveladas de las cepas EPEC y <i>E. coli</i> <i>E. Coli</i> ATTC 11229.	69
Figura 17.-Fichas de identificación para las cepas EPEC (A) y <i>E. coli</i> ATCC 11229 (B)...	70
Figura 18.-Electroforesis del DNA cromosomal, en gel de agarosa al (1%).....	73
Figura 19.-Electroforesis del producto de PCR del gen ARNr 16s en gel de agarosa al (1%)	74
Figura 20.- Árbol filogenético del gen ARNr 16s para las cepas EPEC y <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	77
Figura 21.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del gradiente de temperatura para el gen <i>eae</i>	81
Figura 22.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) para el gradiente de temperatura para el gen <i>bfp</i>	82
Figura 23.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) de la amplificación de genes a 56 °C.	83
Figura 24.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del gradiente de concentración de MgCl ₂	85
Figura 25.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) para el gradiente de concentración de primers.	86
Figura 26.-Dendograma gen <i>eae</i>	88
Figura 27.-Dendograma gen <i>bfp</i>	91
Figura 28.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) de la extracción del ADN cromosomal sin inocular.	93

Figura 29.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada.	95
Figura 30.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada.	98
Figura 31.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada a la dilución 10^0 UFC/g (1 UFC/g).....	99

1. RESUMEN

Las enfermedades gastrointestinales son de los principales problemas de salud pública en México. La Organización Mundial de la salud define a las enfermedades transmitidas por los alimentos como infecciosas o tóxicas en la naturaleza, causadas por agentes que entran al cuerpo a través de la ingesta de alimentos. Entre los géneros involucrados se encuentra el *Escherichia*. Las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades gastrointestinales se dividen en 6 categorías, con base en sus mecanismos de patogenicidad, *E. coli* Enteropatógena (EPEC) es una de los patotipos que es identificado mediante diferentes técnicas como patógeno causante de diarrea. La importancia de este patógeno radica, en su capacidad de adherirse a las células epiteliales provocando la clásica lesión histopatológica de adherencia y borrado, como parte su patogenicidad. La población infantil es la más afectada por este microorganismo.

E. coli fue establecido como uno de los principales patógenos de origen alimenticio; ya que es muy fácil su contaminación por forma cruzada, mala manipulación durante la preparación y por almacenamiento sin las condiciones adecuadas, lo que facilita la proliferación del microorganismo.

Dentro de la amplia existencia y variedad de cepas pertenecientes al género *Escherichia* y como parte de nuestra microbiota intestinal, no todas son patógenas ni presentan algún peligro al organismo huésped por lo que se requiere el diseño de métodos lo suficientemente sensibles para diferenciar a las cepas patógenas de las inocuas.

En este proyecto se realizó la identificación fenotípica mediante pruebas bioquímicas tradicionales y estandarizadas como el método API 20E y VITEK. La identificación molecular se realizó mediante el análisis del gen ARNr 16s, el cual se amplificó mediante la técnica de PCR punto final y secuenciándose en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología (IBT), de la UNAM y se elaboró el análisis filogenético.



Se corroboró la identidad y se realizó un pre enriquecimiento de la cepa pura siguiendo la metodología recomendada por el Bacteriological Analytical Manual (BAM). Se desarrolló el PCR-Múltiple con la cepa pura utilizando como blanco molecular los genes *eae* y *bfp*, que se conoce están relacionados directamente con la patogenicidad de este microorganismo, los primers fueron diseñados durante el proyecto para la identificación específica de la EPEC. La identificación se buscó a partir de muestras de DNA, extraídas de carne para hamburguesas congeladas de la marca comercial SU KARNE.

Se obtuvieron amplicones de alrededor de 1000 bp y de 2500 bp para cada gen, respectivamente. Éstos correspondieron a los genes buscados, al corroborar la identidad de la secuencia en la base de datos del GenBank.

Una vez realizadas las pruebas en la cepa pura se procedió a trabajar con la muestra inoculada con la cepa patógena, se realizó el PCR-múltiple para ambos genes a partir del DNA cromosomal total obtenido del caldo de enriquecimiento del alimento, así como del alimento inoculado con concentraciones de inóculo al 10^4 , 10^3 , 10^1 y 10^0 UFC/g de la cepa pura para las 0, 3 y 24 h de incubación. No se obtuvieron amplicones para la muestra de alimento no inoculado. En cambio, para las muestras inoculadas, independientemente de la concentración inicial, se determinó que la amplificación es posible desde las 0 h, obteniendo también los mejores resultados a este tiempo cuando la cepa ha desarrollado 1 UFC/g en la carne.



2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Mundialmente las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad entre los lactantes y niños. Dentro de este grupo las más frecuentes son las diarreas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año tienen lugar 1500 millones de casos en países en vías de desarrollo, resultando en muerte 1.5 millones. En México un estudio realizado en 2003 reportó a 4556 decesos causados por infecciones intestinales. En 2001 la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional y que los estados con mayor incidencia son: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y el Distrito Federal (*et al.* Hernández, 2011).

Las epidemias de diarrea en lactantes, niños y adultos suelen ser causadas por microorganismos presentes en el agua o en alimentos contaminados, (Hernández, 2011) y se encuentran dentro de las también llamadas “Enfermedades por transmisión de alimentos” (ETA’s).

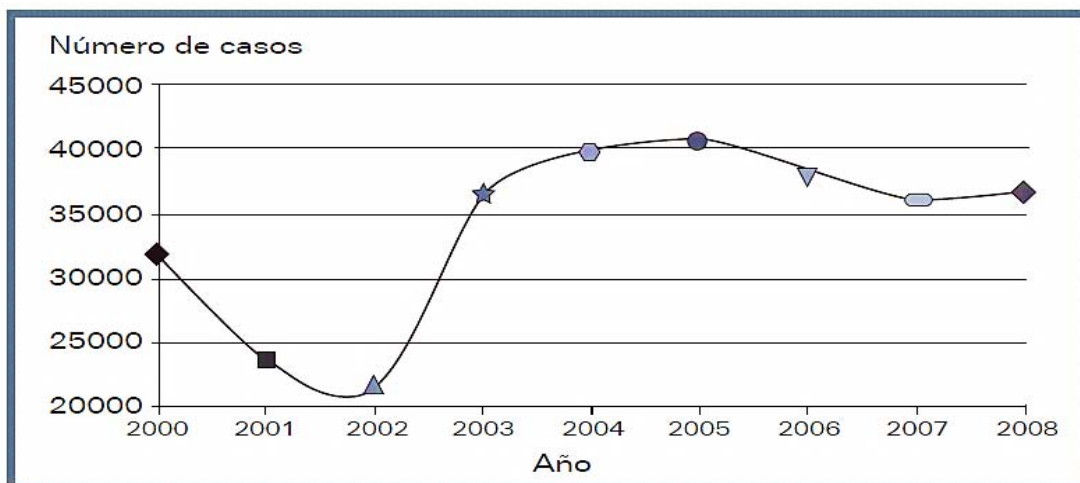


Figura 1.-Distribución de casos de Intoxicación Alimentaria Bacteriana por año.



En la figura 1 se presentan los datos obtenidos del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA (*et al.* Hernández, 2011).

Entre 2000 y 2008, el número de casos por intoxicación alimentaria debida a bacterias incrementó a partir de 2002. En 2007, el número comenzó a descender y, al parecer, se ha mantenido constante, pero sin bajar de los 35 000 casos.

Dentro de los géneros transmitidos a través de los alimentos, y causantes de infección en el humano se encuentra el género *Escherichia* y la especie *coli* es la más común (*et al.* Hernández, 2011). Esta bacteria es parte de la microbiota normal intestinal de los humanos, adquirida desde los primeros días de vida siendo un huésped constante del intestino del hombre (Anderson, 2000). Sin embargo dentro de este grupo se encuentran cepas patógenas que pueden desarrollar diferentes cuadros clínicos teniendo como principal síntoma la diarrea. Estas cepas, de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico en el que derivan, se clasifican en seis grupos: Enterotoxigénica (ETEC), Enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

E. coli Enteropatógena (EPEC), es un patógeno de riesgo potencial para la población infantil menor de 2 años, debido a la alteración histopatológica que genera en el intestino conocida como lesión A/E (Adherencia/Borrado) que deriva en la destrucción de microvellosidades (*et al.* Vidal, 2007), promoviendo la pérdida de minerales por la diarrea acuosa severa característica de esta infección y evitando la absorción de micronutrientes, provocando una desnutrición y finalmente la muerte. Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud de México, se ha reportado que la EPEC se presenta de manera endémica hasta en 6% de la población, y es agente causal del 17% al 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país. Esto nos indica que, en México, uno de cada cinco niños que enferma de diarrea puede estar infectado por este grupo de *E. coli* (Hernández, 2011).



La carne es uno de los alimentos más perecederos que existen, por su alto contenido de agua y nutrientes que favorece el crecimiento de microorganismos (NACAMEH, 2011). La seguridad microbiológica en productos cárnicos es de importancia para la salud pública. Numerosos reportes epidemiológicos han identificado cepas patógenas de *E. coli*, incluyendo EPEC identificadas en un 20.5% en carne de res (*et al.* Lee, 2009).

No todas las cepas pertenecientes al género *Escherichia* son patógenas de esto partimos para el desarrollo de métodos lo suficientemente sensibles, confiables y rápidos para la detección oportuna y acertada en la discrepancia entre las cepas inocuas y las patógenas.

En años recientes en el Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se han realizado proyectos en los que se emplean métodos de identificación fenotípica y molecular con el análisis del gen universal ARNr 16s, como la identificación de bacterias lácticas que realizó Cervantes (2010), en el que se comprobó que la identificación molecular es un método altamente confiable; ese mismo año el análisis del gen ARNr 16s complementado a otras técnicas, permitió demostrar la presencia de bacterias lácticas con potencial probiótico en el pulque proyecto realizado por Campos (2010).

El método fenotípico, fue empleado para determinar la diversidad de bacterias e identificar a las ácido lácticas, como principal grupo dentro de las Gram-positivas presentes en el pozol (Escalante, 2000). La identidad por comparación de secuencias del gen ARNr 16s, demostró la diversidad microbiológica presente en el pulque y demostrando el dominio del género *Lactobacillus*; así como la identificación de nuevas especies (Escalante, 2004).

Estos proyectos están enfocados en microorganismos de interés académico y benéfico para la salud pero se carece de la identificación específica para cepas patógenas. Por esta razón en este proyecto se trabajó con células de *E. coli* Enteropatógena (EPEC) obtenidas a partir de un alimento y generando su perfil fenotípico y molecular por medio del análisis del gen ARNr 16s y el empleo de técnicas como PCR y PCR múltiple, con genes específicos para este patógeno.



3. MARCO TEÓRICO

3.1.1. *Escherichia coli*

El género *Escherichia* el más común y aislado, ocupa una posición única entre los bacilos entéricos oportunistas ya que algunas cepas son capaces de causar enfermedades intestinales primarias, así como infecciones extra intestinales. Este género es conocido por la facilidad de adaptarse y crecer en muchos medios de cultivo comunes, por presentar movilidad y ser fermentador de lactosa, así como producir gas por la fermentación de la glucosa. Esta capacidad del microorganismo de fermentar o degradar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible es aprovechada para su identificación fenotípica (Macadán, 2004). En la tabla 1, se muestran las pruebas bioquímicas que son empleadas como parte de la identificación fenotípica y el porcentaje de positividad presentada por este género (Rodríguez, 2002).

Tabla 1.-Identificación bioquímica de *E. coli*

Prueba bioquímica	% cepas positivas	Prueba bioquímica	% cepas positivas
Oxidasa	0	Producción de Indol	98
Rojo de metilo	99	Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1	H ₂ S (agar triple azúcar hierro)	1
Hidrólisis de urea	1	Utilización de malonato	0
Acido a partir de glucosa	100	Gas a partir de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0	Lisina Descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17	Ornitina Descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95	Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3	Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50	Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94	Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60	Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5	Fermentación de Inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99	Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80	Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95	Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2	Fermentación de α-metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0	Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75	Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98	Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100	Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90	Lipasa (aceite de maíz)	0
DNA asa a 25 °C	0	ONPG	95

Tomado de Rodríguez, 2002.



E. coli pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae*, por lo tanto cumple con las características presentes por el grupo.

Características generales de la familia *Enterobacteriaceae*

- Bacilos Gram-Negativos rectos
- No formadores de esporas
- Anaerobios facultativos
- Catalasa variable, por lo común positivos
- Movilidad variable, si es positiva, flagelos peritricos
- Oxidasa-Negativos
- Oxidación/Fermentación de la glucosa F(fermentativos) o bien, F y O (oxidativos)
- Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C
- Crecimiento en McConkey (MAC)

Los aislamientos de *E. coli* difieren serológicamente debido a la presencia de 3 antígenos superficiales, los cuales desempeñan un papel muy importante en la epidemiología y la clasificación. Los principales antígenos son el antígeno O (somático), el H (flagelar), y el K (capsular). Hasta la fecha se han identificado 173 antígenos O, 56 antígenos H y 103 antígenos K y son utilizados para la identificación serológica de las cepas. Debido a variaciones antigénicas es posible la serotipificación de las cepas. En el caso específico de las cepas de *E. coli*, para su serotipificación solo requieren la determinación del antígeno O (somático) y el H (flagelar) (Meng, 2007).

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas, son categorizadas dentro de un grupo muy específico o patotipos basados en su virulencia, mecanismos de patogenicidad, cuadro clínico y el distinto serotipo O:H. Esta categoría incluye a *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* Enteropatogénica (EPEC). Las características de cada una, se muestran en la tabla 2, en la cual se especifica el lugar de acción en el huésped, cuadro clínico que desarrolla, factores de patogenicidad y principales serotipos que presenta cada uno (Rodríguez, 2002).



Tabla 2.-Características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea.

PATOTIPO	LUGAR DE ACCIÓN	CUADRO CLINICO	FACTORES DE PATOGENICIDAD	SEROTIPOS
EPEC	INTESTINO DELGADO	Diarrea infantil con fiebre, náuseas y heces sin sangre	Adherencia esfacelamiento y destrucción de las células epiteliales <i>BFP</i>	O55, O86, O111ab, O125, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, O142, O124, O114
ETEC	INTESTINO DELGADO	Diarrea del viajero e infantil en países subdesarrollados, diarrea acuosa retorcijones y nauseas	Enterotoxina termoestable y/o termolábil CFA	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159, O167
EIEC	INTESTINO GRUESO	Diarrea acuosa seguido de cuadros disentéricos con heces sanguinolentas	Invasión y destrucción de células epiteliales. Plásmido de 150 MDa	O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167, O124
EAEC	INTESTINO DELGADO	Diarrea infantil persistente a veces teñida con sangre y fiebre ligera.	Adherencia agregativa mediada por plásmido 60 MDa, fimbria AAI y II EASTI, proteína Pet y Pic	O3, O15, O44, O77, O86, O92, O111 Y O127
EHEC	INTESTINO GRUESO	Colitis hemorrágica con retortijones intensos, diarrea acuosa con heces teñidas de sangre y síndrome hemolítico urémico	Daño por toxinas de células endoteliales vasculares, verotoxinas adherencia y esfacelamiento	O26, O111,
DAEC	INTESTINO DELGADO	Diarrea infantil en niños de 1 a 5 años de edad.	Adherencia difusa sin formar microcolonias ni agrupaciones F1815 OMP	O1, O2, O21, y O75

- CFA= Antígeno Factor de Colonización.
- BFP= Pili con forma rizada.
- EAE= Adherencia esfacelamiento de EPEC.
- OMP= Proteína de la membrana externa.
- EAST= Toxina ST de cepas entero agregativas.

Tomado de Rodríguez, 2002



3.1.2. *E. coli* Enteropatógena (EPEC).

E. coli Enteropatógena (EPEC) por sus siglas en inglés, fue el primer patotipo descrito como causante de diarreas severas en infantes, teniendo una tasa alta de morbilidad y mortalidad, especialmente en países en desarrollo como México (Vidal, 2007). EPEC coloniza la mucosa del intestino delgado y grueso provocando diarreas en niños menores a 2 años. Se cuenta con 2 variedades para esta cepa, la atípica que solo cuenta con la presencia del gen que codifica para la intimina (*eae*) por *E. coli*, y la típica que cuenta tanto con el gen *eae* como el *bfp* contenido en el plásmido EAE (Estrada-García, 2009).

3.1.3. Fisiopatología.

La infección por EPEC utiliza una variedad de factores de virulencia para causar el daño mediante un mecanismo complejo. A nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como A/E (adherencia y borrado). La lesión es un proceso multiestado que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito, esto mediante la reorganización de proteínas importantes que se encuentran en el citoesqueleto celular. Para que se induzca la lesión(A/E), la bacteria necesita estar adherida al enterocito y traslocar hacia las células del huésped, proteínas que intervienen de forma directa en la virulencia. Este mecanismo es promotor de importantes cambios a nivel citoesqueleto que afectan la función celular normal (Vidal, 2003).

El desarreglo que sufre el citoesqueleto descrito como la polimerización y nucleación de los filamentos de actina intracelular en la región de unión entre la bacteria y la célula, formando una estructura tipo pedestal. La diarrea secretoria causada por EPEC está relacionada con la salida masiva de iones, lo cual parece ser una consecuencia del desarreglo del citoesqueleto y de la destrucción de las microvellosidades (Vidal, 2003).



3.1.4. Mecanismo de patogenicidad.

Investigaciones recientes han demostrado la interacción entre el microorganismo patógeno y las células huésped, presente en el modelo de patogénesis de EPEC el cual se divide en tres fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y c) transducción de señales y contacto íntimo (Vidal, 2003).

3.1.5. Adherencia inicial.

Esta adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis de EPEC y a su vez se divide en dos etapas: la primera está dada por la unión entre las bacterias de manera tridimensional en forma de microcolonias, a nivel intestinal este proceso es mediado por moléculas de tipo fimbrial, conocidas como pili BFP, y la segunda, implica la unión de estas microcolonias a la superficie de la célula (Vidal, 2003).

3.1.6. Pilus formador de penachos BFP (Bundle-Forming Pillus).

Los BFP, son fimbrias de 7 nm de diámetro y de 14 a 29 μm de largo, y para su síntesis se requieren de 14 genes codificados en un plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC o EAF (por sus siglas en inglés). La expresión de BFP se induce in vitro en la fase de crecimiento logarítmico y es regulado por factores fisicoquímicos como la temperatura, el calcio y los iones de amonio (Vidal, 2003). Los BFP permiten que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias (fenotipo conocido como auto agregación) y promueve la adherencia localizada (LA) (Rodríguez, 2002).

3.1.7. Inyección de factores y transducción de señal.

Una vez unida la bacteria al enterocito, desencadena una serie de señales intracelulares que promueven la secreción de un grupo de proteínas a través del sistema secretor del tipo III (SSTT), que las envía al enterocito. Este grupo de proteínas son codificadas genéticamente en el locus de borrado del enterocito (LEE), como parte de la isla de patogenicidad de EPEC (Vidal, 2007).



La isla de patogenicidad posee tres dominios: a) el sistema de secreción tipo III, b) el grupo de proteínas secretadas, nombradas (Esp), por sus siglas (proteínas secretadas por EPEC) y c) la adhesina bacteriana intimina y su receptor en la célula llamado Tir (Vidal, 2003).

3.1.8. Proteínas secretadas.

Mediante el sistema de secreción del tipo III (SSTT) la bacteria secreta por lo menos 6 proteínas: EspA (25 KDa), EspB (38 KDa), EspD (40 KDa), EspF, EspE y Tir. Éstas son necesarias para la lesión de adherencia y borrado (A/E) (Mecenas, 1992; Nataro, 1998). EspA, forma un apéndice filamentososo que permite el contacto con la célula epitelial y mediante el cual son trasladadas hacia la membrana de la célula las proteínas EspB EspD, responsables de concluir el translocon. La proteína Tir, se envía a través del translocon por medio del SSTT, hacia el interior de la célula y se inserta en la membrana en donde sirve como receptor de la adhesina bacteriana intimina. Este proceso se ilustra en la figura 2.

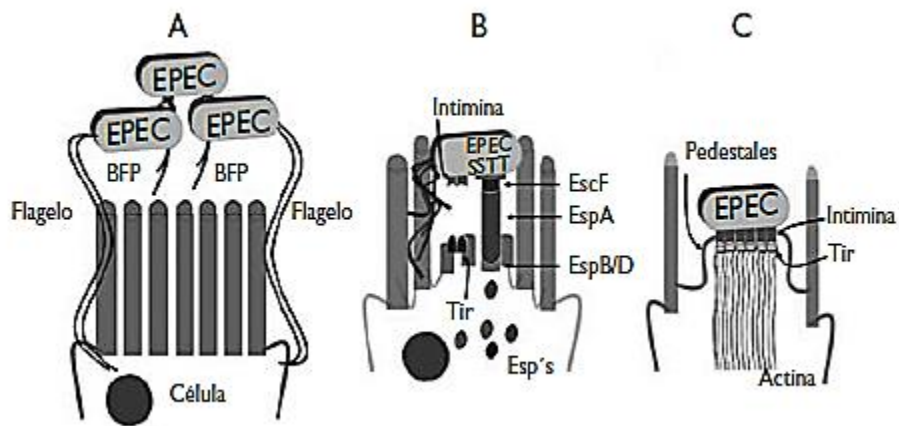


Figura 2.-Modelo esquemático de las etapas de la infección por EPEC.

En la figura 3 se observa el panel A que muestra el comportamiento de las células de EPEC a las tres horas de haberse iniciado la infección, una típica adherencia localizada (LA), así como la formación de la micro colonia y las lesiones A/E manifestados por la formación de pedestales y las bacterias en la parte superior. El panel B nos muestra el avance de la infección 6 h después, se observa como la



micro colonia se ha extendido a lo largo de la mono capa celular. Por último, el panel C que es una amplificación del panel B, permite apreciar como las células bacterianas logran permanecer unidas por la presencia de abundantes fimbrias peritricas (Saldaña, 2009).

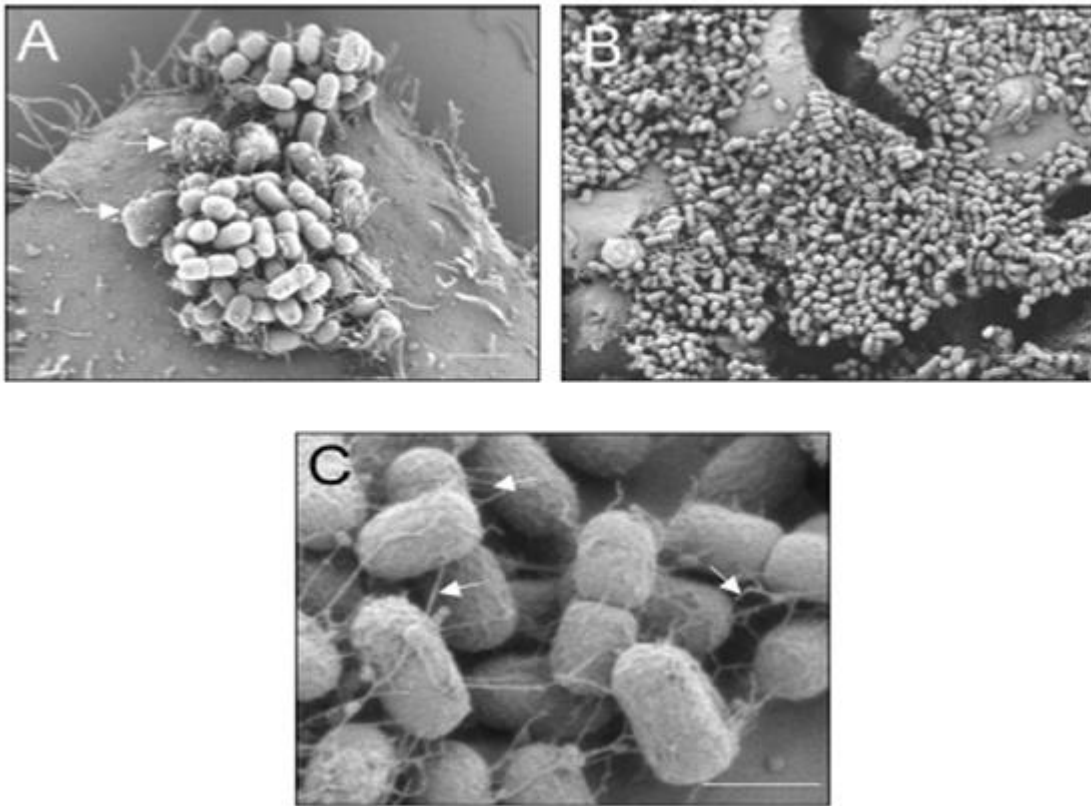


Figura 3.-Microscopia electrónica de barrido de células de EPEC adheridas a células Hep-2. A) 3 h después de la infección por EPEC, barra de escala 2 μ m B) 6 h después de la infección por EPEC, barra de escala 6 μ m. C) Amplificación de B, barra de escala 1 μ m (amplificación de Saldaña, 2009)

3.1.9. Formación de pedestales.

La última etapa de la infección por EPEC, se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del huésped. Los pedestales se forman por debajo de esta unión y se compone principalmente de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas con actina, como actina α , fimbrina, miosina, talina y ezrina. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final a la pérdida de las microvellosidades intestinales y por lo tanto de su función. (Vidal, 2007).



3.1.10. Mecanismo de transmisión de EPEC.

La transmisión e ingreso de EPEC al nuevo huésped, se realiza vía fecal-oral y puede o no desarrollar el cuadro clínico, lo que va a depender del sistema inmune del huésped, de la dosis del inóculo y de los factores de patogenicidad de la bacteria (Cravioto, 1992).

En países en desarrollo, la principal vía de transmisión es el agua contaminada y se ha demostrado que en los países industrializados la transmisión por alimentos, es la principal causa de la enfermedad, aunque la transmisión no parece estar involucrada con algún tipo específico de alimentos (Vidal, 2003), se ha detectado presencia de EPEC en carne de res y pollo. En general se estima que cualquier alimento que esté en contacto con materia fecal, puede ser trasmisor de este patógeno.

3.1.11. Población susceptible.

En países industrializados los casos de diarrea por cepas de EPEC son bajos, en cambio en países en vías de desarrollo la prevalencia de diarrea por EPEC sigue siendo alta. También sigue generando brotes o casos aislados de diarrea (Humbert, 2000; Torres, 2001; Cortez-Ortiz, 2002). Este patotipo en particular, afecta principalmente a niños de 6 meses a 2 años. También se ha llegado a aislar y detectar en adultos pero en casos muy aislados (Rodríguez, 2002).

No se ha encontrado alguna relación directa con respecto a la época del año, sin embargo se considera que la época de mayor incidencia es en verano, época en que debido a las condiciones climáticas, se favorece la descomposición de los alimentos y por lo tanto la contaminación y el desarrollo de microorganismos (Rodríguez, 2002).



3.1.12. Métodos de diagnóstico.

Existen varios métodos para la identificación de EPEC, entre ellos la serotipificación, Fluorescent-Actin Stain (FAS) y técnicas moleculares como el PCR múltiple y sondas de hibridación (*et al* Alarcón, 2007).

3.1.13. Serotipificación.

La tipificación serológica de los antígenos O, K y H proporciona una útil herramienta epidemiológica. La aglutinación es una técnica de inmunología que comprende aglutinación, floculación y precipitación, esta reacción se puede visualizar mediante microscopio o visualización directa.

La serotipificación no es una técnica ampliamente utilizada debido a los costos y disponibilidad de los antisueros, en realidad en nuestro país está limitada a laboratorios de referencia (*et al* Alarcón, 2007).

3.1.14. Fenotipo de adherencia localizada (LA).

La adherencia localizada se caracteriza por la adherencia inicial y relativamente distante de las bacterias con el enterocito (Nataro *et al.* 1998). Esta adhesión se piensa que es mediada por pilus o estructuras similares a pelos *bfp* (Rodríguez, 2002).

Este es el ensayo fenotípico considerado el estándar de oro para la identificación de EPEC, es el ensayo de adherencia sobre células HEp-2 descrito por Cravioto *et al.* (1979), este método permite identificar a la bacteria gracias a que se dispone en cúmulos sobre las células epiteliales en cultivo, esta forma de adherirse a la célula es lo que se conoce como patrón de adherencia localizada (LA). Con esta técnica también se pueden identificar a otras categorías diarreogénicas de *E. coli* como Enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Vidal, 2003).



3.1.15. Tinción fluorescente para actina (FAS).

La prueba de FAS (tinción fluorescente para actina, por sus siglas en inglés) es una técnica alternativa que ha sido ampliamente usada para la identificación de EPEC en estudios epidemiológicos e investigación básica. Mediante el ensayo de FAS se puede observar la acumulación de actina en zonas por debajo de las bacterias adheridas a la célula (rearrreglo del citoesqueleto) utilizando para ello un microscopio de fluorescencia. En la técnica se utiliza un compuesto fluorescente (faloidina rodaminada) el cual se une constitutivamente a la actina, por lo que se puede observar el desarreglo del citoesqueleto de actina (Vidal, 2003).

En la tabla 3 se muestran los países y el año en los que se han dado brotes de EPEC y los métodos de diagnóstico que se han empleado para su identificación.

Tabla 3.-Frecuencia de aislamientos de EPEC.

País (año)	Casos de EPEC (%)	Controles (%)	Método de diagnóstico
México (1987)	17.5	7.4	Adherencia
Brasil (1989)	23	2	Hibridación, adherencia
México (1991)	18	2	Adherencia, hibridación y FAS
China (1991)	5	NR	Hibridación, adherencia
Nigeria (200)	2.1	1.4	Hibridación, adherencia
Australia (2003)	NR	7.6	PCR, hibridación, adherencia y FAS
Alemania (2003)	NR	5.9	PCR, hibridación, adherencia y FAS
Chile (2003)	5.3	NR	PCR
México (2004)	19	NR	Adherencia y FAS
México (2005)	25	NR	PCR múltiple

EPEC=*Escherichia coli* Enteropatógena

FAS= Fluorescent-Actin Staining (Tinción fluorescente para actina).

PCR= Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

NR= No realizado. Adherencia Localizada o fenotipo LA (ensayo sobre células epiteliales HEP-2, considerada el estándar de oro para la identificación de EPEC). Tomado (Vidal, 2007)



3.1.16. ARNr 16s.

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16s es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador housekeeping está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis.

El ARNr 16s es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o DNA ribosómico ARNr 16s (DNA 16s) incluido en la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. Análogo del ARNr 18S en eucariotas, ambos se denominan ARNr SSU (small subunit).

De distribución universal y componente crítico en la función celular, el ARNr 16s actúa como un cronómetro molecular, al presentar un alto grado de conservación. Se caracteriza por la presencia de regiones variables especie-específicas. Las mutaciones en otros genes son menos toleradas que en el ARNr 16s al afectar a estructuras no tan esenciales y únicas como él. Se desconoce la tasa de cambio en la secuencia del ARNr 16s, si bien su análisis indica una distancia evolutiva o de relación entre los microorganismos y aunque tiene sus limitaciones, no ha podido ser desplazado por ningún otro, debido a que reúne una serie de características que lo hizo ser considerado por Woese, como cronómetro molecular definitivo (Rodicio, 2004).

Cumpliendo con las siguientes características.

- a) Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias; y constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- b) Su estructura y función se han mantenido constantes a través del tiempo, de esta forma las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios.
- c) Estos cambios ocurren de manera lo suficientemente lenta, como para poder aportar información de todos los procariotas; Aunado a esto la capacidad de los



ARNr, de contener suficiente variabilidad para diferenciar tanto a organismos muy alejados como a los íntimamente relacionados.

d) EL ARNr 16s, es de tamaño relativamente largo (1.500 bp) minimizando las fluctuaciones estadísticas.

e) Debido a la facilidad de este gen para secuenciarse, permite la existencia de una amplia base de datos y en continuo aumento (Rodicio, 2004).

En la figura 4 se presenta la estructura del ARNr 16s; las hélices, comunes en todos los seres vivos y denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48 en orden de aparición a partir del extremo 5. Las hélices específicas de procariotas se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras.



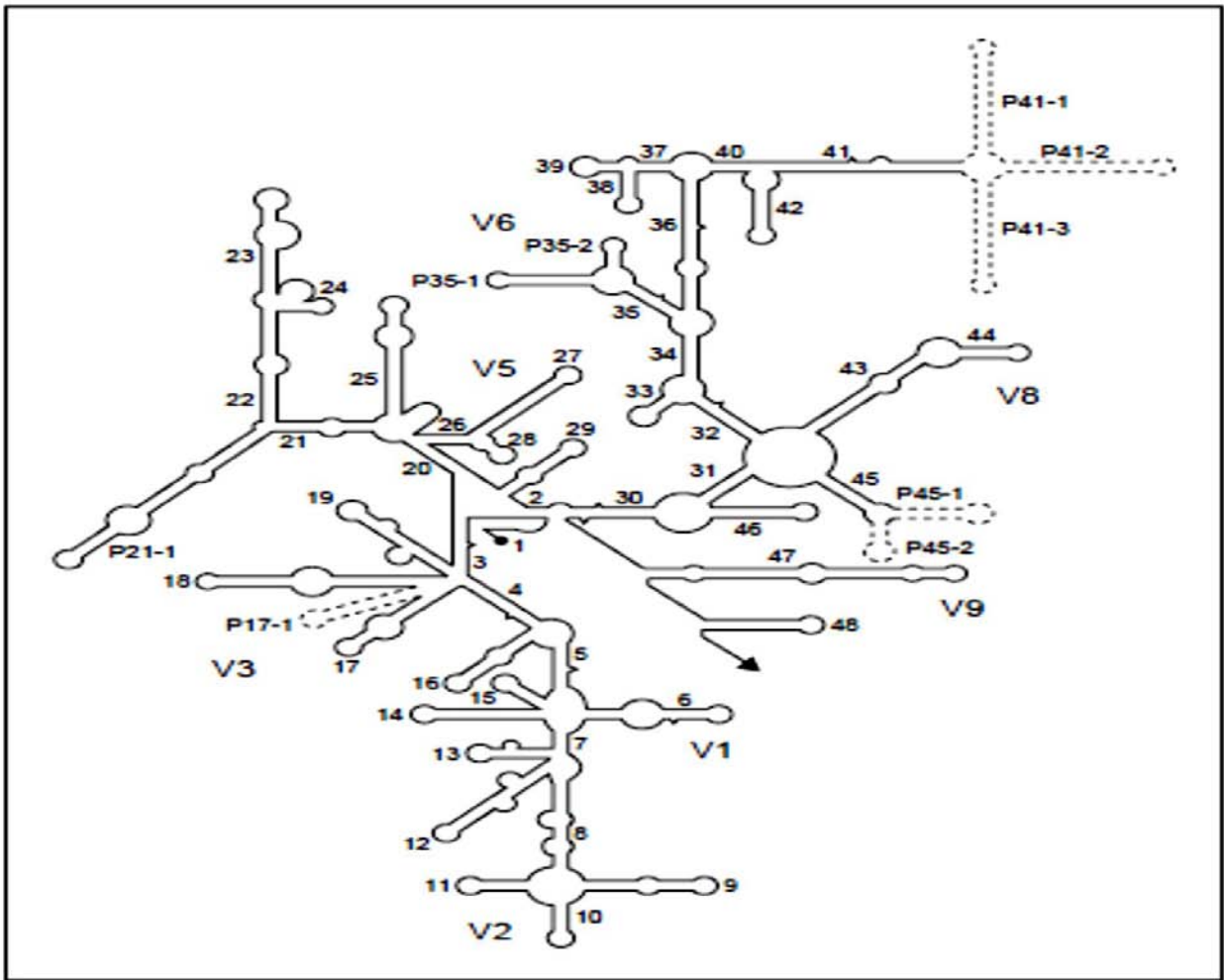


Figura 4.-Estructura secundaria del ARNr 16s. Tomado de Rodicio M, Mendoza MC. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004 Apr;22(4):238-45

3.1.17. Aplicaciones en el diagnóstico microbiológico.

La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16s, considerándose un método complementario no excluyente se enfoca hacia cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere de mucho tiempo como los siguientes casos.

a) En el caso de bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas. Esto ha llevado al descubrimiento de nuevos agentes patógenos.



- b) Bacterias que posean características bioquímicas no descritas a géneros o especies en bases de datos. Este caso se llega a dar con patógenos nuevos, poco frecuentes, o en cepas comunes que presentan un perfil bioquímico ambiguo.
- c) Cuando la caracterización fenotípica sea insuficiente para su identificación.
- d) Cuando las bacterias tienen requerimientos nutricionales complejos de tal manera que desarrollan difícilmente en medios de cultivo.
- e) Bacterias de crecimiento muy lento, lo que retrasaría considerablemente su identificación por métodos convencionales (Rodicio, 2004).

La secuenciación del ARNr 16s es un método rápido, eficaz y económico para la identificación bacteriana y permite establecer la relación filogenética que existe entre los organismos procariotas. Esto repercute directamente sobre la taxonomía bacteriana, lo que ha generado una clasificación vigente que permite la identificación rápida y precisa de bacterias (Rodicio, 2004).

3.1.18. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Desde su desarrollo en 1983, la técnica de PCR se ha convertido en una herramienta esencial en biología molecular y su uso ha ido en aumento en microbiología de alimentos. La PCR es una técnica de amplificación “in vitro” de segmentos definidos de DNA. Esta técnica produce una amplificación enzimática; en pocas horas es capaz de realizar millones de copias de una secuencia de ácidos nucleicos. La enzima DNA polimerasa copia la secuencia en base a una referencia definida por los primers (Rangel, 2000).

Los oligonucleótidos o primers son necesarios para designar la zona blanco, marcando la región de acción de la enzima, estos definen los límites de inicio y fin, orientan a la DNA polimerasa como una plantilla en la dirección correcta (Settani, 2006).

El proceso de la PCR consiste en la repetición de ciclos en los que se alternan altas y bajas temperaturas por medio de los cuales se realiza la amplificación. La DNA polimerasa al ser una enzima termoestable, es empleada en este método por esta capacidad de resistir fluctuaciones de temperatura.



La más empleada es la Taq polimerasa entre otras enzimas termoestables, por las condiciones de la técnica. La técnica consta de tres pasos (Sean, 1999).

a) Desnaturalización del DNA

En esta fase se maneja temperaturas altas en un rango de (90°C-96°C), para lograr separar la doble cadena de DNA

b) Hibridación (unión del primers al DNA blanco)

Al disminuir la temperatura (55°C-65°C), permite que los primers se adhieran complementando la secuencia y señalando la zona a amplificar

c) La amplificación por medio de la acción de la DNA polimerasa

Una vez colocados los primers, la temperatura sube a (70°C-76°C), que es la temperatura óptima de acción de la polimerasa que permite la amplificación.

Estos ciclos se repiten provocando que la zona marcada sea copiada exponencialmente, permitiéndole ser detectada y visualizada (Settani, 2006).

Lo importante de la tecnología de PCR se encuentra en la amplificación de pequeñas cantidades de DNA a niveles detectables en poco tiempo. Básicamente crea millones de copias del gen objetivo en pocas horas. En teoría esto lo podría volver un método directo; sin embargo en la práctica esto no es fácil, ya que en este método se emplean volúmenes muy pequeños en escala de micro litros (μL), lo que limita la sensibilidad en un análisis directo de un alimento. Además, debido a la composición de los alimentos los cuales pueden actuar como inhibidores de la reacción (Settani, 2006).

La baja concentración del DNA cromosomal, o bien de los genes de interés en la muestra; provoca la necesidad en la mayoría de protocolos de detección por PCR, se recomienda un preenriquecimiento previo de la misma. Esto da la certeza de que la mayor parte de DNA detectado proviene de células viables (BAM, 2003).



3.1.19. PCR Múltiple.

La PCR múltiple, es una técnica muy demandada en análisis genéticos y en otras aplicaciones en donde se requiere de la amplificación de varios productos en una sola reacción. Esta técnica requiere de factores para su optimización y así evitar en lo posible, productos no específicos o dímeros que interfieran en la amplificación de los productos específicos (López, 2003).

Estos dímeros de primers, pueden ser evitados con altas temperaturas de iniciación de la PCR, o por la influencia de otros factores como el amortiguador de la enzima en la PCR, la concentración de primers, la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura que optimice la amplificación múltiple (Loffeit, 1999).

El protocolo de PCR múltiple, comparte las mismas etapas que el método convencional; sin embargo difiere en que la amplificación se lleva simultáneamente en más de un gen blanco; esto lleva a que la temperatura de alineación deba ser la óptima para todos los genes que se desean amplificar. Este método puede ser empleado en una matriz complicada que cuente con la presencia de más de un microorganismo. Su aplicación ha ido en aumento debido a que se trata de una técnica rápida, relativamente económica y altamente eficiente ya que obtiene rendimientos altos (López, 2003).

3.1.19. Características de los primers en la PCR-múltiple.

Los primers empleados para la realización de la PCR-múltiple deben de cumplir con las siguientes características (López, 2003).

- Cada primer individual debe contar con una longitud de 18-24 bases.
- Se debe mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 %.
- Los dos primers del par deben de tener temperatura de fusión "Tm" dentro de los 5 °C.
- La secuenciación de los primers individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.



- Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.

3.1.20. Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa, es ampliamente empleada para el análisis de ácidos nucleicos. Electroforesis es el procedimiento por el cual se permite que las moléculas cargadas migren a través de un campo eléctrico, la velocidad de migración es determinada por el tamaño de las moléculas y por su carga eléctrica; el ácido nucleico está suspendido en un gel, elaborado usualmente de poliacrilamida o de agarosa. El gel es una red compleja de fibrillas y se puede controlar el tamaño del poro del gel, en las que las moléculas de ácidos nucleicos migran a través de los poros del gel a velocidades que dependen de su peso molecular y de su forma molecular. Las moléculas pequeñas, o las moléculas compactas, migran más rápidamente que las moléculas grandes o laxas. Después del periodo de migración definido, se establece la ubicación de las moléculas de DNA en el gel haciendo que las moléculas sean fluorescentes y observando el gel bajo luz ultravioleta. (Brock, 2012). El colorante bromuro de etidio se emplea como marcador fluorescente de DNA debido a que se combina firmemente con la molécula de DNA.

Existen variables que podrían afectar la migración de ácidos nucleicos a través del gel como las que se mencionan a continuación.

- a) Conformación de los ácidos nucleicos
- b) Tamaño del poro del gel
- c) Gradiente de voltaje aplicado
- d) Concentración de NaCl en el amortiguador

Esta técnica es ampliamente utilizada en biología molecular por que presenta las siguientes características:

- Permite determinar la presencia, integridad y calidad del DNA en las muestras.
- Determinar los tamaños de los productos de PCR



- Es una técnica relativamente económica y rápida.

3.1.21. Carne y productos cárnicos.

La carne es el producto pecuario de mayor valor. Posee proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad (Galván, 2011).

3.1.22. Composición nutrimental de la carne.

El Codex define la carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin”. En las tablas 3 y 4 se desglosan la composición nutrimental y el porcentaje de compuestos presentes en el tejido muscular como en el adiposo.

Tabla 4.-Composición nutricional de diversos tipos de carnes por 100 g.

Producto	Agua	Proteína.	Grasas	Cenizas	KJ
Carne de vacuno (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	116
Carne de cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	112
Carne de pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	105

Modificado (Galvan, 2011) (FAO, 2008).



Tabla 5.-Compuestos de la carne de res.

	TEJIDO MUSCULAR	TEJIDO ADIPOSO
	%	%
HUMEDAD	72 -76	10 – 20
PROTEÍNA	18 – 20	2.0 – 8.0
GRASA	1.5 – 5.0	75 – 85
CARBOHIDRATOS	< 0.5	< 0.50
CENIZA	1.00	< 0.25

Fuente: FAO, 2008

3.1.23. Consumo de carne.

Mientras que el consumo de carne per cápita en algunos países industrializados es alto, en los países en desarrollo un consumo per cápita de carne inferior a 10 kg debe considerarse insuficiente y con frecuencia causa subnutrición y malnutrición. Esta variación se debe a los precios del producto, que tienden a ser altos, lo que limita a ser consumido en países en vías de desarrollo (FAO, 2008).

Tabla 6.-Datos del consumo de carne per cápita.

Consumo humano <i>per cápita</i> (kg/año)				
	2006	2007	2008	Variación de 2007-2008 %
MUNDIAL	40.6	41.6	42.1	1.1
DESARROLLADOS	81.1	82.4	82.9	0.7
EN DESARROLLO	30.7	30.5	31.1	1.8

Modificado de (FAO, 2008)

La tabla 6 detalla el consumo per cápita de carne a los largo de tres años seguidos distinguiéndose que el consumo en los países en desarrollo se mantiene por debajo del de los países industrializados.

La figura 5 ilustra la producción de carne per cápita vs el consumo per cápita, en los países en desarrollo de los continentes Asia, América y África. Se observa como en América Latina es mayor la producción al consumo per cápita,



comportamiento que no se observa en los otros dos continentes en los que prácticamente es la producción y el consumo son el mismo (FAO, 2008).

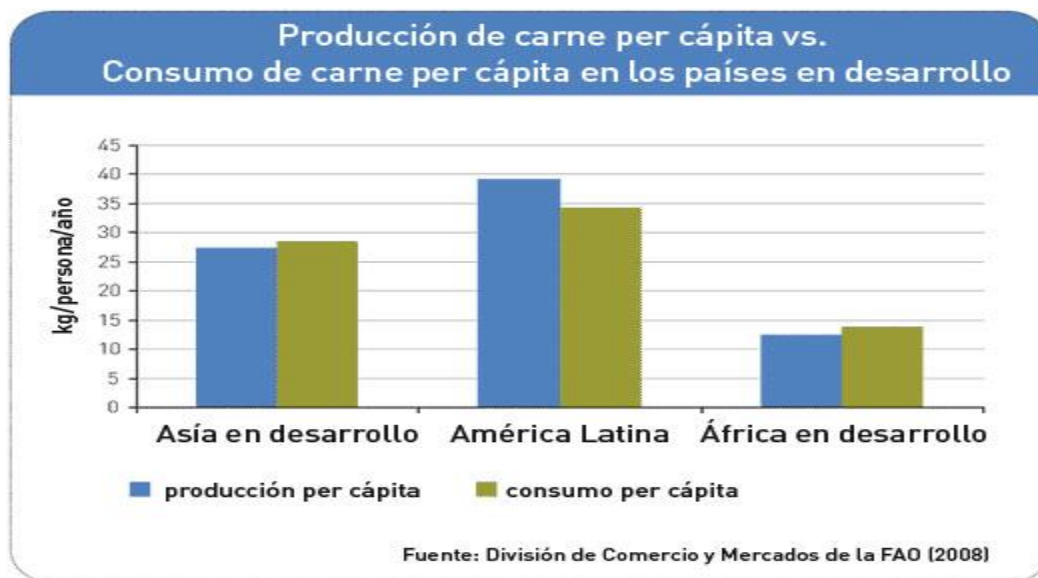


Figura 5.-Grafica de la producción de carne per cápita vs Consumo de carne per cápita en países en desarrollo.

La figura 6 muestra los tipos de carne en el mundo, mostrando que la carne de cerdo es la principal fuente y de mayor consumo, seguida por la carne de aves y la carne de res sucesivamente (FAO, 2008).



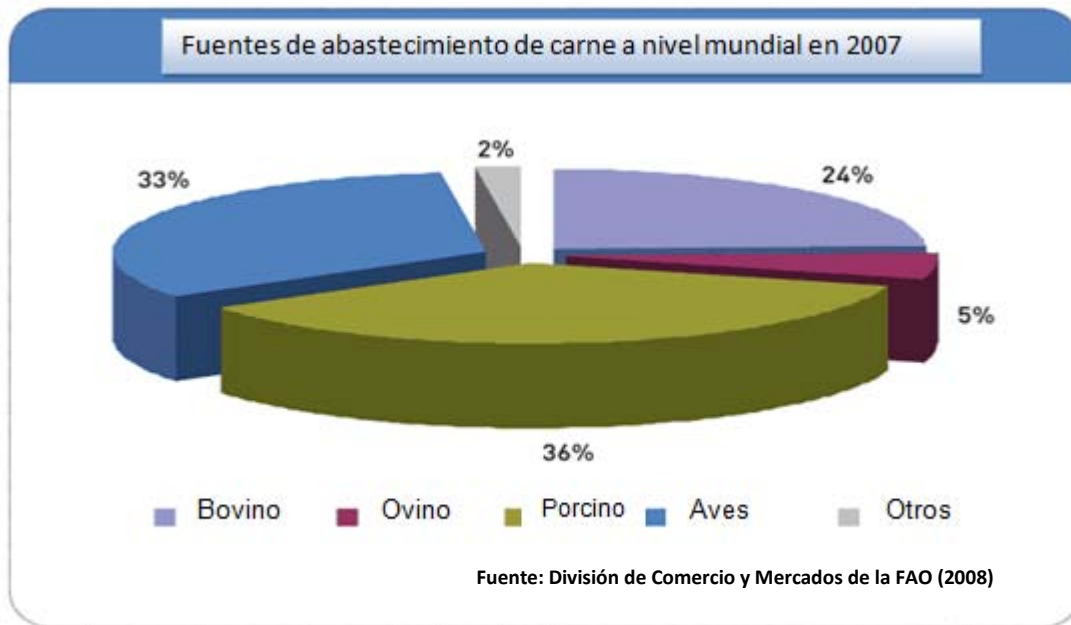


Figura 6.-Fuentes de abastecimiento de carne a nivel mundial en 2007.

3.1.24. Carne molida.

Como unidad de ensayo se eligió la carne para hamburguesas congeladas de la marca SuKarne; y debido a las características que presenta, la carne para hamburguesas congeladas es regida por la norma NOM-034-SSA1-1993 y con base en esta norma se definen sus características de la siguiente forma:

- Carne molida moldeada envasada, al producto obtenido de la carne fresca de animales de los géneros *Bos*, *Suis*, *Ovis*, *Gallus*, procedente de rastros que cumplan con el reglamento establecido, que es cortada y pasada por un molino o picadora, adicionada de otros ingredientes, moldeada, envasada y conservada para su venta al público.
- Moldeado, acción por medio de la cual se da a la carne una forma definida.

Como método de conservación se emplea la congelación y empaque al vacío; esto último con el objetivo de disminuir en lo más posible la presencia de oxígeno y limitar el desarrollo de microorganismos aerobios estrictos.



De acuerdo a la norma, la congelación se define como el método de conservación físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de temperatura de los objetos de esta norma, en su centro térmico a máximo $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($255\text{ }^{\circ}\text{K}$), reduciendo los cambios enzimáticos y microbiológicos.

Y como refrigeración, método de conservación físico por el cual se mantiene el producto a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($277\text{ }^{\circ}\text{K}$) manteniendo la cadena de frío hasta que llegue al consumidor final.

3.1.25. Salud pública.

Si bien la carne se considera generalmente un producto de alto valor que constituye una buena fuente de hierro y vitaminas, han surgido en todo el mundo una serie de problemas de salud pública que han tenido efectos adversos en la producción, comercio y consumo de carne.

El riesgo de zoonosis animal es probablemente la cuestión relacionada con la carne que despierta mayor preocupación en la opinión pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la zoonosis como “cualquier enfermedad o infección que puede ser transmitida naturalmente por los animales vertebrados a las personas” (FAO, 2008).

La carne es un alimento rico en nutrientes, con lo cual, son ambientes excelentes para el crecimiento de los microorganismos. El crecimiento microbiano está controlado por factores relacionados con el propio alimento, denominados factores intrínsecos y también por el ambiente donde se almacena el alimento, llamados factores extrínsecos (Willey y col., 2008). Después del sacrificio, la contaminación microbiana de las canales, es la consecuencia del procesamiento aplicado. El proceso influye no solo en la cantidad de microorganismos sino en el tipo de microorganismos aislados de las canales (Labadie, 1999).

La carne molida tiende a presentar mayor contaminación que la carne fresca, debido al proceso de molido donde los microorganismos que estaban en la superficie contaminan el interior (Galván, 2011).



3.1.26. Límites microbiológicos en la carne molida.

En México, la NOM-034-SSA1-1993 señala los límites máximos permisibles de microorganismos en carne cruda y molida, mostrados en la tabla 7.

Tabla 7.-Límites microbiológicos permisibles en carne molida.

Microorganismos	Limite
Mesófilos aerobios	$<5 \times 10^6$ UFC/g,
<i>Staphylococcus aureus</i>	$<1 \times 10^3$ UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/25 g

En la norma no se hace mención a los limite permisible para *E. coli* Enteropatógena, por lo que debe considerarse como ausente en este producto.

En todo el mundo se producen enfermedades transmitidas por los alimentos, incluyendo a través del consumo de carne contaminada; lee en el 2009 llevó a cabo un estudio donde se determinó la prevalencia de la contaminación por *Escherichia coli* en carne fresca de vacuno, pollo y cerdo, las muestras de carne fueron tomadas entre 2004 y 2006 y se pusieron a prueba para detectar la presencia de *E. coli* por medio de los métodos PCR múltiple y serotipificación; clasificándose en tres grupos de virulencia de *E. coli* de Enterotoxigénica (43,6%), enterohemorrágica (EHEC) (35,9%; 22,6% de la carne de vaca, el 7,3% de las aves de corral, y el 2,0% de la carne de cerdo), y *E. coli* enteropatógenos (20,5%). Catorce cepas se identificaron como pertenecientes a la EHEC. Este estudio demostró que cepas de *E. coli* patógenas se encuentran en la carne en Corea, y podría actuar como un vehículo de transmisión de la infección humana según lo sugerido por la aparición y la clasificación de las cepas patógenas de *E. coli*. Además, los datos de este estudio podrían utilizarse en la evaluación del riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos vinculados al consumo de carne.



4. HIPÓTESIS

La presencia de la cepa *E. coli* Enteropatógena en hamburguesas congeladas podrá ser detectada mediante la amplificación simultánea de los genes *eae* y *bfp* con la técnica de PCR Múltiple con lo cual se asegurará la inocuidad del alimento, debido a la ausencia de este microorganismo.

5. OBJETIVOS

5.1.1. Objetivo general.

Realizar la identificación fenotípica y molecular de *E. coli* Enteropatógena, a partir de entidades de prueba elegidas como la carne para hamburguesas mediante PCR múltiple.

5.1.2. Objetivos individuales.

- 1) Realizar la identificación fenotípica de *E. coli* ATCC 12229 y *E. coli* Enteropatógena.
 - a. Determinar las características coloniales y microscópicas.
 - b. Realizar pruebas bioquímicas convencionales, típicas de *E. coli*.
 - c. Realizar identificación bioquímica a través de sistemas estandarizados (API 20E y VITEK).
- 2) Realizar la identificación molecular con el gen ARNr 16s.
- 3) Implementar la técnica de PCR múltiple para genes *eae* y *bfp*.
- 4) Realizar la detección de EPEC en muestras de carne para hamburguesas congeladas de la marca SuKarne.



6. METODOLOGÍA

La realización de este proyecto se efectuó con la cepa de *E. coli* ATCC 11229 proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química y la cepa de *E. coli* Enteropatógena (EPEC), proporcionada por el Dr. José Adelfo Escalante del Instituto de Biotecnología, UNAM.

El esquema general que se siguió para la realización del proyecto se presenta en la figura 7.

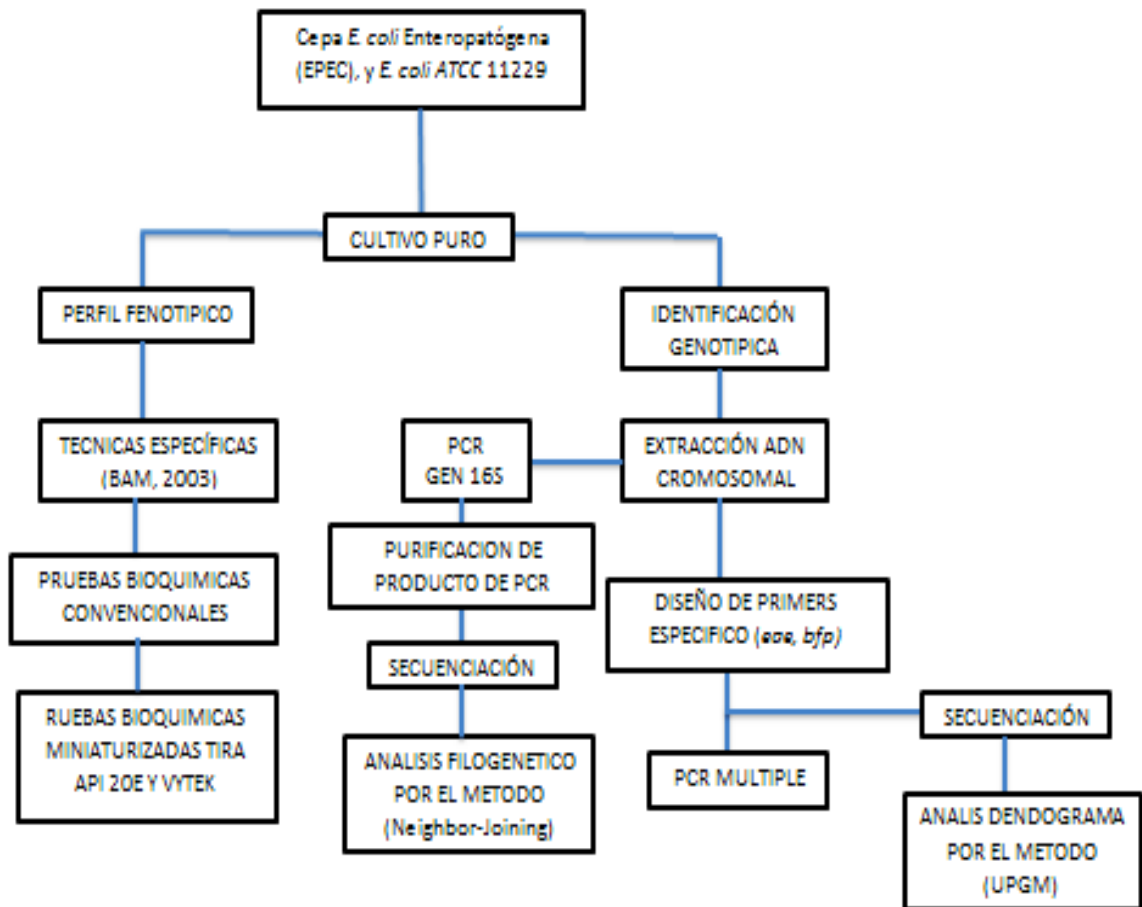


Figura 7.-Diagrama de metodología general.



6.1.1. Reactivación celular.

Para corroborar la identidad fenotípica y/o molecular de las cepas de trabajo, se procedió inicialmente a la reactivación de las mismas, debido al daño o estrés en el cual se encontraban por el método de conservación al que estuvieron sujetas. Se tomó una asada del microorganismo conservado por subcultivo en medio semisólido cistina-triptona (CTA) e inoculándola en tubos con 3.5 mL de caldo nutritivo, incubados a 35 °C por 24 h, se observó y registró la turbidez del medio.

6.1.2. Características coloniales.

Para determinar que las cepas se encontraran puras, se procedió a sembrar en medios sólidos generales, como el Muller Hinton, Agar Nutritivo y/o Agar Luria Se incubó a 35 °C por 24 h, después de esto se observó y registro el crecimiento colonial Luria. Se tomó una asada a partir del caldo nutritivo e inoculó por agotamiento en cuadrante radial en cajas..

6.1.3. Características microscópicas.

Para confirmar la pureza de las cepas con morfología típica de *E. coli* , se realizó un frotis y tinción de Gram, seleccionando una colonia aislada de los medios sólido, colocándola en un porta objetos y realizando un frotis, se agregaron los reactivos en el orden correspondiente y su posterior observación al microscopio y se registró la morfología observada .

6.1.4. Características fenotípicas en medios de cultivo selectivos.

Para determinar las características de desarrollo en medios selectivos para el grupo coliforme, se utilizaron los medios líquidos, caldo bilis verde brillante con lactosa (BRILA) y caldo para *Escherichia coli* (EC) y como medios sólidos, el agar McConkey y el agar eosina azul de metileno (EMB). En el caso de los medios líquidos se tomó una colonia aislada a partir de los medios generales, como el agar nutritivo de enriquecimiento (inciso 6.1.2.), y se inocularon los tubos. Para el caso del BRILA se incubó a 35 °C por 24 h y para el EC se incubó a 44.5 °C por 24 h se observó turbidez y producción de gas como criterio de crecimiento.



Al término de la incubación y a partir de los tubos de BRILA y EC positivos (turbidez y producción de gas), se inoculó por cuadrante radial en los medios McConkey y EMB. Ambos medios se incubaron a 35 °C por 24 h después de este periodo se observaron y reportaron los resultados.

6.1.5. Conservación a largo plazo.

Las cepas purificadas se conservaron a largo plazo con la finalidad de preservar la cepa, durante la realización del proyecto.

De las colonias puras obtenidas en agar nutritivo, se realizó una suspensión en caldo nutritivo, transfiriéndose 0.7 mL de la suspensión en un criotubo adicionándose 0.7 mL de glicerol al 50 % (P/V) previamente esterilizado y se congeló a -70 °C.

6.2. Identificación fenotípica.

Para corroborar la identidad inicial de las cepas EPEC y la cepa *E. coli* ATCC 11229, además de las características coloniales y microscópicas descritas en los incisos 6.1.2 y 6.1.3, se procedió a complementarla con pruebas bioquímicas convencionales y pruebas bioquímicas miniaturizadas como el sistema API20E y VITEK.

6.2.1. Pruebas bioquímicas convencionales.

Las pruebas que se realizaron fueron:

- **SIM- Sulfuro-Indol-Movilidad**

Con un asa bacteriológica recta y estéril se tomó una colonia y se inoculó por punción vertical en el tubo con medio SIM y se incubó a 35 °C por 24 h. Después de incubar se interpretó de la siguiente manera:



- a) **Ácido sulfhídrico.** La aparición de un precipitado o coloración negra en el tubo indica la producción de H₂S
- b) **Indol.** Se agregó el reactivo de Ehlich (dimetilaminobenzaldehído en HCl), la aparición de un anillo rojo indica la producción del indol
- c) **Movilidad.** La movilidad se interpreta como positiva al existir crecimiento a lo largo y ancho de la zona de punción (turbidez).

• **LIA- Agar-Lisina-Hierro**

Se tomó con una asa bacteriológica recta y estéril y se inoculó por picadura y estría en un tubo con agar lisina hierro (LIA), se incubó a 35 °C por 24 h. La interpretación de resultados se hizo de la siguiente manera:

- a) **Lisina.** La intensificación del color púrpura en todo el medio indica que la prueba es positiva para la enzima lisina-descarboxilasa.
- b) **Glucosa.** La aparición de una coloración amarilla en el fondo del tubo indicó la utilización de la glucosa presente en el medio.
- c) **Ácido sulfhídrico.** La aparición de un precipitado o coloración negra en el tubo indica la producción de H₂S.

• **Fermentativo/Oxidativo (O/F)**

Con un asa bacteriológica recta y estéril se inocularon por picadura, dos tubos con medio O/F con glucosa al 1%, el tubo destinado para la prueba fermentativa se le agregó de 1-2 mL de aceite mineral estéril para crear condiciones de anaerobiosis, ambos tubos fueron incubado a 35 °C durante 24 h. Independientemente de las condiciones de incubación, la aparición de una coloración amarilla indica que el microorganismo fermento la glucosa.



6.2.2. Identificación por el sistemas miniaturizado (API 20E).

La prueba API 20E es un sistema de identificación estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y bacilos Gram-negativas no exigentes. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y permite realizar numerosas pruebas a la vez. Se utilizó este método de identificación estándar y miniaturizada, por estas ventajas y como método para complementar el perfil (www.Biomerieux.com).

Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas, están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras. En una galería conformada por 20 microtubos cuya composición de sustratos se muestran en el Anexo IV.

El método consistió en realizar una suspensión con colonias puras y aisladas de cada cepa en un tubo con solución salina hasta igualar la turbidez del tubo 2 de la escala de McFarland. Cada uno de los microtubos fue inoculado con un volumen aproximado de 130 µL de la suspensión. Para las pruebas CIT, VP y GEL, se duplicó el volumen (aproximadamente 260 µL) en las cúpulas. Las pruebas ADH, LDC, ODC, H₂S y URE, se llenaron además con 130 µL de aceite mineral estéril para crear condiciones de anaerobiosis. La tira API 20E se coloca en un estuche con pozos que se llenan con aproximadamente 5 mL de agua destilada estéril para crear una atmósfera húmeda. La galería se incubó a 37°C por 24 h; Posteriormente se realizó la lectura de los resultados, se otorgaron valores positivos (+) o negativos (-) a cada casilla, de acuerdo al vire de color de los microtubos, de acuerdo a la tabla de interpretación que se muestra en el Anexo IV

Se muestra en la figura 8 las galerías de API 20E correspondientes a pruebas negativas y positivas (Apiweb® [CD-ROM] BioMérieux. 2010).



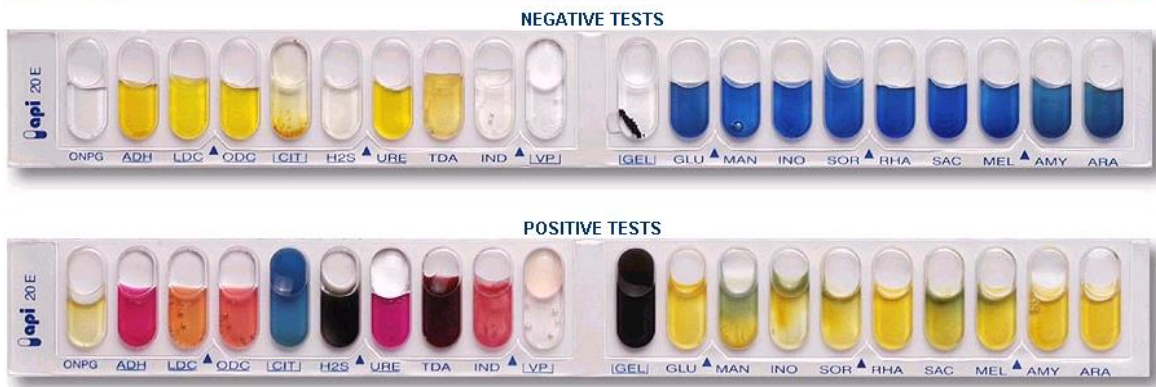


Figura 8.-Galerías con los estándares negativos y positivos.

El perfil bioquímico obtenido se analizó con el software APIweb de BioMérieux, (V: V 3.3.3), mismo que establece un porcentaje de identificación de acuerdo al taxón obtenido y otorga una calificación según el tipo de identificación obtenido

6.2.3. Identificación por el sistema estandarizado VITEK.

Para la identificación por el sistema miniaturizado VITEK, a partir de una colonia aislada en agar Luria incubada a 37 °C por 24 h, se realizó una suspensión para cada cepa, en solución salina isotónica 0.45% NaCl, pH 4.5-7.0, Se ajustó la concentración de la suspensión a 0.5 en la escala de McFarland. Con esta suspensión se llenó la tarjeta específica para microorganismos Gram-Negativos. Una vez identificada con el microorganismo inoculada, se colocó en lector y se incubó a 35.5 +/- 1°C por 15 min.

6.3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA.

6.3.1. Extracción de DNA cromosomal de la cepa pura.

Para la identificación molecular, se realizó la extracción de DNA a partir de las cepas puras. La técnica se fundamenta en la carga que posee el DNA que es iónico-polar, y por lo tanto es soluble en soluciones polares, propiedad que es aprovechada para lograr extraer el DNA de las células y su posterior purificación.



A partir de las cepas puras se tomó una colonia aislada en los medios generales sólidos y se inoculó en agar Luria. Se incubó a 37°C durante 24 h. Se realizó una suspensión del desarrollo obtenido en caldo Luria. Para la extracción se tomó 1.8 mL de ésta y se colocaron en un microtubo de centrifuga estéril.

La extracción se realizó siguiendo el protocolo del Kit Ultraclean bacterial DNA cromosomal MoBio Laboratories (Anexo I)

El DNA cromosomal obtenido de cada cepa, se visualizó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa (inciso 6.3.2) y se determinó la concentración por espectro (Nanodrop ,2000t, ThermoScientific),

6.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez concluida la extracción de DNA cromosomal, para verificar la integridad de éste, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando como revelador bromuro de etidio al 0.04% en condiciones de corrida de 100V en solución buffer Tris Borato EDTA 0.5 M (TBE) ajustado a un pH=8.0; cada carril se llenó con 5 µL de muestra + 3 µL de colorante de carga (6X Orange DNA Loading Dye, (Fermentas)10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15 % orange G,0.03 % xilen cianol FF, 60 % glicerol y 60 mM EDTA); y como referencia el marcador molecular de Fermentas O´GeneRuler™ 1 Kb DNA mostrado en la (figura 9). El gel se visualizó con una cámara de luz ultravioleta (BIO-RAD UV, 2000).



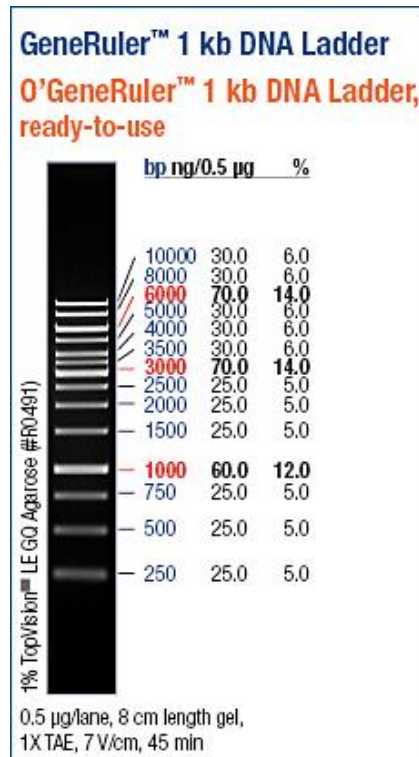


Figura 9.-Marcador de peso molecular O' GeneRuler de 1 kb DNA Ladder de Invitrogen (www.fermentas.com)

6.3.3. Amplificación del gen ARNr 16s.

A partir del DNA cromosomal extraído de las 2 cepas, se realizó la amplificación del gen ribosomal ARNr 16s mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a la metodología realizada por Cervantes (2010) y Cabanétos (2013). Para lo cual se utilizaron el par de primers universales: fd1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') rd1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg, *et al.*, 1991). Amplifico un producto de 1.5 kb.

La reacción de amplificación se llevó a cabo con la enzima Amplificasa de Biogenica y la mezcla de reacción final de 50 µL se presenta a continuación:



Tabla 8.-Mezcla de reacción para amplificación del gen ARNr 16s.

Mezcla de Reacción.	Volumen para 1 reacción (corrida)
Buffer enzima 10x(KCl 500 mM, Tris HCl pH 8.3 100 mM, Gelatina 10 µg/mL, 1% triton, 1.5mg/mL, albumina serica bovina)	5.0 µL
MgCl ₂ (1.5 µM final)	2.5 µL
dNTP (0.2 mM c/u)	5.0 µL
Fd 1(0.1µM)	0.6 µL
Rd1 (0.1µM)	0.6 µL
Templado (final)	1.0 µL
Amplificasa (5 µL/mL)	0.25 µL
Agua grado Biología Molecular	c.b.p. 50 µL

Una vez realizada la mezcla, se procedió a realizar la PCR. La reacción fue llevada a cabo en el termociclador BIO-RAD MyCycler TMthermalcycler, el cual fue programado con las siguientes condiciones de amplificación.

Tabla 9.-Condiciones de amplificación del gen ARNr 16s en termociclador.

Ciclo	Temperatura/ Tiempo	
1 ciclo de desnaturalización inicial	95°C, 5 min	
30 ciclos de amplificación que comprendieron:	Desnaturalización	95°C, 1 min
	Alineamiento	49°C, 1 min
	Amplificación	72°C 1.5 min
1 ciclo de extensión final	72°C, 5 min	

Para verificar la amplificación del gen ARNr 16s, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, de acuerdo a la metodología ya descrita (inciso 6.3.2).



6.3.4. Purificación del producto de PCR del gen ARNr 16s.

El producto de PCR de ambas cepas se sometió a una purificación, esto con el objetivo de eliminar cualquier tipo de impureza que pudiera contener, ya que este producto nos serviría para su eventual secuenciación y posterior análisis filogenético.

La purificación se llevó a cabo con un sistema comercial siguiendo las indicaciones del proveedor adjuntas al PureLink™ PCR Purification Kit de Invitrogen (Anexo II).

6.3.5. Secuenciación del gen ARNr 16s.

El producto de PCR purificado de ambas cepas, se envió secuenciar a la Unidad de Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) empleándose el método: Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing utilizando un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730.

La mezcla estuvo conformada de la siguiente forma:

Tabla 10.-Mezcla para secuenciación del gen ARNr 16s

Reactivo	Volumen
Producto de PCR (10 ng de DNA templado por cada 100 bp de producto de PCR)	10 µL
Primer (fd1 ó 1rd1) (10 pmol/ de cada uno µL)	1 µL
H ₂ O	5 µL
Volumen Final	16 µL



Para obtener la concentración de DNA de las muestras y los criterios de pureza, fueron analizadas con el equipo NanoDrop 2000t (Thermoscientific), a la absorbancia 230, 260 y 280, así como la relación Abs260/280 y Abs260/230.

6.3.6. Análisis de secuencia del gen ARNr 16s.

Una vez obtenidas las secuencias del gen ribosomal ARNr 16s de los productos de reacción con los primers fd1 y rd1 para ambas cepas, visualizaron con el electroferograma, del programa Biological sequence alignment se editor for Win95/98/NT/2K/XP/7(BioEdit) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Se obtuvieron las secuencias en formato FASTA y para obtener y corroborar la identidad, se trabajó con la base de datos del National Center for Biotechnological Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). La identidad de las secuencia se obtuvo comparándolas con secuencias de la base de datos no redundante del GenBank, que cumplieran con el mayor porcentaje de identidad, el mejor valor de expectancia (E) y el mayor porcentaje de cobertura.

6.3.7. Análisis filogenético del gen ARNr 16s.

Para el análisis filogenético, se eligieron 15 secuencias con mayor porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura y se empleó el programa ClustalX 2.0.10 para realizar un alineamiento de las secuencias obtenidas. A partir de este alineamiento se realizó un árbol filogenético con 100 réplicas, con ayuda del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA (<http://www.megasoftware.net/>)); utilizando el método de comparación de secuencias Neighbor-Joining con el algoritmo de sustitución de nucleótidos Jukes-Cantor.



6.4. PCR-Múltiple de la cepa pura *E. coli* Enteropatógena para los genes *bfp* y *eae*

6.4.1. Diseño de primers (genes *eae* y *bfp*)

Para la identificación por PCR Múltiple, se eligieron a los genes *bfp* (codifica para el píl o fimbria rizada (bundle-forming pilus)); y el gen *eae* (codifica para la intimina). Las cepas de EPEC son consideradas típicas cuando tienen los 2 genes, y atípicas cuando solo cuentan con el gen *eae* y carece del *bfp*. Para obtener las secuencias empleadas de cada gen se consultó la base de datos del GenBank resguardadas en el NCBI.

Para el diseño y selección de primers forward y reverse ideales de cada gen, se obtuvo la secuencia consenso al realizar un alineamiento de 20 secuencias para cada gen con el mayor porcentaje de identidad, el mejor valor de expectancia (E) y el mayor porcentaje de cobertura de la base de datos de la página NCBI utilizando el programa ClustalX y el programa de diseño de primers, ambos contenidos en el sitio en línea Biology WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/> último acceso diciembre 1, 2012)

Se trabajó por separado cada gen y se seleccionaron los primers forward y reverse, basándose en los criterios de valor de Tm (Temperatura de fusión de cada primer), que presentara similitud entre los dos pares de primer y un % GC igual o mayor al 50%.

Una vez seleccionados los primers, se enviaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT), donde se emplea el método del Fosfito-triéster en fase sólida, en el que la cadena creciente de DNA se mantiene "anclada" a un soporte sólido (CPG) depositado en una columna delimitada por dos filtros e insoluble en los reactivos que fluyen a través de la misma.

En la Tabla 11 se presentan los oligonucleótidos seleccionados para cada gen, los cuales cumplieron con todos los criterios establecidos, por lo que teóricamente estos fueron los primers idóneos para la reacción de PCR múltiple.



Tabla 11.-Oligonucleótidos seleccionados para cada gen y sus características teóricas.

GEN		Oligonucleótidos	Tm(°C)	%GC	Peso del producto esperado
eae	Fw	5' CTGAACGGCGATTACGCGAA 3'	66.52	55	769 bp
	Rv	5' CCAGACGATACGATCCAG 3'	54.82	55	
bfp	Fw	5' CAATGGTGCTTGCGCTTGCT 3'	66.87	55	620 bp
	Rv	5' AGTGACTGTTCGGGAAGCAC 3'	60.30	55	

Para cada par de primer en base a Tm, se estandarizó la técnica de PCR para los genes (inciso 6.4.2.), y posteriormente se estandarizó la técnica de PCR-múltiple para ambos genes.

6.4.2. Estandarización del PCR para los genes *eae* y *bfp*.

6.4.2.1. Gradiente de temperatura de alineamiento.

Se estandarizó la concentración de cada primers *eae* y *bfp* a 1.0 µM para una reacción de PCR con un volumen total de 50 µL, considerando las especificaciones recomendadas de cada uno para la Taq polimerasa empleada (Fermentas). La mezcla de reacción utilizada para cada gen se presenta en las tabla 12 (gen *eae*) y tabla 13 (gen *bfp*). Como control negativo se utilizó DNA cromosomal de una cepa no patógena *E. coli* ATCC 11229.



Tabla.12.-Mezcla de reacción para el gen *eae* de *E. coli* Enteropatógena.

Mezcla de reacción	1 reacción de 50 µL
Buffer 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 Mm, gelatina 10 µg/mL)	5 µL
MgCl ₂ 2.5mM	5 µL
dNTP 0.2 mM	1 µL
<i>eae</i> Fw 1.0 µM	1.85 µL
<i>eae</i> Rv 1.0 µM	1.02 µL
Enzima (1 U/ µL)	1.25 µL
Templado	1 µL
Agua grado biología molecular	c.b.p. 50 µL

Tabla 13.-Mezcla de reacción para el gen *bfp* de *E. coli* Enteropatógena.

Mezcla de reacción	1 reacción de 50 µL
Buffer 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 Mm, gelatina 10 µg/mL)	5 µL
MgCl ₂ 2.5 mM	2.5 µL
dNTP 0.2 Mm	5 µL
<i>bfp</i> Fw 1.0 µM	1.19 µL
<i>bfp</i> Rv 1.0 µM	1.8 µL
Enzima (1 U/ µL)	1.25 µL
Templado	1 µL
Agua grado biología molecular	c.b.p. 50 µL



Con estas mezclas de reacción, se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento para cada gen, se buscó la amplificación individual, para comprobar que los oligonucleótidos sintetizados lograban la amplificación del gen específico, y la mejor temperatura de alineamiento común para ambos genes; esta prueba era crucial para el avance del proyecto.

De acuerdo a los valores de T_m que se encontraban entre 54.82°C y 66.87 °C, se decidió probar con las temperaturas 58, 56, 53 y 51°C de forma individual. Las condiciones del gradiente de temperatura de alineamiento para las etapas de la PCR en ambos genes se presentan en la Tabla 14. A partir de estas condiciones de amplificación y las mezclas de reacción, establecidas en la tabla 12 (gen *eae*) y tabla 13 (gen *bfp*) se realizó el gradiente de temperatura.

Se verificó la amplificación de los productos de PCR obtenidos por una electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió previamente (6.3.2)

Tabla 14.-Condiciones de amplificación del gradiente de temperatura para los genes *eae* y *bfp* de *E. coli* Enteropatógena.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	# ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	30
Gradiente de temperatura de alineamiento	58,56,53,51	1	
Amplificación	72	1.5	
Amplificación final	72	5	1

6.4.3. Secuenciación de los genes *eae* y *bfp*

Los productos de PCR a partir de la temperatura de alineamiento de 56°C para ambos genes, se purificaron con la metodología descrita en el inciso 6.3.4. Se verificó la calidad de los productos purificados mediante una electroforesis en gel de agarosa (6.3.2). Los productos purificados se cuantificaron y obtuvieron los criterios de pureza descritos en el inciso 6.3.5, se determinó la concentración de cada producto de PCR y la pureza empleando la misma metodología descrita en el



inciso 6.3.4; se enviaron a secuenciar a la Unidad de Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología. La identidad de las secuencias se obtuvo con la misma aproximación *in silico* descrita en el inciso 6.3.5.

6.4.4. Realización de dendogramas para los genes *eae* y *bfp*

Se compararon las secuencias con la información de la base de datos y se eligieron 20 secuencias para cada gen con mayor porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura y se construyeron los dendogramas empleando el método de comparación de secuencias UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) incluido en el programa MEGA (<http://www.megasoftware.net/>).

6.4.5. Amplificación por PCR-Múltiple para los genes *eae* y *bfp* de la cepa *E. coli* Enteropatogénica. Gradiente de concentración de primers.

El siguiente reto fue establecer las condiciones de amplificación de la PCR-Múltiple para ambos genes, para lo cual fue necesario estandarizar la composición de la mezcla de reacción, así como las condiciones de amplificación con las que se programaría el termociclador.

Esta prueba se llevó a cabo con DNA purificado extraído previamente de la cepa pura. Se realizó un gradiente de concentración de primers para establecer la concentración ideal de cada uno y lograr la amplificación simultánea de ambos genes. Esta prueba se realizó con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas). Se decidió considerar el rango de concentraciones de primers recomendadas (0.1 a 1.0 μM). Se evaluaron las concentraciones 0.2 μM , 0.4 μM , 0.6 μM y 0.8 μM

Se verificó la amplificación de los productos de PCR múltiple obtenidos por una electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió previamente (inciso 6.3.2).



6.4.6. Amplificación por PCR-Múltiple para los genes *eae* y *bfp* de la cepa *E. coli* Enteropatógena. Gradiente de concentración de MgCl₂.

Una vez lograda la amplificación múltiple, se buscó optimizar la reacción, evaluando la concentración de MgCl₂. La concentración empleada inicialmente fue de 2.5 mM, y se evaluaron las concentraciones 2 mM, 2.5 mM, 3 mM y 4 mM. Para cada concentración de este reactivo, las reacciones se realizaron bajo las mismas condiciones de amplificación descritas en el inciso 6.4.5.

Se verificó la amplificación de los productos de PCR-Múltiple obtenidos por una electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió previamente (inciso 6.3.2).

6.5. Amplificación por PCR-Múltiple para los genes *eae* y *bfp* de la cepa *E. coli* Enteropatógena en hamburguesas de carne de res congeladas (marca SuKarne)

Se aplicó la técnica de PCR-múltiple para los genes *eae* y *bfp* en la cepa de *E. coli* Enteropatógena (Inciso 6.4.5), empleando DNA cromosomal obtenido de las unidades de prueba, la carne cruda congelada para hamburguesas de la marca SuKarne, a partir del alimento inoculado con la cepa EPEC, así como del alimento sin inocular. Esta metodología seguida se resume en la Figura 10.



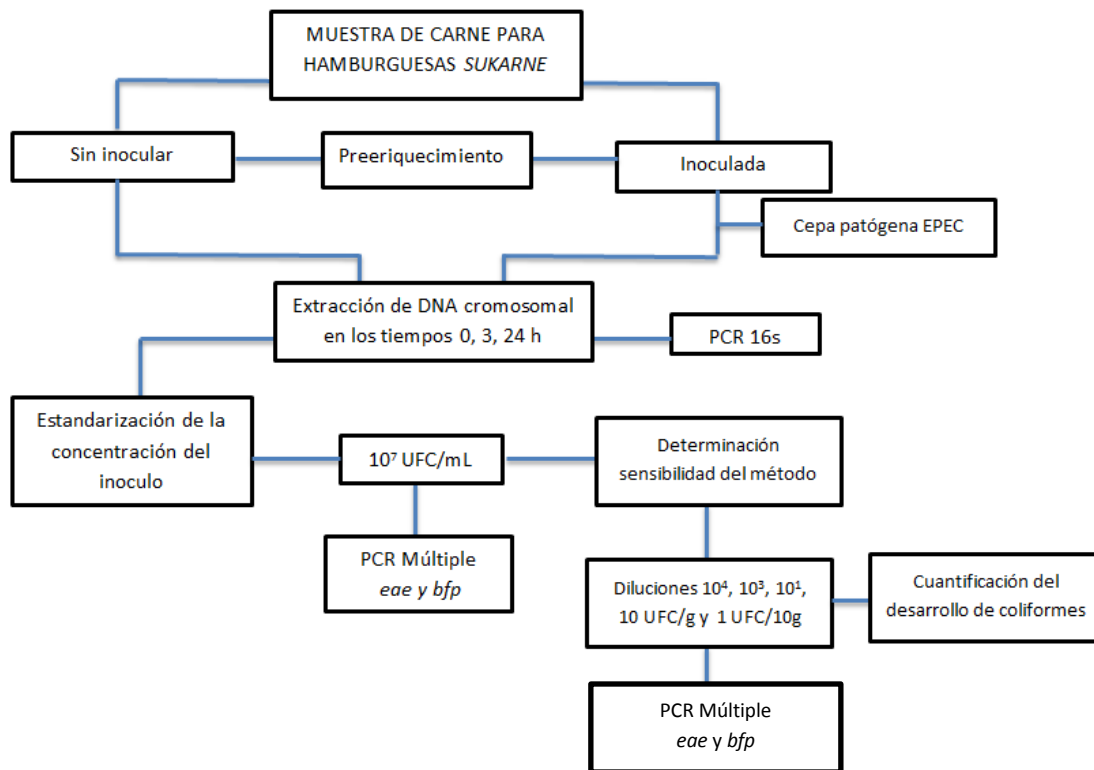


Figura 10.-Metodología seguida con las muestras de carne sin inocular e inoculada.

6.5.1. Preenriquecimiento de la carne congelada para hamburguesas de la marca SuKarne.

La metodología general del enriquecimiento para *E. coli* Enteropatógena en alimentos, se muestra en la figura 10. De acuerdo a lo recomendado por el Bacteriological Analytical Manual (BAM) <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114664.htm>), es necesario un preenriquecimiento del alimento para la detección de esta cepa y se describe a continuación:

Se pesaron en zona aséptica 25 g de carne cruda para hamburguesas de la marca SuKarne previamente descongelada en refrigeración y se agregaron a 225 mL de caldo BHI, se homogenizó en Stomacher a velocidad media por 30 s e incubó inicialmente a temperatura ambiente durante 10 min, para posteriormente transferirlo a un matraz estéril, el cual se incubó a 35 °C durante 3 h. Después de esta incubación el caldo pre-enriquecido se decantó a 225 mL caldo triptona



fosfato de doble fuerza estéril TP; (tabla 15) y se incubó a 44 °C por 24 h. El volumen final obtenido fue aproximadamente de 500 mL

Tabla 15.-Composición del caldo triptona de doble fuerza (BAM, 2011).

INGREDIENTE	CANTIDAD	DOBLE FUERZA
Triptona	20 g	40 g
K₂HPO₄	2 g	4 g
KH₂PO₄	2 g	4 g
NaCl	5 g	10 g
Polisorbato (Tween 80)	1.5 mL	3 MI
Agua destilada	1 L	1 L

El caldo doble fuerza se esterilizó en autoclave a 121 °C/15 min; pH final 7.0 ± 0.2

6.5.2. Muestras de carne de la marca SuKarne previamente inoculadas.

La figura 11 ejemplifica la metodología seguida para el preenriquecimiento previo a la extracción de DNA cromosomal, se marcan los tres tiempos contemplados para la toma de muestras para la realización de la extracción.

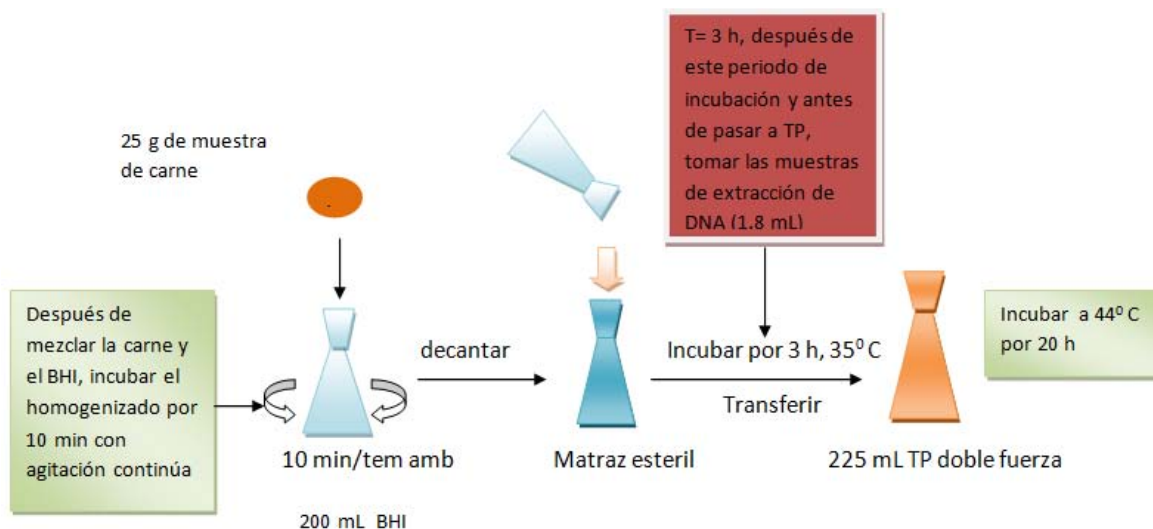


Figura 11.-Esquema general del preenriquecimiento para las muestras de carne congeladas para hamburguesas (SuKarne).



6.5.3. Estandarización de la concentración de inóculo inicial de la cepa EPEC.

Para conocer la concentración de inóculo inicial se tomó una colonia aislada de *E. coli* ATCC 11229 desarrollada en agar Luria y se inoculó en 4 mL de caldo Luria estéril e incubó a 37°C durante 24 h. Se tomó 0.1 mL del desarrollo e inoculó por duplicado en tubos con 4 mL de caldo Luria estéril e incubó a las mismas condiciones. A partir del desarrollo en este último medio, se realizaron diluciones decimales consecutivas por cada tubo y se inoculó por extensión superficial 0.1 mL de cada dilución en agar McConkey. Después de la incubación a 35°C por 24 h se cuantificaron las colonias características de coliformes (colonias rosas o rojas con una zona de precipitación de sales biliares), tomándose solamente las cajas representativas que se encontraban dentro del rango de 15- 150 UFC como se muestra en la figura 12. Las UFC/mL obtenidas fueron consideradas como la concentración del inóculo para ser ajustada a las concentraciones de trabajo finales (10^4 , 10^3 , 10^1 equivalente a (10 UFC/g) y 10^0 equivalente a 1 UFC/g. Inciso. 6.5.4

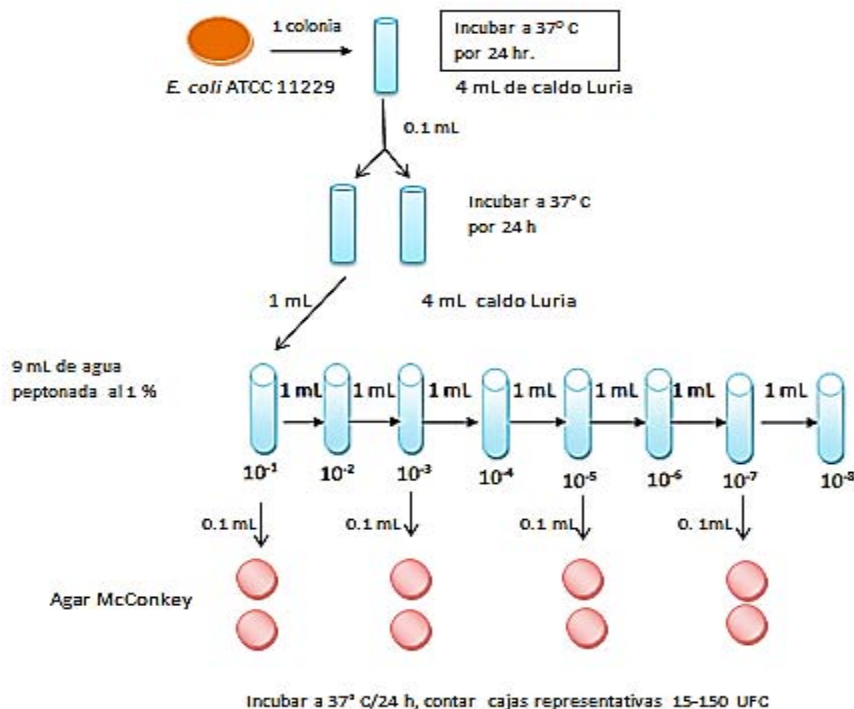


Figura 12.-Esquema seguido para la estandarización del inóculo.



6.5.4. Pruebas a diferentes concentraciones de inóculo.

A partir del dato obtenido en el inciso 6.5.3, se realizaron inoculaciones de la cepa EPEC a la carne realizando lo siguiente.

Se pesaron en zona aséptica 25 g de carne cruda para hamburguesas de la marca SuKarne previamente descongelada en refrigeración y se agregaron a 2 mL de caldo BHI, se homogenizó en Stomacher a velocidad media por 30 s e inoculó con la concentración deseada de la cepa EPEC. Se incubó inicialmente a temperatura ambiente 10 min, para posteriormente transferirlo a un matraz estéril, el cual se incubó a 35 °C durante 3h. Después de esta incubación el caldo pre-enriquecido se decantó a 225 mL caldo triptona fosfato de doble fuerza estéril (TP; tabla 15) y se incubó a 44 °C por 24 h. El volumen final obtenido fue aproximadamente de 500 mL

Las concentraciones de inóculo trabajadas a partir del inicio del preenriquecimiento fueron 10^4 , 10^3 , 10^1 y 1 UFC/g; para estandarizar a la concentración inicial deseada, a partir del crecimiento obtenido del inóculo desarrollado en caldo Luria se tomó 1 mL de cada tiempo de muestreo y se realizaron diluciones decimales consecutivas en tubos que contenían 9 mL de solución salina isotónica estéril (SSI), hasta lograr la concentración inicial deseada (figura 13).

Se corroboró que se inoculó la concentración establecida, al inocular por extensión superficial 0.1 mL en agar McConkey e incubar a 37°C durante 24 h y se contabilizaron las colonias características previamente descritas.



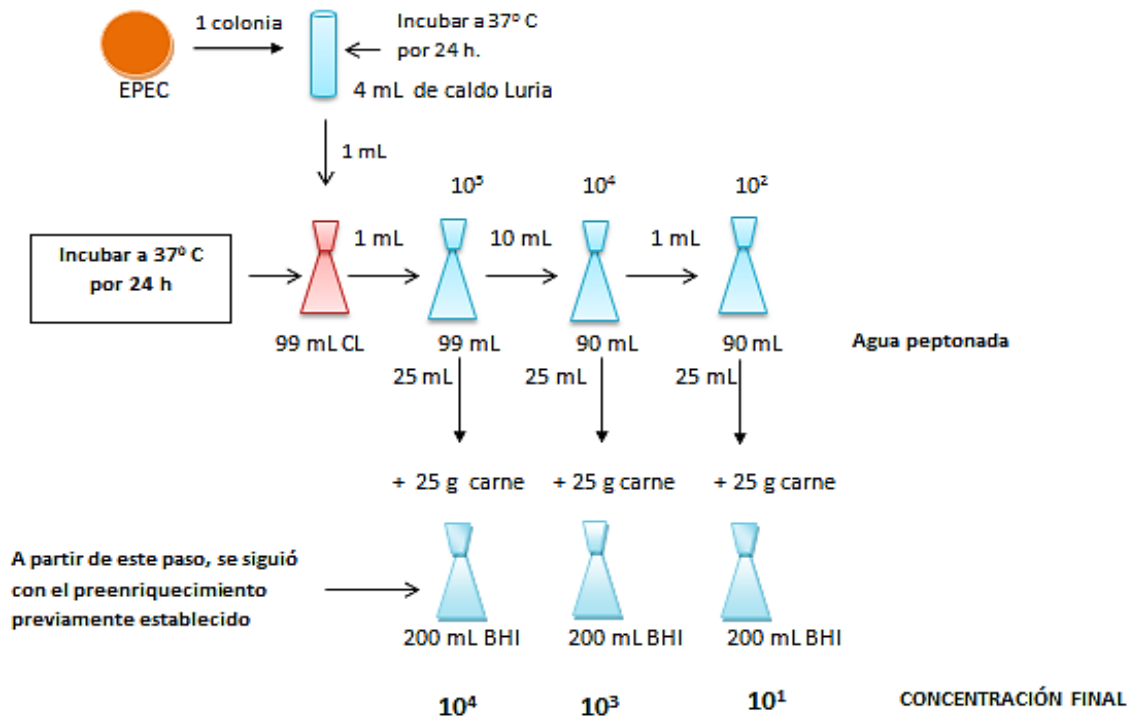


Figura 13.- Esquema seguido durante la prueba a diferentes concentraciones de inóculo con EPEC.

6.5.5. Toma de muestras en carne inoculada y sin inocular.

A partir de la carne sin inocular (inciso 6.5.1), y la carne inoculada con distintas concentraciones de EPEC (inciso 6.5.4), se tomaron muestras de los diferentes tiempos de incubación durante el preenriquecimiento y enriquecimiento del alimento (figura 3). La toma de muestras se realizó después de los 10 min iniciales ($t=0$), al término de las 3 h ($t=3$) y a las 24 h ($t=24$) de incubación. Con las muestras recolectadas se cuantificaron las UFC/g de carne de coliformes en agar McConkey (inciso 6.5.4). Adicionalmente al mismo tiempo se tomaron las muestras para la posterior extracción del DNA. Tomándose 1.8 mL los cuales fueron depositados en microtubos de centrifuga de 2.0 mL estériles, y se prosiguió con la metodología para la extracción descrita (Anexo III).



6.5.6. Cuantificación del desarrollo de coliformes a partir de las muestras.

A partir de cada muestra colectada, se tomó 1 mL y se realizaron diluciones decimales consecutivas en tubos con 9 mL de SSI estéril y se inoculó 1 mL por extensión superficial en cajas con agar McConkey. Se incubó a 35°C durante 24 h, pasado este periodo se cuantificaron las colonias características de las cajas representativas que se encontraban dentro del intervalo de 15 – 150 UFC.

6.5.7. Extracción de DNA cromosomal a partir de la muestra.

Como se indicó previamente, se tomaron muestras durante el proceso de pre enriquecimiento del alimento sin inocular e inoculado con diferentes concentraciones de EPEC. De éstos, se colectaron 1.8 mL en microtubos de centrifuga a las 0 h, a las 3 h y a las 24 h (inciso 6.5.5). La extracción de DNA cromosomal total bacteriano presente en las muestras, se llevó a cabo siguiendo el protocolo del sistema PowerFood Microbial DNA Isolation Kit de MO-BIO™, el cual se incluye en el Anexo III. El sistema de extracción, cuenta con reactivos capaces de eliminar lípidos, carbohidratos y proteínas presentes en matrices tan complejas como la de los alimentos, y en este caso específico en la muestra de carne. El volumen de DNA cromosomal esperado es de 100 µL.

Para corroborar la eficiencia de extracción así como la calidad del DNA cromosomal bacteriano total del alimento, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 6.3.2

6.5.8. PCR Múltiple a partir de la muestra inoculada.

Una vez que se contó con las muestras de DNA cromosomal total bacteriano del alimento en los tres diferentes periodos a partir de la carne sin inocular o inoculada, se realizó la amplificación múltiple de los genes *bfp* y *eae* con la metodología desarrollada para la cepa pura (inciso 6.4.5).



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.1. Desarrollo presentado en medios generales.

Respecto al desarrollo colonial presentado en los medios generales, en la figura 14 se puede observar el crecimiento en agar Luria de ambas cepas, se aprecia una diferencia en las colonias, pero esto no se puede considerar como un método discriminatorio entre ambas cepas, ya que esta característica no es necesariamente provocada por la patogenicidad o inocuidad de una cepa, pues depende de otros factores como el tiempo y temperatura de incubación, e incluso la edad de la cepa. Aunado a que este medio fue empleado únicamente para enriquecimiento por promover el desarrollo de los microorganismos y en parte para verificar que la cepa se encontrara pura.

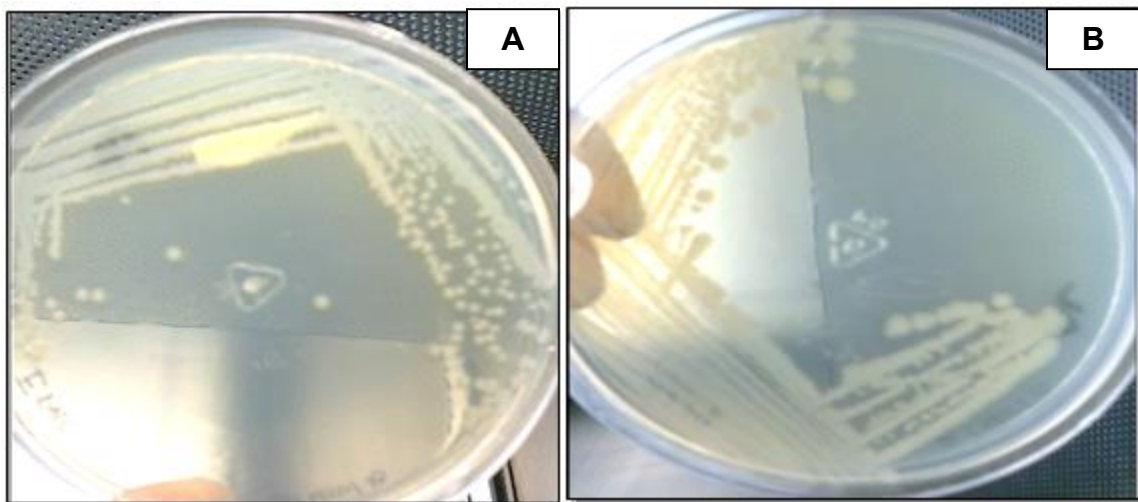


Figura 14.-Desarrollo en agar Luria de la morfología colonial presentada por las cepas empleadas en el estudio en agar Luria. Incubación a 37°C/24 h. (A) EPEC, (B) *E. coli* ATCC 11229.

Para corroborar la identidad del microorganismo y para determinar la posibilidad de discernir por este método entre la cepa patógena y la *E. coli* ATCC 11229, a través de sus características de desarrollo en los medios de cultivos selectivos, después de cada periodo de incubación correspondiente a cada medio de cultivo,



se registraron las características coloniales y cambios en los respectivos medios de cultivo para ambas cepas, como lo muestra la tabla 16.

Tabla 16.-Resultados del desarrollo presentado por las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229 en medios generales, medios selectivos y diferenciales.

MEDIOS GENERALES			
Medio de cultivo	Reportadas en la bibliografía**	EPEC	<i>E. coli</i> ATCC 11229
Caldo nutritivo	Turbidez	Turbidez (crecimiento)	Turbidez (crecimiento)
Agar Muller Hinton, Agar Nutritivo y/o Agar Luria	Colonias cremosas, redondas, pequeñas y convexas	Colonias cremosas, redondas, pequeñas y convexas	Colonias cremosas, irregulares, grandes y planas
MEDIOS SELECTIVO-DIFERENCIALES			
Caldo EC *	Crecimiento anillado con producción de gas	Crecimiento anillado con producción de gas	Crecimiento anillado con producción de gas
Agar Mc Conkey	Colonias rojas o rosas	Colonias grandes, rosas, cremosas, con borde ondulado, planas. Precipitado de bilis en la base de la colonia	Colonias grandes, rosas, cremosas, con borde ondulado, planas. Precipitado de bilis en la base de la colonia
Agar EMB	Colonias con centro más oscuro con brillo metálico verdoso	Colonias pequeñas con brillo metálico, redondas	Colonias pequeñas con brillo metálico, redondas

* Las condiciones fueron a 35 °C por 24 h, para la mayoría de los medios, excepto para el caso del caldo EC el cual fue incubado a 44.5°C por 24 h.

** Brock, 2012

Las diferentes morfologías observadas tanto en medios de enriquecimiento como en los selectivos y diferenciales (McConkey y EMB), muestran como resultados positivos o característicos en el desarrollo de *E. coli* de acuerdo a lo descrito por la bibliografía (Brock, 2012) para los medios probados.

Para ambas cepas (EPEC y *E. coli* ATCC 11229), en el caldo BRILA incubado a 35°C/24h así como en el caldo EC incubado a 44.5°C/24 h, se presentó turbidez y



presencia de gas en las campanas de fermentación, de acuerdo a lo descrito en la literatura (NOM-112-SSA1-1994).

Además, McConkey y EMB permitieron resaltar, y exponer parte del metabolismo característico de la especie al resaltar inicialmente a los fermentadores de lactosa de los no fermentadores e inhibiendo el desarrollo de organismos Gram-positivo como se pudo observar en la Figura 15. En la que se observó que metabolizan la lactosa con producción de ácido LAC + y resisten las sales biliares. Resultado esperado por la bibliografía y comprobado (Brock, 2012).

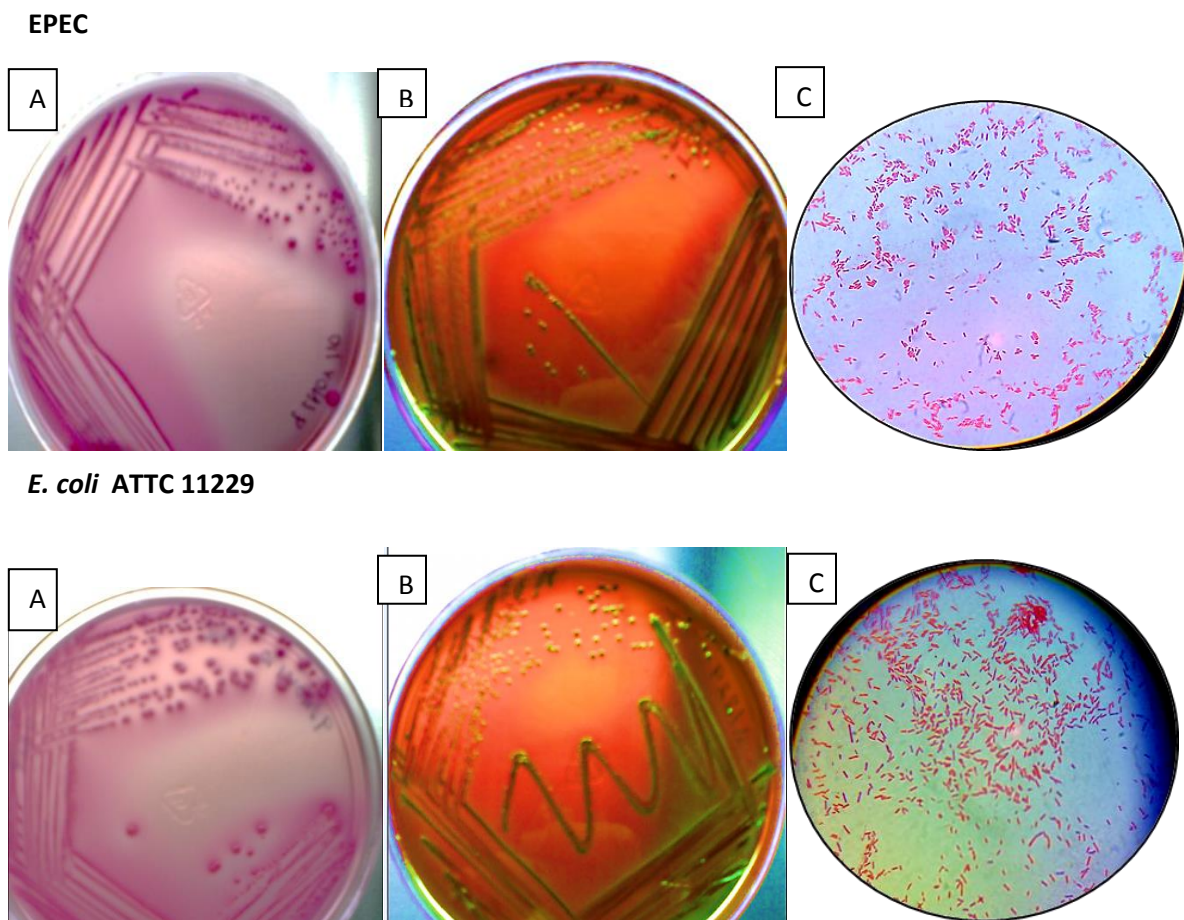


Figura 15.-Colonias de las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229 en distintos medios de cultivo y tinción de Gram.

En la figura 15 se observan las colonias presentadas en los medios selectivos, en el módulo (A) se presentan las colonias en medio McConkey. En el módulo (B) las colonias en medio EMB. El modulo (C) muestra la tinción Gram.



En la columna C se muestra las observaciones microscópicas de las cepas descritas en la Tabla 13 lo cual corresponde a lo esperado para *E. coli* (Brock, 2012). Se observaron bacilos cortos Gram-negativo, así mismo se corroboró la pureza de las cepas, lo cual garantizó que los resultados obtenidos son producidos exclusivamente por las cepas EPEC y la *E. Coli* ATCC 11229.

Sin embargo, es evidente la imposibilidad de diferenciar ambas cepas, ya que se observó un crecimiento similar, debido a que se trata de la misma especie. Por lo tanto, con esta característica fenotípica no es posible discernir entre una cepa patógena y una inocua.

7.1.2. Tinción de Gram.

Los resultados de la tinción de Gram realizados para corroborar la pureza de las cepas, dio resultados esperados, ya que se observaron bacilos cortos Gram-negativo, mostrados en la figura 15 y descritos en la tabla 16 comparándose con las características reportadas para *E. coli* por la bibliografía.

Tabla 17.-Resultados de la tinción de Gram a las cepas EPEC y ATCC 11229.

	*Reportado por la bibliografía	EPEC	<i>E. coli</i> ATCC 11229
Gram	Bacilos cortos Gram (-)	Bacilos cortos, no esporulados Gram (-)	Bacilos cortos, no esporulados Gram (-)

Tinción realizada a colonias aisladas de 24 h a partir de agar Luria al microscopio con el objetivo 100X de la tinción realizada.

Fuente: Brock, 2012

7.1.3. Pruebas bioquímicas convencionales en tubo

Las pruebas bioquímicas convencionales se fundamentan en la adición de indicadores que revelan la acción de enzimas y en consecuencia el metabolismo característico de un microorganismo, tales como la fermentación de carbohidratos. Los sustratos con los que reaccionan estas enzimas se encuentran incorporadas al medio de cultivo, aunado a indicadores de pH o de óxido-reducción o mediante



la adición de reactivos que generan compuestos coloridos con los metabolitos generados (Brock, 2012).

A partir de las colonias típicas y características para ambas cepas, se realizó la identificación bioquímica convencional. Posterior al periodo de incubación establecido, se observaron los resultados descritos en la tabla 18

Tabla 18.-Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas EPEC y la *E. coli* ATCC 11229.

Prueba	Reportado por la bibliografía		EPEC	11229
	Biotipo I	Biotipo II		
Sulfuro-Indol-Movilidad	S- I+ M+	S- I- M+	S - I+ M+	S - I+ M+
Oxidación/Fermentación	O+/F +	O+/F+	O+/F+	O+/F+
RM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-

Fuente: (et al. Alarcón, 2007 y Manual de laboratorio de microbiología de alimentos)

Con base en los resultados descritos en la tabla 18, se determinó que las dos cepas pertenecen al Biotipo I; aún con estos resultados no es posible discernir la patogenicidad de la *E. coli* Enteropatógena.

7.1.4. Identificación por el sistema API 20E.

La lectura de los resultados de las reacciones producidas durante el periodo de incubación, se llevaron a cabo mediante la comparación de cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos con respecto a los estándares positivos y negativos mostrados en la figura 8. Considerando las pruebas positivas y negativas como resultado de la actividad metabólica del microorganismo en estudio, obteniéndose un perfil numérico que fue consultado en la base de datos del software de identificación API-Web (versión V 3.3.3). Los resultados para ambas cepa de estas pruebas se muestran en la tabla 19, simultáneamente se realizó una comparación con lo reportado por la bibliografía.



Tabla 19.-Resultados del método API 20E para las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229.

PRUEBAS	REACCIONES/ENZIMAS	Reportados por la bibliografía*	EPEC	ATCC 11229
ONPG	B-galactosidasa	90 % (+)**	-	+
ADH	Arginina-dihidrolasa	-	-	-
LDC	Lisina Descarboxilasa	26% (-)	-	-
ODC	Ornitina Descarboxilasa	30 % (-)	-	+
CIT	Uso del Citrato	-	-	-
H2S	Producción de H ₂ S	-	-	-
URE	Ureasa	-	-	+
TDA	Triptofano Desaminasa	-	-	-
IND	Producción de Indol	90% (+)	+	-
VP	Producción de acetoína	-	-	-
GEL	Gelatinasa	-	-	-
GLU	Fermentación/Oxidación (Glucosa)	+	+	-
MAN	Fermentación/Oxidación (Manitol)	+	-	-
INO	Fermentación/Oxidación (Inositol)	-	-	+
SOR	Fermentación/Oxidación (Sorbitol)	+	-	-
RHA	Fermentación/Oxidación (Ramnosa)	82% (+)	+	-
SAC	Fermentación/Oxidación (Sacarosa)	64% (-)	-	+
MEL	Fermentación/Oxidación (Melibiosa)	75% (+)	+	-
AMY	Fermentación/Oxidación (Amigdalina)	-	-	+
ARA	Fermentación/Oxidación (Arabinosa)	+	+	-
OX	Citocromo-Oxidasa	-	-	-
NO₂	Producción de NO ₂	+	+	-
N₂	Reducción de N ₂	-	-	+

*<http://www.biomerieux.com>

** Los datos representan el porcentaje de las cepas con resultados positivo o negativo para la prueba.

Para la cepa EPEC el resultado de la fermentación del sorbitol, fue contraria al perfil bioquímico esperado. A partir de estos resultados se obtiene un código numérico que es consultado en la base de datos del sistema API-Web (version V 3.3.3).



Tabla 20.-Resultados de las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229, del método API 20E obtenidos del programa APIweb.

	EPEC	11229
API 20E	No de perfil 50441725 <i>E. coli</i> biotipo 1 % identidad: 99.0% Muy buena identificación	No de perfil 114455255 <i>E. coli</i> biotipo 1 % identidad: 99.2% Muy buena identificación

Fuente: API-Web (version V 3.3.3).

En la tabla 20 se muestran concentrados los resultados arrojados por el sistema miniaturizado API 20E (Biomerieux). Para cada cepa se logró resultado definido como muy buena identificación. En ambos casos con un porcentaje mayor al 90% y pertenecientes al biotipo I; este último dato es congruente con respecto a lo obtenido en las pruebas bioquímicas convencionales. Lo anterior solo reafirma los resultados previamente obtenidos, y sigue sin presentar información suficiente para diferenciar la cepa patógena. Las galerías interpretadas en el sistema API-web se presentan en la figura 16.



Figura 16.-Galerías API 20E reveladas de las cepas EPEC y *E. coli* *E. coli* ATCC 11229.



La imagen 1 pertenece a la galería de la cepa patógena (EPEC). La imagen 2 muestra la galería de la cepa inocua *E. coli* ATCC11229

EPEC

A

MUY BUENA IDENTIFICACION							
Galería	API 20 E V4.0						
Perfil	5 0 4 4 1 7 2 5 7						
Nota							
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				
Escherichia coli 1	99.0	0.74	SOR	91%			
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra				
Kluyvera spp	0.4	0.33	LDC	25%	ODC	99%	AMY 99%

***E. coli* ATCC 11229**

B

MUY BUENA IDENTIFICACION							
Galería	API 20 E V4.0						
Perfil	1 1 4 4 5 5 2 5 7						
Nota							
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				
Escherichia coli 1	99.2	0.93					
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra				
Citrobacter koseri/fermeri	0.4	0.43	SAC	99%	AMY	99%	

Figura 17.-Fichas de identificación para las cepas EPEC (A) y *E. coli* ATCC 11229 (B)

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales presentadas en la tabla 18 y los de las tiras API 20E (tabla 19 y figura 16 y 17), confirmaron que los resultados obtenidos, son producidos exclusivamente por las cepas pertenecientes a *E. coli*.



7.1.5. Identificación por el sistema VITEK de la cepa EPEC.

Tabla 21 .-Resultados obtenidos por la cepa EPEC de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK (Biomerieux).

PRUEBA	RESULTADO	PRUEBA	RESULTADO	PRUEBA	RESULTADO
APPA	-	PyrA	-	dCEL	-
H ₂ S	-	AGLTp	-	GGT	-
BGLU	-	dMAN	+	BXYL	-
ProA	-	PLE	-	URE	-
SAC	+	dTRE	+	MNT	-
ILATk	-	SUCT	-	AGAL	-
GlyA	-	LDC	-	CMT	+
O129R	+	IMLTa	-	ILATa	-
ADO	-	IARL	-	BGAL	+
BNAG	-	dGLU	+	OFF	+
Dmal	+	dMNE	+	BAlap	-
LIP	-	TyrA	-	dSOR	-
Dtag	-	CIT	-	5KG	-
AGLU	-	NAGA	-	PHOS	-
ODC	-	IHISa	-	BGUR	+
GGAA	-	ELLM	-		

Tabla 22.-Resultado obtenido por la cepa EPEC empleando el sistema VITEK (Biomerieux).

Microorganismo Identificado	ID %	Nivel de confianza	Pruebas en contra
<i>Escherichia coli</i>	96.71%	IDENTIFICACIÓN EXCELENTE	SAC (0.22) BGUR (0.22)

Los resultados de la identificación por el sistema VITEK, confirman los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas convencionales y el sistema API 20E, obteniendo un porcentaje de identidad del 96.71%, menor al obtenido por el sistema API 20 E. Con este método las pruebas en contra fueron (SAC) sacarosa/sucrosa y (BGUR) Beta-Glucoronidasa, pero no limitaron la identificación que fue calificada como excelente para *Escherichia coli* (tabla 22).

Ninguno de los métodos fenotípicos resultaron ser lo suficientemente sensibles para lograr diferenciar entre las dos cepas, los métodos arrojaron resultados muy similares para ambas cepas tales como, sus características morfo coloniales y microscópicas y pertenecen al Biotipo 1, aunado a un porcentaje de identificación muy bueno, pero sin mostrar diferencias significativas entre una cepa patógena y una inocua. Un perfil fenotípico no es lo suficientemente discriminatorio para la identificación de patógenos.



7.2. Identificación molecular.

Como parte de los métodos de identificación de cepas EPEC, el ensayo de adherencia en células Hep-2, descrito por Cravioto *et al.* (1979) y que es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de este patógeno, logra evidenciar la adherencia localizada (LA) mediada por el pilus BFP responsable del patrón de adherencia y de la agrupación de células EPEC sobre células Hep-2. Otra técnica alternativa es la prueba de tinción fluorescente para actina o (FAS), donde es posible observar la acumulación de actina por debajo de las bacterias adheridas a las células, por medio de un agente fluorescente (faloidina rodaminada). La serotipificación es otro método que emplea antisueros, y nos ayuda a identificar los serotipos de EPEC involucrados históricamente en la diarrea o mejor conocidos como “serotipos clásicos”. Dentro de los serotipos clásicos que se utilizan de referencia o de investigación están: O111, O55, O26, O86, O119, O127, O125, O128, O114, O124 y O142 (Alarcón, 2007).

Los problemas inherentes que presentan los métodos de identificación fenotípicos, como lo son entre otros el que no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos; han originado que los métodos moleculares se hayan potenciado como procedimiento complementario, alternativo o incluso de referencia a los fenotípicos (Fernández, 2010).

Dentro de las técnicas moleculares se encuentran las sondas de ácidos nucleicos (secuencias específicas de DNA) que reconocen o capturan al DNA de EPEC. También se cuenta con cebadores (primers) que permiten amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) secuencias específicas de genes que se localizan comúnmente en las cepas EPEC, como lo son los genes *intimina eae* (por E, coli attachment and effacing) que codifica para la intimina, proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa y cuya principal función es la de promover una adherencia más estrecha de EPEC a las células epiteliales mediante su unión a la proteína receptora Tir; el plásmido EAF (Factor de Adherencia por EPEC) y el pili BFP (por bundle-forming pilus) fenotipo codificado por el gen *bfp* responsable de la adherencia localizada (Garza-Velasco, 2001).



Para la realización de este proyecto, se emplearon como métodos de identificación molecular las técnicas de PCR punto final y PCR múltiple para los genes *eae* y *bfp*.

7.2.1. Extracción de DNA cromosomal.

El gel mostrado en la figura 18, reveló que se realizó la extracción con éxito, ya que las dos bandas se encuentran por encima de 10 Kb y se presentó una banda íntegra y de buena calidad lo que indica que no se encuentra degradado y con buen rendimiento en ambos casos.

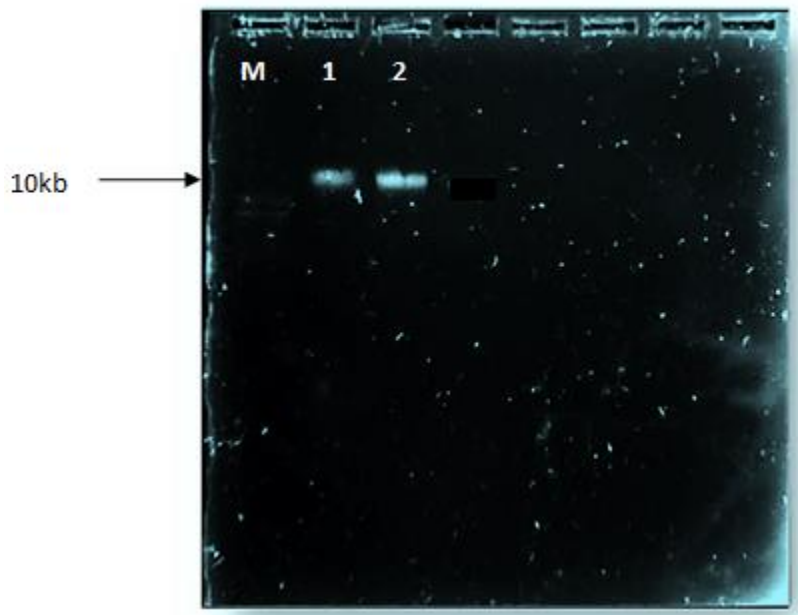


Figura 18.-Electroforesis del DNA cromosomal, en gel de agarosa al (1%).

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1 Kb DNA # SM1163. Carril (1) EPEC. Carril (2) *E. coli* ATCC 11229.

El resultado exitoso de la extracción, permitió que se procediera a la realización de la PCR y posteriormente la purificación del producto de las muestras de ambas cepas.



7.2.2. PCR amplificación del gen ARNr 16s y purificación.

El ARNr 16s además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia, y además constituye una herramienta muy útil en el estudio de la diversidad bacteriana, por lo que ha sido objeto de estudio en gran número de especies bacterianas. La secuencia del gen ARNr 16s presenta de forma aproximada, un peso de 1,500 bp (Fernández, 2010).

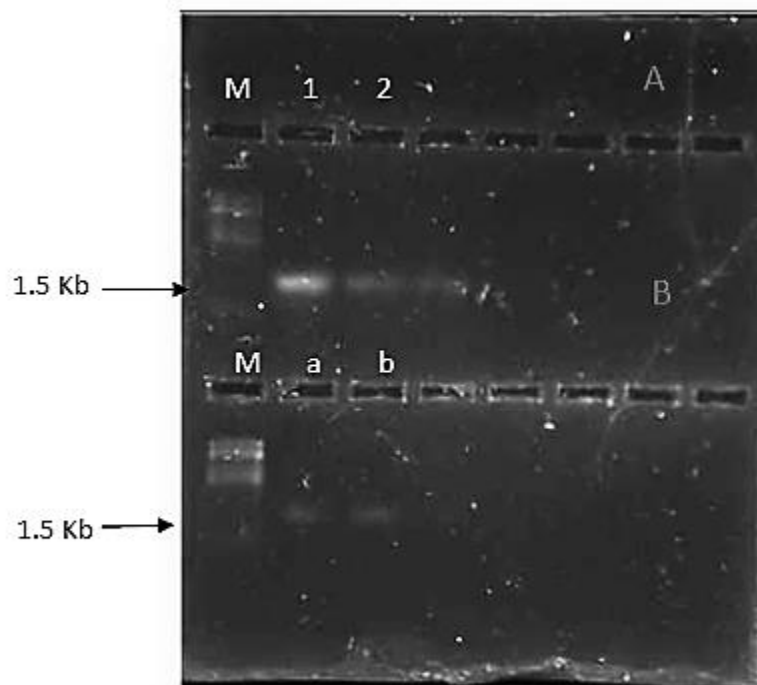


Figura 19.-Electroforesis del producto de PCR del gen ARNr 16s en gel de agarosa al (1%)

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) EPEC. Carril (2) *E. coli* ATCC 11229. B: Producto de PCR purificado. Carril (M) marcador molecular de fermentas 1Kb Carril (a) EPEC. Carril (b) *E. coli* ATCC 11229.

El gel revela que si se logra la amplificación del gen ARNr 16s, ya que fue posible observar las dos bandas en el peso de 1.5 Kb, lo que era esperado para este gen (figura 19, sección A) y se pueden observar solamente una banda.



La figura 19 sección (B) muestra las bandas de la purificación del producto de PCR, nuevamente en la fracción 1.5 kb, lo que era esperado, ya que la función de la purificación, únicamente es la de eliminar impurezas que pudieran encontrarse de la extracción y de la reacción de PCR.

7.2.3. Secuenciación del gen ARNr 16s.

Los datos reportados para cada cepa del análisis con el NanoDrop. Para los productos de PCR purificado se analizaron las absorbancia a 260, 280 y 230 nm los resultados se presentan en la tabla 23.

Tabla 23.-Datos obtenidos de las muestras purificadas del gen ARNr 16s analizadas por el Nanodrop para las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229.

	EPEC	11229
260 A	0.349	0.413
280 A	0.168	0.206
[DNA] ng/μL	17.4	20.7
Relación 260/280	2.08	2.01
Relación 260/230	1.40	1.58

Los valores obtenidos a 260, indican una buena concentración del DNA extraído y purificado para las dos cepas, pero especialmente para *E. coli* ATCC 11229. Los valores a 280 nm reportan que ésta última contiene mayor concentración de proteína, y la que menor concentración contiene y en consecuencia está más pura es la cepa EPEC. En el caso de la concentración de DNA, éste presentó menor concentración para la cepa EPEC.

Para el caso de las relaciones 260/280, la cepa EPEC y la *E. coli* ATCC11229 presentan un valor de 2.08 y 2.01 respectivamente, indicó que las muestras están



puras respecto a la concentración de proteína y que son adecuadas para análisis molecular posterior, como la reacción de PCR, PCR múltiple, etc.

De la relación 260/230, se observa que las dos son menores de 1.8, lo que puede indicar la presencia de residuos contaminantes químicos solubles en fenol presentes aún después de la extracción. Sobre todo para el caso de la EPEC que es la que presenta el valor más alejado del límite inferior.

Aunque los resultados de contaminantes solubles en fenol no son aceptables, en general el criterio más aceptado para un trabajo posterior del material genético es el grado de contaminación con proteína (relación 260/280), por lo cual se procedió a emplear estos productos para la secuenciación.

7.2.4. Análisis filogenético

7.2.4.1. Árbol filogenético por Neighbor-Joining de gen ARNr 16s.

En el árbol presentado en la Figura 20, se puede observar, miembros, sin excepción, descienden de una misma especie troncal, lo que era de esperarse por ser secuencias del mismo gen para la misma especie. Por lo tanto es normal la homología observada. Lo único que las diferencia es del lugar en donde fueron aisladas que es diferente para cada caso.



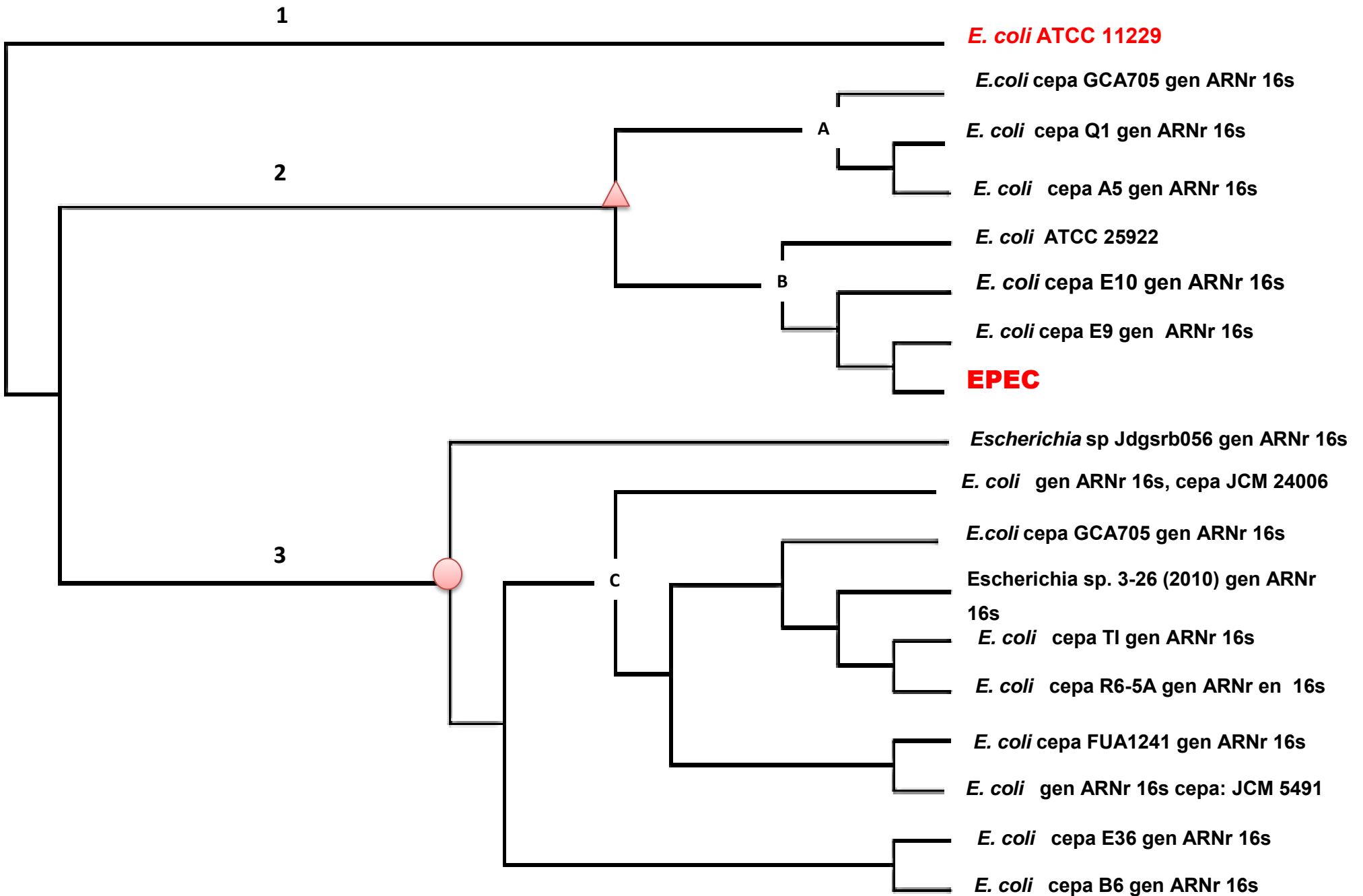


Figura 20.- Árbol filogenético del gen ARNr 16s para las cepas EPEC y *E. coli* ATCC 11229

Por el método Neighbor-Joining, creado a partir de las secuencias obtenidas del gen ARNr 16s para las cepas EPEC y ATCC 11229. Algoritmo de sustitución de nucleótidos Jukes cantor, además de las 5 secuencias con mayor porcentaje de identidad del GenBank

Respecto a la cepa EPEC se observó que se agrupa con otras cepas de *E. coli*, con las que se encuentra agrupada en el mismo nodo y presenta mayor similitud ya que se encuentran dentro del mismo grupo B; Sin embargo de acuerdo a datos obtenidos de la página de GenBank, no son patógenas.

Con respecto a la *E. coli* ATCC 11229, la cual se encuentra en otro ramal y no se le ve relación directa con las otras 17 secuencias.

Tabla 24.- Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen ARNr 16s.

No GenBank	CEPA	%ID	VALOR E	% COBERTURA
EF560784	<i>E. coli</i> cepa BE41 gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
AB594752	<i>E. coli</i> gen ARNr 16s cepa: JCM 5491	100	0.0	99
HQ154567	<i>E. coli</i> cepa R6-5A gen ribosomal RNA en 16s	100	0.0	99
HQ169122	<i>E. coli</i> cepa FUA1241 gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
HM489943	<i>Escherichia</i> sp. 3-26 (2010) gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
GU5943318	<i>E. coli</i> cepa E9 gen ribosomal RNA 16s	99	0.0	100
GU594315	<i>E. coli</i> cepa E10 gen ribosomal RNA 16s	99	0.0	100
HM371196	<i>E. coli</i> cepa Q1 gen ribosomal RNA 16s	99	0.0	100
GU594312	<i>E. coli</i> cepa E36 gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
HM209775	<i>E. coli</i> cepa GCA705 gen ribosomal RNA 16s	99	0.0	100
GU265555	<i>E. coli</i> cepa TI gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
AB548579	<i>E. coli</i> gen 16s ARNr, cepa JCM 24006	100	0.0	99
GQ503809	<i>Escherichia</i> sp Jdgsrb056 16s gen ribosomal RNA	100	0.0	99
GU594296	<i>E. coli</i> cepa B6 gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99
GU594301	<i>E. coli</i> cepa A5 gen ribosomal RNA 16s	100	0.0	99



La tabla 24 muestra que todas las secuencias pertenecen a cepas de *E. coli* y del gen ARNr 16s, así como que poseen un porcentaje de identidad muy bueno en la mayoría de los casos de 100%, así mismo el porcentaje de cobertura, lo que nos garantiza un correcto análisis del gen ARNr 16s, pero no se observa discrepancia entre las cepa patógena y las inocuas lo que se esperaba ya que el análisis es para el mismo gen, de la misma especie, y no logra diferenciar una patógena de las inocuas.

El método del análisis por medio del gen ARNr 16s, ha sido empleado con éxito desde hace varios años, como lo demuestra (Weisburg, 1990), que al amplificar este gen es posible un análisis filogenético y estudiar especies bacterianas extremadamente exigentes o altamente patógenos sin la necesidad de cultivarlos.

7.2.5. PCR múltiple a partir de DNA cromosomal extraído de la cepa pura.

7.2.5.1. Diseño de primers.

Se realizó una búsqueda bibliográfica para recabar datos de primers, reportados como específicos para las cepas de *E. coli* Enteropatógena ya probados para cada uno de nuestros genes. Además se diseñaron nuevos primers con ayuda del conjunto de programas incluidos en el sitio de libre acceso WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/> último acceso diciembre 1, 2012), el cual permitió realizar pruebas de alineamientos entre los mismos y la secuencias de cepas patógenas de *E. coli* obtenidas de la base de datos del GenBank de la página de NCBI y de la cepa Enteropatógena secuenciada anteriormente.

Mediante los alineamientos de primers bibliográficos y diseñados, se seleccionaron los oligonucleótidos que formaban las secuencias consenso de mayor tamaño y formaban la mayor área de empalme lo que garantizó una amplificación específica. A partir de la teoría se eligieron las condiciones para la amplificación múltiple



El valor del Tm determinó el gradiente de temperatura de alineamiento o la temperatura a la que se realizaría con mayor éxito la amplificación por PCR Múltiplex.

La recepción de los nucleótidos sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y con la información otorgada por el proveedor para cada nucleótido se encuentran reportados en la tabla 25, se realizaron las primeras pruebas para la amplificación por PCR múltiple, se puede observar que estos datos no difieren de manera significativa con respecto a los datos teóricos detallados en la tabla 8.

Tabla 25.-Oligonucleótidos sintetizados y sus características otorgadas por el proveedor.

GEN	Oligonucleótidos	Tm(°C)	Concentración (pmol/μL)
eae	5' CTGAACGGCGATTACGCGAA 3'	Fw - 66	270
	5' CCAGACGATACGATCCAG 3'	Rv - 64	486
bfp	5' CAATGGTGCTTGCGCTTGCT 3'	Fw - 66	419
	5' AGTGACTGTTCCGGGAAGCAC 3'	Rv - 66	278

La tabla 26 presenta los reportes de síntesis con las características para cada uno de los oligonucleótidos, (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/>).

Tabla 26.-Reporte de síntesis para cada oligonucleótido.

	Coef	Nanodrop A 260	OD's Totales	Conc. μg/μL	C+G (%)	Tm 1	Tm 2	p.m
eae Fw	227.5	0.358	13.43	0.89	55	66.45	62	6474.00
eae Rv	202	0.557	21.54	1.42	55.55	64.44	56.00	5766.00
bfp Fw	203.5	0.553	20.75	1.37	55	66.45	62	6438
bfp Rv	225.9	0.371	13.92	0.92	55	66.45	62	6505



7.2.6. Optimización y amplificación de los genes *eae* y *bfp*-Gradiente de temperatura.

7.2.6.1. Gradiente de temperatura para el gen *eae*.

En el caso del gen *eae* con la mezcla de reacción de la tabla 12 y las condiciones de amplificación de la tabla 14 se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 21.

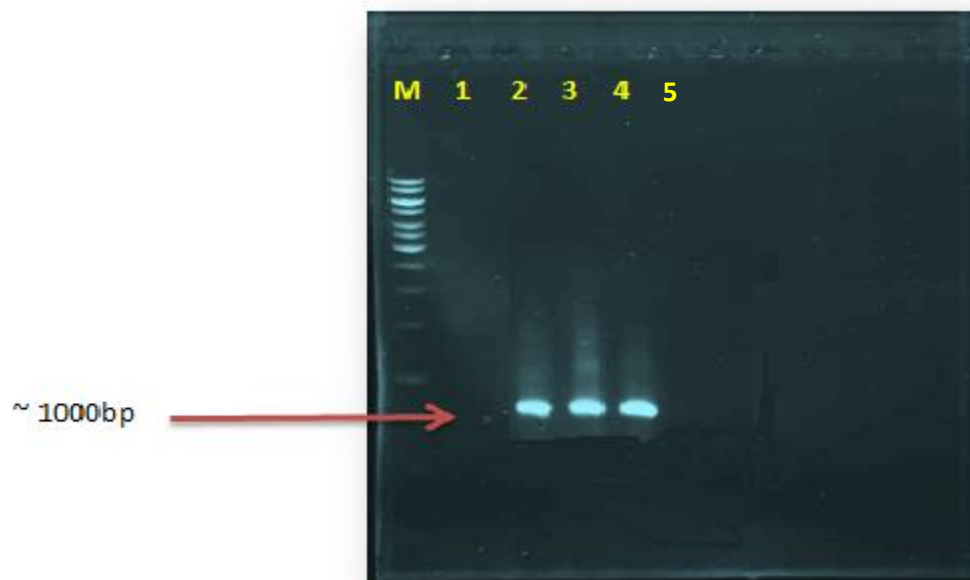


Figura 21.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del gradiente de temperatura para el gen *eae*.

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) 58°. Carril (2) 56°. Carril (3) 53°. Carril (4) 51°. Carril (5) control negativo (*E. coli* ATCC 11229)

Se muestra la amplificación del gen *eae* en el rango de temperatura de 51°C-58°C con buen rendimiento y un peso experimental de alrededor de 1000 bp, No se observaron diferencias con respecto a la intensidad presentada por las bandas al variar la temperatura de alineamiento. Además de que se demostró la especificidad del método de PCR para la amplificación de este gen al obtenerse solo una banda.



7.2.6.2. Gradiente de temperatura para el gen *bfp*

Para el gen *bfp* se utilizó la mezcla de la tabla 13 (inciso 6.4.2) y las condiciones de amplificación de la tabla 14 (inciso 6.4.2) y se obtuvo del gradiente que la temperatura óptima para la amplificación del gen *bfp* fue de 56 °C ya que fue la banda que se observó con mayor intensidad y el peso del producto amplificado se encontró alrededor de 2500 bp. Se observó un rendimiento menor al presentado por el gen *eae* en la figura 22 se muestran los resultados.

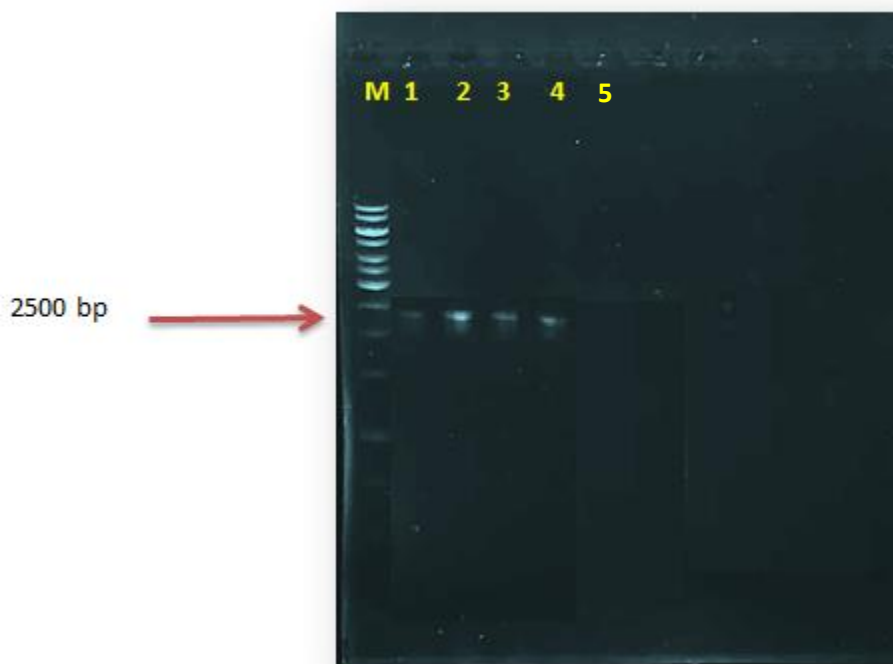


Figura 22.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) para el gradiente de temperatura para el gen *bfp*.

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de Fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) 58°. Carril (2) 56°. Carril (3) 53°. Carril (4) 51° y Carril (5) control negativo (*E. coli* ATTC 11229)

Sin embargo de la misma manera que el gen *eae*, se observó la amplificación de una sola banda en cada temperatura garantizando especificidad para el gen *bfp*



7.2.6.3. Optimización de temperatura de alineamiento para los primers en ambos genes

La figura 23 muestra una sola banda para cada gen por separado, íntegra y de buena intensidad. También se observó que el gen *eae* amplificó muy bien a la temperatura óptima de alineamiento del gen *bfp*, por lo que la temperatura de 56°C es la que quedó establecida como la idónea para lograr la amplificación múltiple. Con esto se consideraron establecidas las condiciones de reacción con las que sería programado el termociclador para llevar a cabo la reacción de PCR-múltiple, mostradas en la tabla 27.

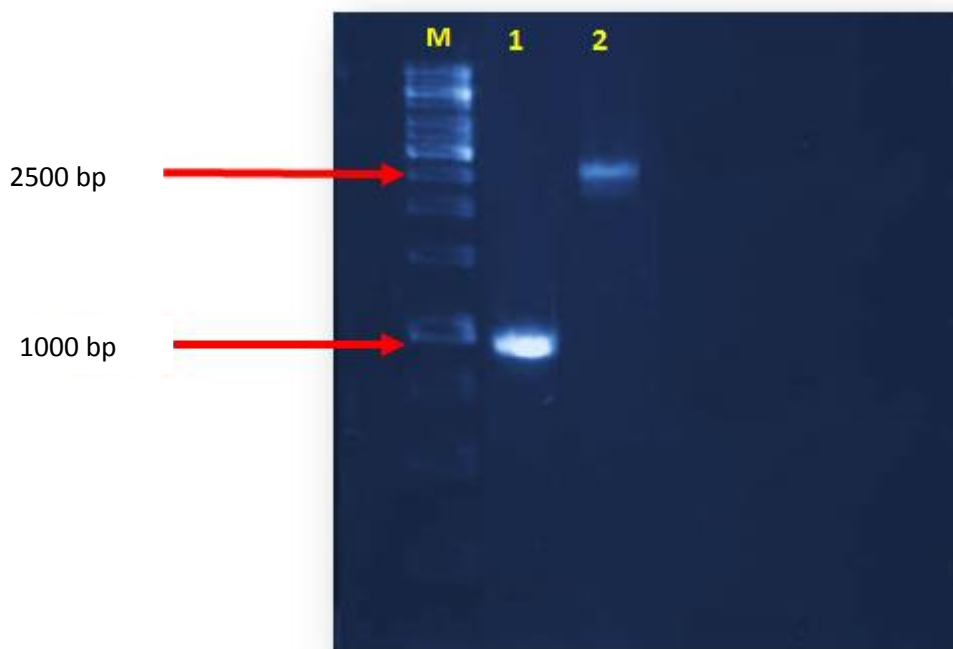


Figura 23.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) de la amplificación de genes a 56 °C.

Amplificación de genes *eae* y *bfp* a 56 °C, condiciones de corrida 100 V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) Gen *eae* (2) Gen *bfp*.



Tabla 27.-Condiciones óptimas para la amplificación múltiple.

Temperatura	Tiempo	# ciclos
95^o	5 min	1
95^o 56^o 72^o	1 min 1 min 1.5 min	30
72^o	5 min	1

Una vez establecida la temperatura de alineamiento a 56°C, se procedió a determinar las condiciones de MgCl₂ y de concentración de primers para lograr realizar la amplificación simultánea por PCR múltiple a partir del DNA cromosomal extraído de la cepa.

7.2.6.4. Gradiente de MgCl₂.

Se buscó determinar las concentraciones de MgCl₂ para optimizar la amplificación simultánea. La concentración de MgCl₂ que previamente se utilizó fue de 2.5 mM, y se deseaba verificar que esta fuera la concentración idónea para la amplificación múltiple o si podría establecerse otra con mejor rendimiento. El gel del gradiente se presenta a continuación figura 24.





Figura 24.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del gradiente de concentración de MgCl₂.

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de Fermentas 1Kb DNA # SM1163. (Carril 1) 2 mM. (Carril 2) 2.5mM. (Carril 3) 3 mM. (Carril 4) 4 mM. (Carril 5) Control negativo *E. coli* ATTC 11229

Se trabajaron condiciones de PCR múltiple con concentraciones de MgCl₂ de 2 mM, 2.5 mM, 3 mM y 4 mM y se observó las bandas en su peso esperado y que la concentración óptima es la que se había estado usado en los experimentos anteriores (2.5 mM) ya que a 2 mM no amplificaron los genes y a 3 mM se logró la amplificación pero nuevamente se observó que favorecía la amplificación del gen *eae* sobre el *bfp*; por su parte a una concentración de 4 mM solo se observó la amplificación del gen *eae*. Con estos resultados se concluyó que la concentración de 2.5 mM de MgCl₂ empleada anteriormente es la idónea y óptima para la reacción múltiple.



7.2.6.5. Prueba de concentración de primers.

Se realizó un gradiente de la concentración de primers, para optimizar la amplificación múltiple para ambos genes.

La figura 25 muestra el gradiente de concentración realizado a los primers realizado por duplicado, observándose bandas en el peso esperado para cada gen y demostró que las concentración óptimas fue 0.2 μM , ya que a pesar de haberse logrado amplificar a 0.4 μM , 0.6 μM y 0.8 μM , a 0.2 μM se obtuvo la amplificación más específica al no observarse dímeros y al lograrse la amplificación de ambos genes por lo que quedó establecida como la concentración óptima para obtener la reacción múltiple. Sin embargo se siguió observando un rendimiento mayor en el gen *eae*, sobre el gen *bfp*, para homologar el rendimiento se optó por trabajar con una concentración del 0.2 μM para el gen *bfp* y con el 0.1 μM para el gen *eae*.

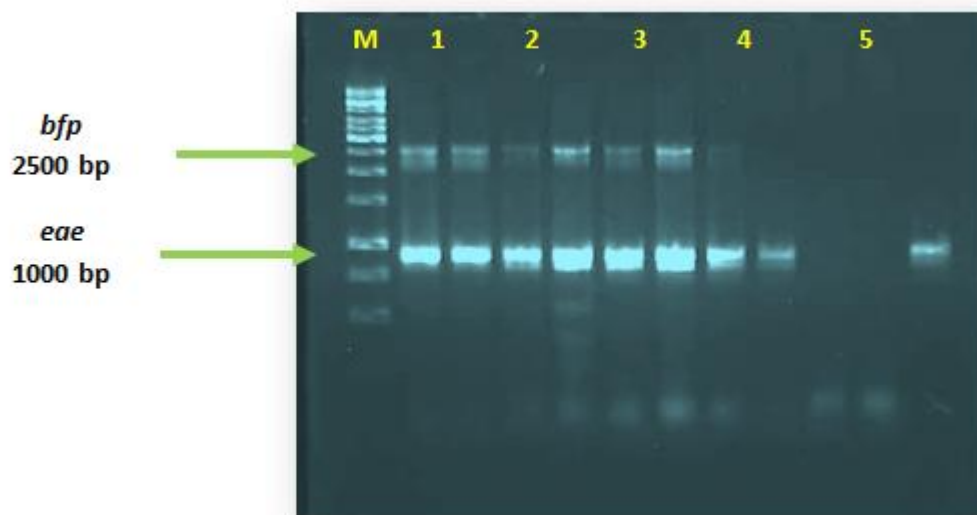


Figura 25.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) para el gradiente de concentración de primers.

Condiciones de corrida 100 V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) 0.2 μM . Carril (2) 0.4 μM . Carril (3) 0.6 μM . Carril (4) 0.8 μM . Carril (5) 1 μM



El gel también muestra que conforme va en aumento la concentración, sólo se favorece la amplificación del gen *eae* como es el caso de la concentración 0.8 μM , y en el caso de 1 μM donde no amplificó ninguno de los 2 genes, por ello se demostró que la concentración de primers influye de manera directa sobre el rendimiento de la reacción.

Finalmente las condiciones determinadas experimentalmente para la PCR múltiple se reportan a continuación, tanto la mezcla de reacción final como las condiciones de amplificación.

Tabla 28.-Mezcla de reacción para la PCR múltiple de los genes *eae* y *bfp* de *E. coli* Enteropatógena.

Mezcla de reacción	Volumen para una reacción de 50 μL
Buffer KCl 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 Mm, gelatina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	5 μL
MgCl ₂ (2,5,mM)	5 μL
dNTP (0.2 mM de cada uno)	1 μL
<i>eae</i> Fw (0.1 μM)	1.9 μL
<i>eae</i> Rv (0.1 μM)	1.0 μL
<i>bfp</i> Fw (0.2 μM)	2.4 μL
<i>bfp</i> Rv (0.2 μM)	3.6 μL
Taq polimerasa (1 U/ μL)	1.25 μL
Templado	1 μL
Agua	c.b.p. 50 μL

Las condiciones de amplificación se muestran a continuación en la tabla 29

Tabla 29.-Condiciones de amplificación para los genes *eae* y *bfp* de *E. coli* Enteropatógena.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	# ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	30
Amplificación	56	1	
	72	1.5	
Amplificación final	72	5	1



7.2.6.6. Secuenciación de genes *eae* y *bfp*.

Las secuencias en formato FASTA del gen ARNr 16s para la cepa EPEC y las secuencias del gen *eae* y *bfp*, obtenidos a través del programa BioEdit se muestran en el anexo VI

7.2.7. Construcción de dendogramas.

7.2.7.1. Dendograma gen *eae*

La figura 26 presenta el dendograma elaborado con la secuencia consenso del gen *eae*, más 20 secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank, las cuales presentaban el mayor porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura cercano a 100%, así como un valor de expectancia igual a 0.0. La identidad de cada secuencia, así como los parámetros reportados por el BLAST (% identidad, valor de expectancia (E) y el % de cobertura) se indican en la tabla 30.

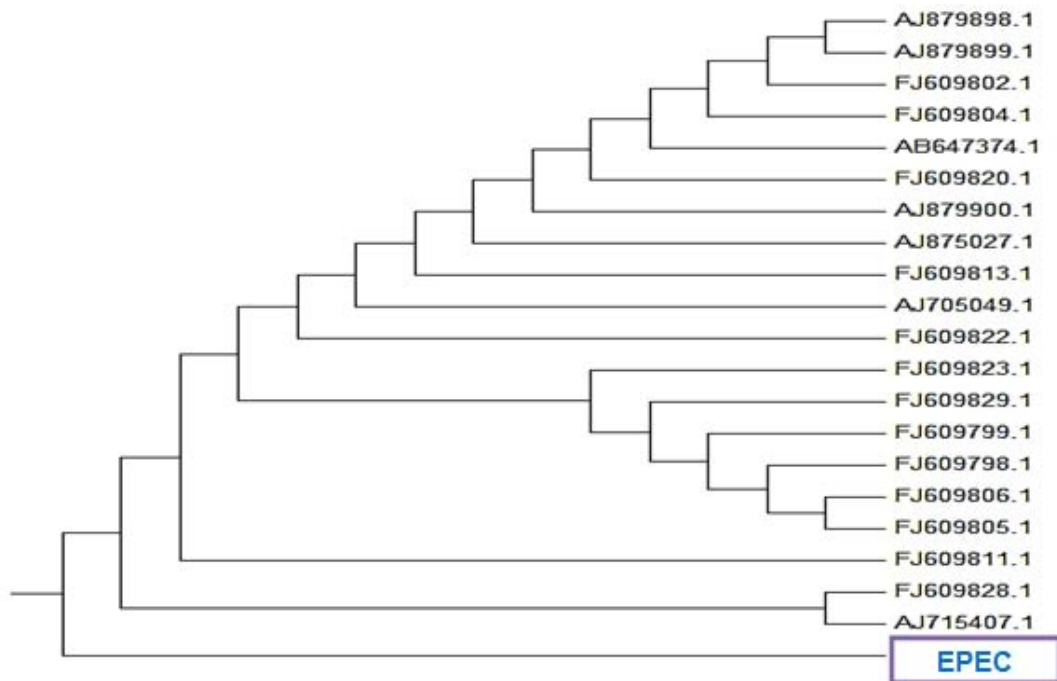


Figura 26.-Dendograma gen *eae*

Empleando el algoritmo de comparación Jukes Coantor que presenta la secuencia consenso del gen *eae*, además de las secuencias elegidas con mayor similitud obtenidas por el BLAST del NCBI..



Tabla 30.-Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen eae.

No GenBank	CEPA	%ID	VALOR E	% COBERTURA
AJ879898.1	<i>E. coli</i> gen eae para intimina eta-2 cepa EPEC-FV51094113/1	93%	0.0	99
AJ879899.1	<i>E. coli</i> gen eae para intimina eta-2 cepa EPEC FV51B-4115/2	93%	0.0	99%
FJ609802.1	<i>E. coli</i> cepa C189-84 gen (eae), eae-beta 4	93%	0.0	99%
FJ609804.1	<i>E. coli</i> cepa 010-311082 gen (eae) , eae-gamma3	93%	0.0	99%
AB647374.1	<i>E. coli</i> gen eae para intimina sero variedad O142H34 aislado ECO1-383	93%	0.0	99%
FJ609820.1	<i>E. coli</i> cepa 22B7 intimina gen (eae), eae-gamma 3	93%	0.0	99%
AJ879900.1	<i>E. coli</i> gen eae gene para intimina eta-2 cepa EPEC FV 114/1-3933/5/1	93%	0.0	99%
AJ875027.1	<i>E. coli</i> gen eae para intimina delta cepa EPEC-152.1	93%	0.0	99%
FJ609813.1	<i>E. coli</i> cepa 28E2 intimina gen (eae) eae-epsilon 6	93%	0.0	99%
AJ705049.1	<i>E. coli</i> gen eae para intimina mu, cepa EPEC-373	93%	0.0	99%
FJ609822.1	<i>E. coli</i> cepa 110B3 intimina (eae), eae-épsilon	93%	0.0	99%
FJ609823.1	<i>E. coli</i> cepa 93H5 intimina gen (eae), eae-alpha 1	93%	0.0	99%
FJ609829.1	<i>E. coli</i> cepa 77E5 intimina gen (eae)	93%	0.0	99%
FJ609799.1	<i>E. coli</i> cepa DEC 1a intimina gen (eae) eae-alpha	93%	0.0	99%
FJ609798.1	<i>E. coli</i> cepa 830542 intimina gen (eae) gene	93%	0.0	99%
FJ609806.1	<i>E. coli</i> cepa RN587/1 intimina (eae) gene	93%	0.0	99%
FJ609805.1	<i>E. coli</i> cepa SC373/2 intimina gen (eae).	93%	0.0	99%
FJ609811.1	<i>E. coli</i> cepa 41E8 intimina gen (eae), eae-epsilon 8	93%	0.0	99%
FJ609828.1	<i>E. coli</i> cepa 124B6 intimina (eae), eae-gamma 6	93%	0.0	99%



Se observó que la secuencia consenso posee el mismo origen troncal que el de las secuencias obtenidas del GenBank, también se observa que las secuencias con las que posee mayor similitud son con las secuencias que poseen el mayor porcentaje de identidad y que pertenecen a cepas aisladas de EPEC. Cepas que se encuentran enlistadas en la tabla 30.

7.2.7.2. Dendograma gen *bfp*.

En el caso del gen *bfp*, en el dendograma al comparar con otras 20 secuencias obtenidas de la base de datos GenBank presentado en la figura 27, con el criterio de selección de mayor porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura cercano a 100%, estas secuencias se enlistan en la tabla 31.

De nuevo se observó que el gen *bfp* presentó mayor similitud con las cepas que poseen mayor porcentaje de identidad, en este caso a diferencia del gen *eae* en este caso los porcentajes de identidad no son muy altos, pero el porcentaje de cobertura es bueno.

Lo que se pudo comprobar con este análisis que a pesar de que la secuencia con la que el gen *bfp* se encuentra más estrechamente relacionada no posee el mayor porcentaje de identidad si pertenece a serotipos reportado para la cepa EPEC en la tabla 2 y confirmados en la tabla 31, tales como 0111, 0127 y 0142, demostrando que se tratan de secuencias relacionadas con la EPEC (Alarcón, 2007).



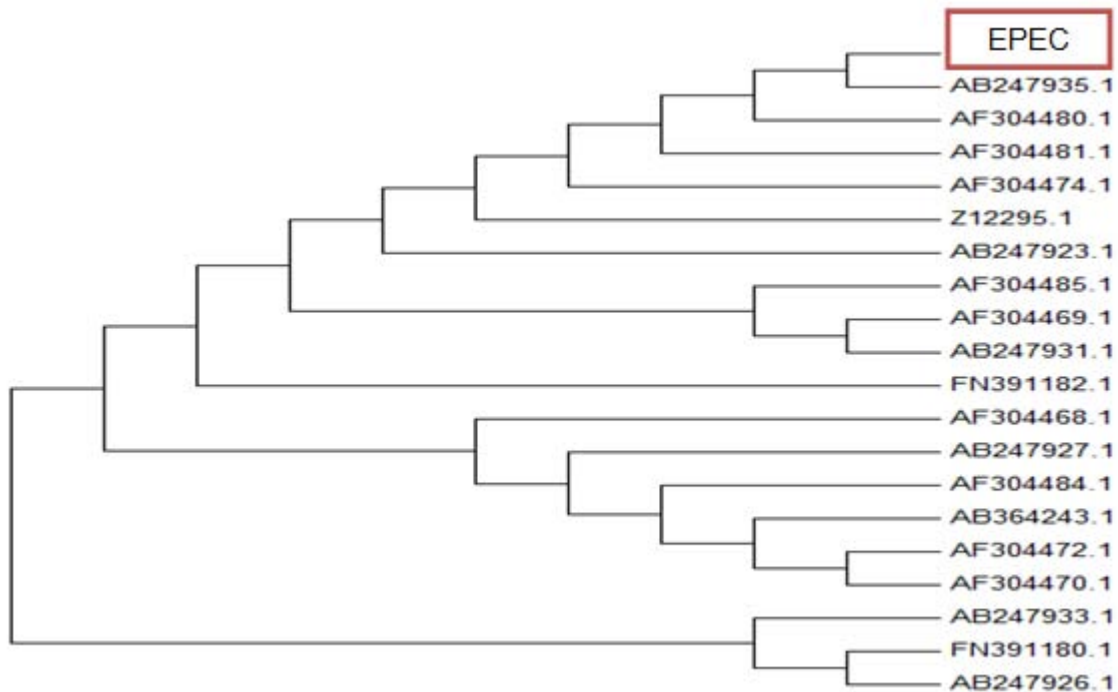


Figura 27.-Dendograma gen *bfp*.

Empleando el algoritmo de comparación Jukes Coantor que presenta la secuencia del Fw del gen *bfp*, además de las secuencias elegidas con mayor similitud obtenidas por el BLAST del NCBI.

La amplificación múltiple de los genes *eae* y *bfp*, como parte de la identificación de EPEC, ya se ha empleado previamente (*et al* Da costa., 2010), por medio de este método y con los genes (*eae* y *bfp*), es posible la Identificación y diferenciación de la EPEC entre otras cepas diarreogénicas de *E. coli* y como su simplicidad, economía y eficiencia, hace posible la aplicación de los protocolos múltiples para agilizar el diagnóstico molecular.

A sí mismo Afset (2004), también utilizo los genes *eae* y *bfp*, como factores de virulencia específicos para la cepa EPEC a su vez empleándolos como método para identificación por medio de la PCR múltiple, logrando establecer el papel y la epidemiología de las cepas no tradicionales Enteropatógenicas de *E. coli* como el serogrupo aún no establecido *E. coli* O157: H45. Sin embargo, se describen en asociación con enterocolitis y diarrea esporádica en humanos. Los autores lograron reportar el primer aislamiento de EPEC O157:H45 típica como cepas de ganado.



Por otra parte, los resultados con el antígeno O157 no son siempre STEC pero puede pertenecer a otros patotipos. También el ganado parece ser el reservorio de O157: H45 cepas EPEC; Sin embargo se describen en asociación con enfermedades humanas. Por lo tanto, estas cepas parecen desempeñar el papel de los patógenos transmitidos por los alimentos y tienen que ser considerados y evaluados en vista de la seguridad alimentaria.

Tabla 31.-Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen *bfp*.

No GenBank	CEPA	%ID	VALOR E	% COBERTURA
AB247935.1	<i>E. coli</i> O142:H6 gen <i>bfpA</i> para bundling-2a cepa KI1429	72%	0.0	99%
AF304480.1	<i>E. coli</i> cepa E990 bundlin alpHa-1 gen (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
AF304481.1	<i>E. coli</i> cepa HSP 19/4 bundlin alpHa-1 gen (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
AF304474.1	<i>E. coli</i> cepa beta bundling alpHa-1 gen (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
Z12295.1	<i>E. coli</i> gen <i>bfpA</i> para mayor estructura de la subunidad para el pillus formador de penachos	71%	0.0	99%
AB247923.1	<i>E. coli</i> O127:H6 gen <i>bfpA</i> bundling alpHa-2a cepa 2348/69	72%	0.0	99%
AF304485.1	<i>E. coli</i> cepa w bundling alpHa-2 (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
AF304469.1	<i>E. coli</i> cepa 009-2710820 bundlin alpHa-2 (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
AB247931.1	<i>E. coli</i> O111:H2 gen <i>bfpA</i> para bundling-2a cepa 8861	72%	0.0	99%
FN391182.1	<i>E. coli</i> gen <i>bfpA</i> para alpHa-5 bundlin cepa FV13192- IH2859F	63%	0.0	99%
AF304468.1	<i>E. coli</i> cepa 10 bundlin alpHa-3 (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	99%
AB247927.1	<i>E. coli</i> OUT:H6 gen <i>bfpA</i> para bundling-2b KI1436	72%	0.0	99%
AF304484.1	<i>E. coli</i> cepa RM410/I bundling alpHa-3 gen (<i>bfpA</i>)	67%	0.0	98%
AB364243.1	<i>E. coli</i> O15:H34 gen <i>bfpA</i> para bundling-2b cepa KM998	68%	0.0	98%
AF304472.1	<i>E. coli</i> 0659-79 bundlin alpHa-3 (<i>bfpA</i>)	65%	0.0	98%
AF304470.1	<i>E. coli</i> cepa 010-311082 bundlin alpHa-3 (<i>bfpA</i>)	79%	0.0	99%
AB247933.1	<i>E. coli</i> O157:H45 gen <i>bfpA</i> beta 14 bundlin cepa KI1857	72%	0.0	90%
FN391180.1	<i>E. coli</i> gen <i>bfpA</i> para beta-8 bundlin cepa FV9991	63%	0.0	87%
AB247926.1	<i>E. coli</i> OUT:H12 gen <i>bfpA</i> para beta-13 bundlin cepa KI1333	72%	0.0	88%



7.2.8. Extracción de ADN cromosomal a partir de la muestra sin inocular.

La figura 28, muestra las 3 extracciones de DNA cromosomal que se realizó a las muestras extraídas en el proceso de pre enriquecimiento de la carne sin inocular, podemos observar que se realizó con éxito la extracción ya que se visualizan las bandas en el peso esperado de 10 kb y no presentan degradación. Observándose con menor intensidad la banda al tiempo 24 h esto se debe o bien a una baja eficiencia de extracción o que cuando se tiene una alta concentración microbiana supera el límite de extracción del kit de extracción lo que se refleja en un menor rendimiento.

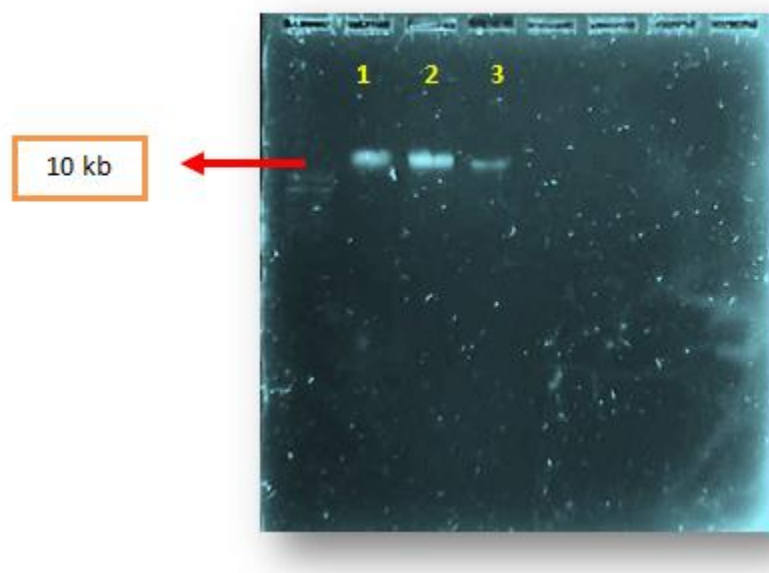


Figura 28.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) de la extracción del ADN cromosomal sin inocular.

Condiciones de corrida 100V. (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) muestra al tiempo 0 h. Carril (2) muestra al tiempo 3 h. Carril (3) muestra al tiempo 24 h.

Con esta prueba se demostró que es posible la extracción de DNA cromosomal de buena calidad a partir del alimento, lo que indica que el método de extracción y preeriquecimiento es apto y eficiente, para la muestra problema también demuestra que es conveniente seguir tomando las muestras en los periodos establecidos en el preenriquecimiento.



7.2.9. Análisis molecular a partir de la muestra de carne inoculada.

Después de los resultados obtenidos en la extracción de DNA a partir de muestras sin inocular, en el cual al realizarle PCR múltiple no se observó amplificación de ninguno de los genes, lo cual indico la ausencia de EPEC en la muestra con el método desarrollado en el presente trabajo. Se empezó a trabajar con las muestras ya inoculadas con una concentración de 10^7 UFC/g con la cepa patógena (EPEC); Por lo que se realizó el mismo procedimiento de pre enriquecimiento ya establecido y probado, pero esta vez inoculado, se realizó una extracción de DNA a los tres tiempos establecidos junto con el de la muestra de la cepa inocua ATCC 11229 para emplearla como control de la reacción. A estos templados cromosomales se les realizo la PCR múltiple, seguido de electroforesis para visualizar los resultados como los muestra la figura 29. En donde se puede observar como en el carril (1) en donde se colocó la muestra de la cepa ATCC 11229, no hubo reacción alguna lo que se esperaba debido a que se trataba de la cepa inocua y control negativo, en el carril (2) y (3) se observan los genes individuales *bfp* y *eae* sucesivamente se observaron las bandas en los pesos esperados para cada uno y de buena calidad.

Por último los productos de PCR múltiple obtenidos para los tres tiempos para los 3 tiempos analizados durante el preenriquecimiento y con buena intensidad en ambas bandas.



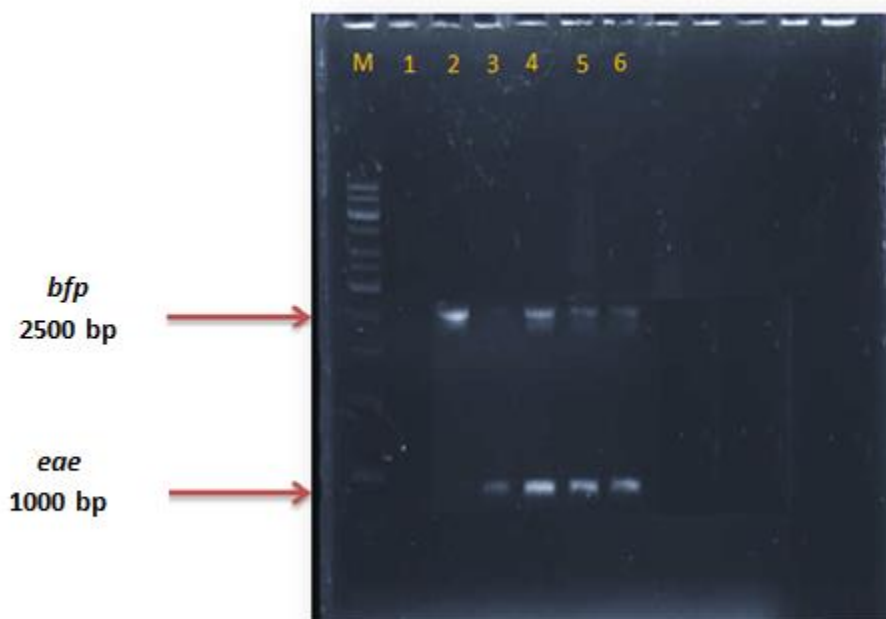


Figura 29.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada.

Condiciones de corrida 100V. (M) corresponde al marcador molecular de fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) PCR múltiple a la cepa ATCC 11229. Carril (2) Gen *bfp* de muestra de carne inoculada. Carril (3) Gen *eae* de muestra de carne inoculada. Carril (4) PCR múltiple al tiempo (0 h). Carril (5) PCR múltiple al tiempo (3 h). Carril (6) PCR múltiple al tiempo (24 h).

7.2.1. Determinación de sensibilidad del método.

A partir del dato obtenido de la cuantificación celular realizada con la cepa inocua *E. coli* ATCC 11229 y establecido que a partir de la inoculación con una célula y sin diluciones la concentración se encontraba alrededor de 10^7 UFC/g a las 24 h (6.5.3), se decidió determinar la sensibilidad del método y se trabajó con diluciones finales de 10^4 , 10^3 , 10^2 y 1 UFC/g para inocular las muestras de carne. Realizándose extracciones en los tres tiempos establecidos en el pre enriquecimiento y la siembra por duplicado en agar McConkey para cuantificar el desarrollo.



A continuación se muestran las cuantificaciones realizadas a los tiempos 0 h, 3 h y 24 h cuantificando las concentraciones finales obtenidas para cada concentración inicial probada. Para evaluar el desarrollo del microorganismo.

Tabla 32.-Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada concentración 10^4

Tiempo (h)	0 h	3 h	24 h
Concentración final (UFC/g)	6.3×10^6	1×10^7	2×10^8

Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada a la concentración de 10^4 , incubado a 35°C a los tiempos 0, 3 y 24h

Para la cuantificación se tomaron las cajas representativas dentro del rango de 15-150 UFC y colonias con características típicas de *E. coli* ya que este medio sólo manifiesta características fenotípicas. La tabla 32 muestra el desarrollo cuantificado, mostrando un incremento en la concentración final conforme aumenta el tiempo de incubación llegando hasta una concentración final 2×10^8 UFC/g a las 24 h.

Tabla 33.-Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada. Concentración 10^3

Tiempo (h)	0 h	3 h	24 h
Concentración final (UFC/g)	6×10^5	6×10^6	9×10^7

Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada a la concentración de 10^3 , incubado a 35°C a los tiempos 0,3 y 24h

Los resultados a la concentración inicial de 10^3 UFC/g, mantiene el comportamiento de desarrollo observado en la concentración anterior, un aumento en la concentración final conforme la incubación avanza.



Tabla 34.-Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada concentración de 10¹.

Tiempo (h)	0 h	3 h	24 h
Concentración final (UFC/g)	1 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵	7 x 10 ⁵

En este caso se observó que la concentración final a diferencia de las otras concentraciones no incrementó de manera significativa pasando en las 24 h de incubación de una concentración de 1x 10⁵ a 7x10⁵ UFC/g, conservando el orden de magnitud en los tres tiempos de incubación del preenriquecimiento.

Tabla 35.-Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada 10⁰.

Tiempo (h)	0 h	3 h	24 h
Concentración final (UFC/g)	7	6 x 10 ³ valor estimado	6 x 10 ⁵ valor estimado

Resultados de cuantificación del desarrollo de *E. coli* Enteropatógena, en muestra de carne inoculada a la concentración de 1 UFC/g, incubado a 35°C a los tiempos 0,3 y 24h.

La concentración probada de menor magnitud fue la de 7 UFC/g (valor estimado) y fue congruente con los resultados esperados conforme al comportamiento de las concentraciones anteriores, y siendo este dato considerado como sensibilidad del método y reportándose como 7 UFC/g a partir de las 0 h.

De acuerdo a los resultados de los plaques se realizó la PCR múltiple a las muestras extraídas en el tiempo de las 0 h y el resultado se muestra en la figura 30, para las tres primeras diluciones probadas.



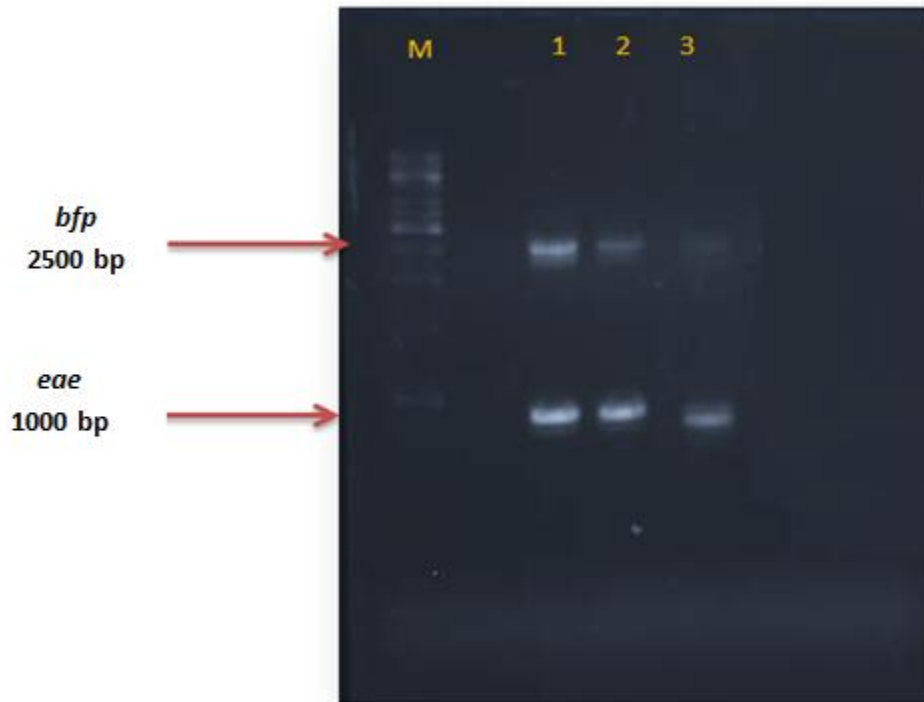


Figura 30.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada.

Condiciones de corrida 100V (M) corresponde al marcador molecular de Fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) PCR múltiple a la concentración 10^4 al $t=0$ h. Carril (2) PCR múltiple a la concentración 10^3 al $t=0$ h. Carril (3) PCR múltiple de la concentración 10^1 al $t=0$ h.

El gel comprobó lo observado en la cuantificación, conforme disminuía la concentración también la intensidad de bandas pero aún perceptibles, y de buena calidad ya que no presenta formación productos inespecíficos y en el tamaño esperado para cada gen, observándose la amplificación múltiple exitosa a partir de muestras de carne con un inóculo inicial 10^4 , 10^3 y 10^1 UFC/g.

Al comparar el desarrollo con la intensidad de bandas se comprobó que al disminuir la concentración del inóculo también disminuía la capacidad de detección lo que resaltó la importancia de un preenriquecimiento que permitió realizar la técnica de PCR múltiple con éxito y a su vez garantizando la viabilidad del microorganismo a lo largo del proceso.



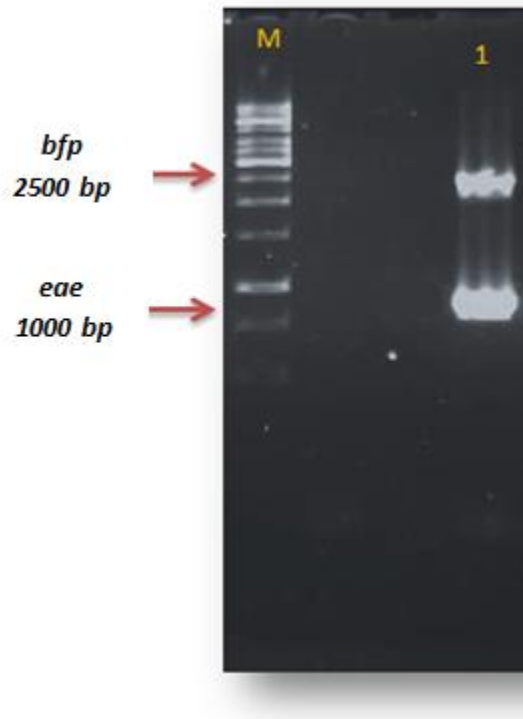


Figura 31.-Electroforesis en gel de agarosa al (1%) del PCR múltiple en carne inoculada a la dilución 10^0 UFC/g (1 UFC/g).

Condiciones de corrida 100V. Carril (M) corresponde al marcador molecular de Fermentas 1Kb DNA # SM1163. Carril (1) PCR múltiple a la concentración 10^0 UFC/g al t= 0 h

La figura 31 muestra el resultado de la PCR múltiple de la concentración más pequeña de 1 UFC/g de la cepa (EPEC) aplicada a la muestra de carne al t=0 h, el gel reveló las bandas únicas en el peso esperado, íntegras y de muy buena calidad e intensidad demostrando que el método es altamente sensible aun en concentraciones bajas de inóculo tales como 1UFC/g.



8. CONCLUSIONES

- Se identificaron a las cepas de *E. coli* Enteropatógena y ATCC 11229 por sus características coloniales, microscópicas y su metabolismo a través de pruebas bioquímicas convencionales.
- Se compararon y confirmaron resultados entre pruebas bioquímicas convencionales y métodos estandarizados como el API 20E y el sistema VITEK
- Se diseñó un nuevo método de detección molecular de la cepa *E. coli* Enteropatógena y lograr discernir entre esta y una inocua como la ATCC 11229.
- Se comprobó que la identificación fenotípica no puede ser empleado como método único de identificación y discriminatorio entre cepas inocuas y patógenas, ya que este solo se limita a las características coloniales y a su actividad metabólica, características que no presentan diferencias significativamente discriminatorias entre cepas.
- Se logró el diseño de primers específicos para la amplificación de genes típicos para la cepa EPEC.
- Se determinaron las condiciones óptimas para la amplificación múltiple.
- Los métodos moleculares como la PCR múltiple, es un método rápido altamente discriminatorio y lo suficientemente sensible para lograr una identificación específica, como en este proyecto se demostró, y en una matriz tan complicada como lo es la carne para hamburguesas congeladas.
- El proyecto permitió comprobar que los métodos moleculares PCR y PCR múltiple presentan mayor ventaja respecto a los métodos fenotípicos para la detección de patógenos en alimentos gracias a su sensibilidad y especificidad.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón Bendezú Ruth Ysabel, Li Huasasquiche Jessica Giovanna., 2007., Serotipificación de *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) en cuadros diarreicos de niños menores de 5 años., Facultad de medicina humana., Lima-Perú.,
- Afset E. Jan., Bevanger Lars., Romundstad Pal., Berg Kare., 2004., Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea., *Journal of medical Microbiology.*, 53., pág: 1137- 1144
- Argilagos Barreto Guillermo, Cabrera Sedrés Martha, Rodríguez Torrens Herlinda, Guillermo Guevara Viera., 2010., Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) aislados de coprocultivos., REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 11, núm. 3, marzo., pp. 1-15, Veterinaria Organización.
- BAM, 2003., <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
- BIOEDIT., <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- Brock Thomas D., 2012., Microbiología., treceava edición
- Campos Quintana Itzia., 2010., Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica., pág: 11 y 12.
- Cravioto A, Trujillo F, Hernández J, Eslava C., 1992., Infecciones por *Escherichia coli* México D.F., Pág.: 1 -5.
- Da costa Fusco Ana Roberta., De Sousa Oliveira Cintya., Lima Batista Valéria Karla., Loureiro Brito Carlos Edvaldo., 2010., Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos., <http://revista.iec.pa.gov.br>., Rev Pan-Amaz Saude., 1(2):77-84
- David H. Pincus., MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK 2 SYSTEM. BioMérieux, Inc., Hazelwood, Mo, USA., Peg. 1
- Escalante Adelfo, Wachter Carmen, Farres Amelia., 2000., Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican Fermented dough pozol as



determined by 16s rDNA Sequence analysis., International Journal of Food Microbiology., 64., Pág: 21-23.

- Estrada-García Teresa, Lopez-Saucedo Catalina, Thompson-Bonilla Roció, Abonce Maricel, Lopez-Hernandez Daniel, Santos José Ignacio, Rosado L Jorge, Dupont L Herbert, Long Z. Kurt., 2009., Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea., Journal of Clinical Microbiology., vol 47., No 1., pág 93-98.
- FAO, 2008., http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/quality_public.html)
- Garza-Velasco R. y Guzmán-Solano M.B., 2001., Patogenia involucrada en las enfermedades diarreicas: enteropatías ocasionadas por ECET y ECEP, Mundo Médico, 18(329): 41-48.
- Giorgio Martín Ernesto.,
- Gobernado M, López-Hontangas JL., 2003., Identificación bacteriana. Enferm Infecc Microbiol Clin., 21(Supl 2):54-60.
- Hernández Cortez Cecilia, Aguilera Arreola Ma. Guadalupe, Castro Escarpulli Graciela., 2011., Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. , Enfermedades infecciosas y Microbiología., vol. 31., núm. 4., pág. 137 -151
- Kaper James B, Nataro James P, Mobley T. L. Harry., 2004., www.nature.com/review/micro., Volumen 2., pág.,
- Lee Gi Yun., Jang Hye In., Hwang In Gyun., Rhee Suk Min., 2009., International Journal of Food Microbiology 134., 196-200
- MacFaddin, Jean., 2004., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica., 3a. ed., 1a reimp., Buenos Aires: Médica Panamericana., pág. 54, 83, 681.
- Nataro James P, Kaper James B., 1998., Diarrheagenic *Escherichia coli*., Clinical Microbiological Reviews., Vol. 11. No 1., pág.155-164.
- Olmos Fernández Ana, De la Fuente García Celia., Juan Antonio Saéz Nieto, Sylvia, Valdezate Ramos., Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología., Procedimientos en Microbiología Clínica.,2010.,Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica España



- Pascual Anderso María del Rosario, Vicente Calderón y Pascual., 2000., Metodología Analítica para alimentos y bebida., 2a Edición., pág. 21 – 31.
- Programa BLAST del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) México
- Rodicio María del Rosario, Mendoza María del Carmen., 2004., Identificación bacteriana mediante secuenciación de ARNr 16s: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica., Enferm infecc Microbiol Clin., 22 (4): 238-245. Capítulo 11., pág.: 81-87.
- Rodríguez Ángeles C., 2002., Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *E. coli* .Salud Pública de México. Vol. 44 No. 5. page. 464-475.
- Saldaña Zeus, Erdem L. Aysen., Schuller Stephanie, Okeke N. IrukA, Lucas Mark, Sivananthan Arunon, Phillips D. Alan, Kaper B. James., 2009., Journal of Bacteriological., vol. 191., No. 11., pág: 3451-3461.
- Schreckinger María Elisa., 2007., Genotipificación de cepas de *Escherichia coli* enteropatógena aisladas en una región rural de la costa ecuatoriana mediante el uso de la electroforesis de campo pulsado., Universidad San Francisco de Quito., Pág; 4- 23.
- Trabulsi R. Luiz, Keller Rogéria, A Tania., 2002., Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*., Emerging Infectious Diseases., vol. 8., No. 5., pág: 508-513.
- Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *E. coli* Enteropatógena. Salud Pública Mex. Núm. 49. Pág.376-386.
- Vidal JE., Canizález-Román A., Gutiérrez-Jiménez J., Navarro-García F., 2007., Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* Enteropatógena., .Salud Publica Mex 2007; 49:376-386.
- Vidal Roberto, Vidal Maricel, Lagos Rossana, Levine Myron, Prado Valeria., 2004., Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*., Journal of clinical microbiology., vol 42., No. 4., Pág: 1787-1789.



- Vidal-Graniel Jorge E., 2003., *Escherichia coli Enteropatógena* (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil Salud en Tabasco., vol. 9., núm. 1., abril, 2003, pp. 188-193., Secretaría de Salud del Estado de Tabasco
- Waksman Gabriel, Caparon Michael, Hultgren Scott.,2005., Structural Biology Bacterial Pathogenesis., american society for Microbiology QR 175 S 77 79642., pág.49- 65.
- Weisburg G. William, Barns M. Susan, Pelletier A. Dale, Lane, J. David., 1990., 16s Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study., Journal of Bacteriology., vol. 173., No. 2., pág: 697-703.
- WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>)



10. ANEXOS

11. Anexo I

EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE LA CEPA PURA (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit)

1.- Adicionar 1.8 mL del cultivo bacteriano a un tubo eppendorff de 2 mL (provisional) y centrifugar a 10,000x g por 30 seg a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y centrifugar los tubos a 10,000x g por 30 seg a temperatura ambiente y remover completamente el sobrenadante restante con ayuda de una micropipeta.

Nota: Dependiendo de el tipo del cultivo bacteriano, podria requerir un periodo adicional de centrifugación por 30 seg mas.

2.- Resuspender la pastilla celular en 30 μ L de la solución MicroBed Solution y dar un ligero vortex. Transferir las células resuspendidas a un tubo MicroBed.

3.- **Adicionar 50 μ L de la solución MD1** a el tubo MicroBed.

4.- **Opcional:** Para incrementar el rendimiento y minimizar la pérdida de DNA de células difíciles, ver el metodo alternativo de lisis.

5.- Asegurar los tubos de forma horizontal usando el adaptador del vortex. Dar vortex a maxima velocidad por 10 min.

6.- Con cuidado desprender del vortex y dar un ligero centrifugación a 10,000x g por 30 seg a temperatura ambiente. **PRECAUCIÓN:** Tener cuidado de no exceder 10,000x g o se podrian romper los tubos

7.- Transferir el sobrenadante a u tubo limpio de 2 mL (provisional).

8.- **Nota:** Volumen esperado de sobrenadante de 300 a 350 μ L.

9.- **Adicionar 100 μ L de la solución MD2**, a el sobrenadante y dar vortex 5 seg. Despues incubar a 4°C por 5 min.

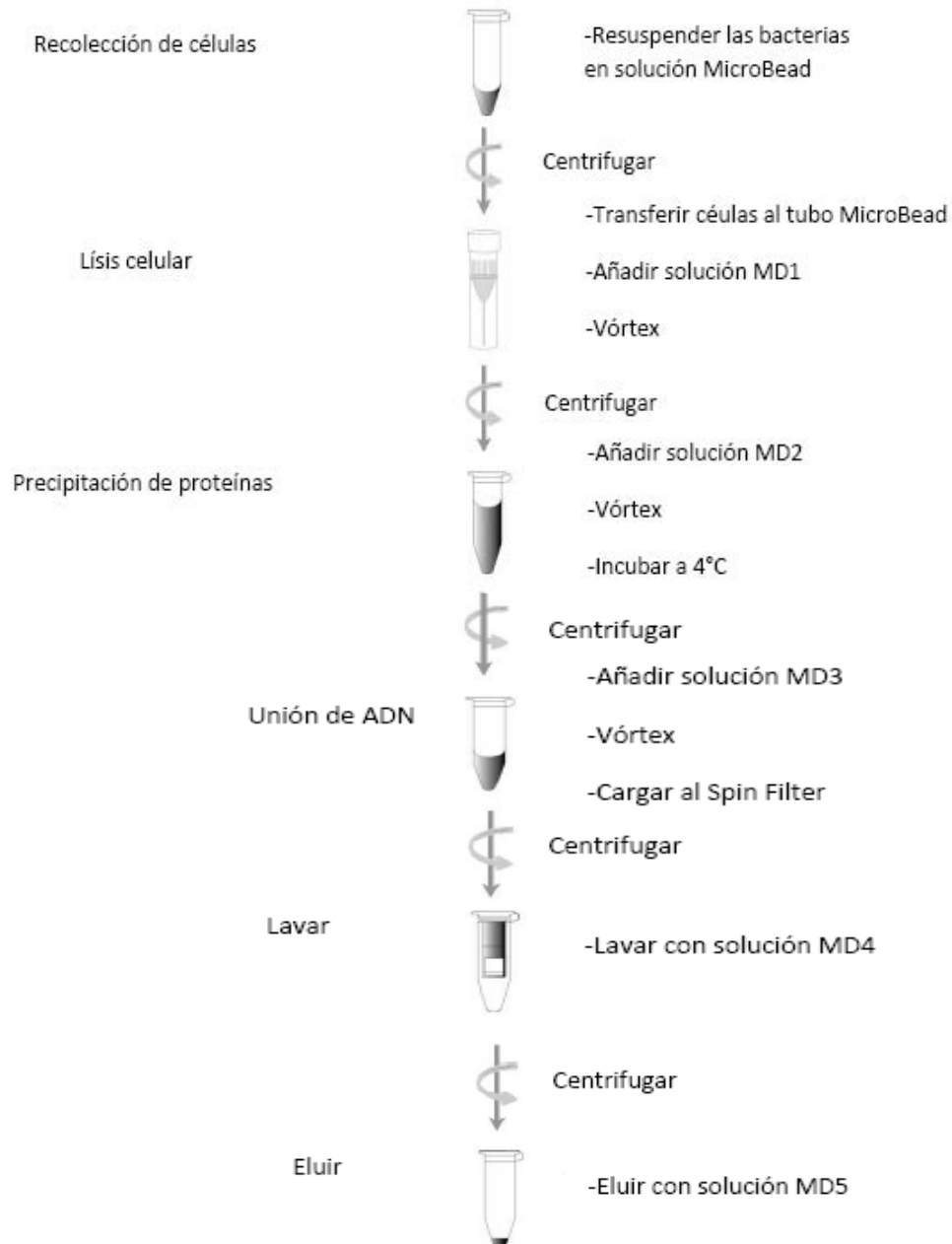


- 10.- Centrifugar el tubo a temperatura ambiente por un minuto a 10,000x g.
- 11.- Evitando la pastilla celular, transferir todo el volumen a un tubo limpio de 2mL (provisional). Esperar aproximadamente de 300 a 350µL de sobrenadante.
- 12.- **Adicionar 900µL de la solución MD3**, al sobrenadante y dar 5 min de vortex.
- 13.- Transferir aproximadamente 700µL a la columna Spin Filter y centrifugar a 10,000x g por 30 seg a temperatura ambiente. Descartar el fluido extraído y adicionar el restante de sobrenadante al Spin Filter, y centrifugar nuevamente a 10,000x g por 30 seg a temperatura ambiente. **Nota:** En total se va a requerir de 2 a 3 cargas y descartar todo el fluido extraído.
- 14.- **Adicionar 300µL de la solución MD4**, y centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg a 10,000x g.
- 15.- Descartar el fluido por completo.
- 16.- Centrifugar a temperatura ambiente por un minuto a 10,000x g.
- 17.- Teniendo cuidado de que la columna Spin Filter no tenga contacto con el líquido extraído, transferirla a otro tubo de 2 mL (provisional).
- 18.- **Adicionar 50µL de la solución MD5**, en el centro de la membrana de la columna Spin Filter.
- 19.- Centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg a 10,000x g
- 20.- Desechar la columna Spin Filter, y el DNA esta listo para emplearse y conservarlo en congelación a -20°C.



Diagrama de extracción de DNA cromosomal empleando el sistema Ultraclean Microbial DNA isolation kit de MoBio Laboratories (www.invitrogen.com)

UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit



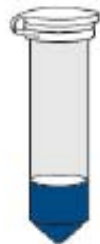
12. Anexo II

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE DNA (Link PCR Purification Kit de Invitrogen)

- 1.- Adicionar 4 volúmenes de apropiado PureLink, Binding Buffer con isopropanol, por cada volumen de producto de PCR.
 - 2.- Adicionar la mezcla del paso 1 a una Spin columna en un tubo recolector.
 - 3.- Centrifugar la columna a 10,000x g por un minuto. El DNA se queda en la columna, desechar el fluido extraído.
 - 4.- Lavar la columna con 50 µL de Wash Buffer etanol
 - 5.- Centrifugar la columna a 10,000x g por 1 minuto. Desechar el fluido extraído.
 - 6.- Centrifugar la columna a máx. velocidad por 2-3 min hasta remover los residuos de buffer de lavado.
 - 7.- Traspasar la columna de Spin a un tubo de elución limpio de 1.7 mL.
 - 8.- Eluir con 50 µL de buffer de elución, (adicionar el buffer al centro de la columna).
 - 9.- Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 minuto.
 - 10.- Centrifugar la columna a máxima velocidad por 2 minutos.
 - 11.- El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado
- Descartar la columna. Mantener el producto de PCR purificado a -20°C.



Diagrama para la purificación del producto de PCR empleando el sistema Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen (www.invitrogen.com)



Añadir a los productos de PCR el amortiguador de unión apropiado con isopropanol



Transferir la muestra a un tubo de microcentrifuga con filtro de membrana



Adicionar el amortiguador de lavado a la columna



Adicionar el amortiguador de elución y eluir el ADN en un tubo limpio



13. Anexo III

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DEL ALIMENTO

calentar las soluciones PF1 y PF3 antes de usarlas, mantenerlas a una temperatura de 55°C por 5-10 min. Usar la solución PF1 mientras se encuentra caliente.

1.-Homogenizar el alimento e incubar el homogenizado de acuerdo a lo recomendado por la guía de la FDA (Bacteriological analytical Manual, Edition 8, Revisión A/1998)

2.-Adicionar 1.8 mL de homogenizado del alimento en un tubo ependorff de 2 mL (provisional), y centrifugar a 13,000 por un minuto a temperatura ambiente. Decanatar el sobrenadante y centrifugar por otro minuto mas a 13,000. Remover completamente los restantes del sobrenadante con ayuda de una micropipeta.

3.-Resuspender el pellet celular en **450µL de la solución PF1**.

Nota: La solución PF1 antes de emplearse debe de estar caliente para disolver el presipitado que se forme. Puede usarse mientras se encuentra calentando.

4.- Transferir la solución de células resuspendidas a un tubo Microbed (la edad de las células dificulta el metodo, por lo que se recomienda un metodo alternativo)

5.-Colocar el tubo Microbed de forma horizontal en el adaptador del vortex.

6.-Dar vortex a velocidad maxima por 10 min.

7.-Centrifugar los tubos a 13,000x por 1 min a temperatura ambiente. PRECAUCION: No exceder los 13,000x por que los tubos se podrian romper.

8.-Trasferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL (provisional).

Nota: Esperar aproximadamente 400µL de sobrenadante.

9.-**Adicionar 100 µL de la solución PF2**, y dar un breve vortex a la mezcla. Incubar a 4°C por 5min.

10.- Centrifugar los tubos a 13,000x por 1 min a temperatura ambiente.

11.- Evitando el pellet celular,transferir todo el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL (provisional).

Nota: volumen aproximado esperado 450µL

12.- **Adicionar 900 µL de la solución PF3** y dar vortex a la mezcla.



Nota: Checar la **solución PF3** , que no tenga precipitados antes de usarse. Puede emplearse mientras se calienta.

13.- Pasar 650 μ L del sobrenadante en un Spin Filter y centrifugar a 13,000x por un minuto. Descartar el extracto, y repetir el proceso hasta que se acabe el sobrenadante.

Nota: Se requerira aproximadamente 2 veces repetir el proceso.

14.- Transferir la columna a un tubo de 2 mL (provisional)

15.- Agitar la **solución PF4** antes de usarse. Adicionar 650 μ L de solución PF4 y centrifugar a 13,000x por un min a temperatura ambiente.

16.- Descartar el extracto y adicionar 650 μ L de **solución PF4** y centrifugar a 13,000x por un minuto a temperatura ambiente.

17.- Descartar el extracto y centrifugar de nuevo a 13,000x por 2 minutos y remover el residuo del lavado.

18.- Transferir la columna a un tubo de 2 mL (provisional),

19.- Adicionar 100 μ L de la **solución PF6** a el centro del filtro de membrana.

20.- Centrifugar a 13,000x por un minuto.

21.- Descartar la columna. El DNA extraido debe ser mantenido a una temperatura de -20°C



14. Anexo IV

Composición de sustratos de las tiras API 20E

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitrofenil-Bd-galactopiranosida	0.223	B-galactosidasa	Incoloro	Amarillo
ADH	L-arginina	1.9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	Rojo/ anaranjado
LDC	L-lisina	1.9	Lisina Descarboxilasa	amarillo	Rojo/ anaranjado
ODC	L-ornitina	1.9	Ornitina Descarboxilasa	amarillo	Rojo/ anaranjado
CIT	Citrato trisódico	0.756	Uso del Citrato	Verde pálido/ amarillo	Azul/verde azul
H2S	Tiosulfato sódico	0.075	Producción de H ₂ S	Incoloro/ grisáceo	Deposito negro/ fin liserado
URE	Urea	0.76	Ureasa	Amarillo	Rojo/ anaranjado
TDA	L-triptófano	0.38	Triptofano DesAminasa	Amarillo	Rojo/ anaranjado
IND	L-triptófano	0.19	Producción de Indol	Incoloro/ verde pálido/ amarillo	Rosa
VP	Piruvato sódico	1.9	Producción de acetoína	Incoloro/ rosa pálido	Rosa/ rojo
GEL	Gelatina (origen bovino)	0.6	Gelatinasa	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1.9	Fermentación/Oxidación (Glucosa)	Azul/ verdoso azul	Amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1.9	Fermentación/Oxidación (Manitol)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
INO	Inositol	1.9	Fermentación/Oxidación (Inositol)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentación/Oxidación (Sorbitol)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
RHA	L-ramnosa	1.9	Fermentación/Oxidación (Ramnosa)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
SAC	D-sacarosa	1.9	Fermentación/Oxidación (Sacarosa)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
MEL	D-melibiosa	1.9	Fermentación/Oxidación (Melibiosa)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
AMY	Amigdalina	0.57	Fermentación/Oxidación (Amigdalina)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
ARA	L-arabinosa	1.9	Fermentación/Oxidación (Arabinosa)	Azul/ verdoso azul	Amarillo
OX	(ver ficha técnica del test de oxidasa)		Citocromo-Oxidasa	(ver ficha técnica del test de oxidasa)	
Reducción de nitratos			Producción de NO ₂	amarillo	Rojo
	Nitrato potásico	0.076	Reducción de N ₂	Naranja-rojo	Amarillo
MOB	API M Medium o microscopio	0.076	Movilidad	inmóvil	Móvil
McC	Medio de Mac Conkey		Cultivo	ausencia	Presencia
OF-F	Glucosa (Medio OF API)		Fermentación bajo aceite	Verde	Amarillo
OF-O			Oxidación al aire	verde	Amarillo



15. ANEXO VI

Sustratos empleados en la tarjeta de identificación para Gram-Negativos por el sistema VITEK

Prueba	Abreviatura	Cantidad (mg)
Alanina-Fenilalanina-Arilamidasa	APPA	0.0384 mg
Adonitol	ADO	0.1875 mg
L-Pirrolidonil-Arilamidasa	PyrA	0.018 mg
L-Arabitol	IARL	0.3 mg
D-Celobiosa	dCEL	0.3 mg
Beta-Galactosidasa	BGAL	0.36 mg
Producción de H ₂ S	H ₂ S	0.0024 mg
Beta-N-Acetil-Glucosamina	BNAG	0.0408 mg
Glutamina Arilamina pNA	AGLTP	0.0324 mg
D-Glucosa	dGLU	0.3 mg
Gamma-Glutamil-Transferasa	GGT	0.0228 mg
Fermentación de glucosa	OFF	0.45 mg
Beta-Glucosidasa	BGLU	0.036 mg
D-Maltosa	dMAL	0.3 mg
D-Manitol	dMAN	0.1875 mg
D-Manosa	dMNE	0.3 mg
Beta-Xilosa	BXYL	0.0324 mg
Beta-Alanina arilamidasa pNA	BAIap	0.0174 mg
L-Prolina Arilamidasa	ProA	0.023 mg
Lipasa	LIP	0.0192 mg
Palatinosa	PLE	0.3 mg
Tirosina Arilamidosa	TyrA	0.0276 mg
Ureasa	URE	0.15 mg
D-Sorbitol	dSOR	0.1875 mg
Sacarosa/sucrosa	SAC	0.3 mg
D-Tagatosa	dTAG	0.3 mg
D-Trealosa	dTRE	0.3 mg
Citrato (Sodio)	CIT	0.054 mg
Malonate	MNT	0.15 mg
5-Keto-D-gluconato	5KG	0.3 mg



L-Lactato- alcalinización	ILATk	0.15 mg
Alfa-Glucosidasa	AGLU	0.036 mg
Succinate alcalinización	SUCT	0.15 mg
Beta-N-Acetil-Galactosamidasa	NAGA	0.0306 mg
Alfa-Galactosidasa	AGAL	0.036 mg
Fosfatasa	PHOS	0.0504 mg
Glicina Aralamidasa	GlyA	0.012 mg
Ornitina Descarboxilasa	ODC	0.3 mg
Lisina Descarboxilasa	LDC	0.15 mg
Base Descarboxilasa	LDC	0.15 mg
L-Histidina asimilación	IHISa	0.087 mg
Cumarate	CMT	0.126 mg
Beta-Glucoronidasa	BGUR	0.0378 mg
O/129 Resistence (comp.vibrio)	O129R	0.0105 mg
Glu-Gly-Arg-Arilamidasa	GGAA	0.0576 mg
L-Malato asimilación	IMLTa	0.042 mg
ELLMAN	ELLM	0.03 mg
L-Lactato asimilación	ILATa	0.186 mg

FUENTE: Microbial identification using the BioMérieux VITEK 2 system.



Anexo VI

Secuencia parcial del ANR 16s de la cepa *Escherichia coli* Enteropatógena en formato FASTA del programa BioEdit

```
CTCACGGCTCCCGAAAGGCACATTCTCATCTCTGAAAACCTTCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT  
CGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT  
TGCGGCCGTA CTCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTC  
CAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTG  
AGCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTAC  
ACCTGGAATTCTACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCCAGTATCAGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGG  
GGATTTACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCC  
TCCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGGAGTTAGC
```

Secuencia consenso del gen *eae* en formato FASTA del programa BioEdit

```
GGTCTCTGTGATCGCTGGTACAGGCTTCGTACAGTTGCAGGCCTGGTTACAACATTATGGAACGGCAGAG  
GTTAATCTGCAGAGTGGTAATAACTTTGACGGTAGTTCACTGGACTTCTTATTACCGTTCTATGATTCCGAAA  
AAATGCTGGCATTGTTGTCAGGTTCGGAGCGGTTACATTGACTCCCGCTTACGGCAAATTTAGGTGCGGGT  
CAGCGTTTTTCTTCTGAAAATATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATAATA  
CCCGTTTAGGTATTGGTGGCGAATACTGGCGAGACTATTTCAAAGTAGTGTTAACGGCTATTTCCGCATGA  
GCGGCTGGCATGAGTCATAAATAAGAAAGACTATGATGAGCGCCAGCAAATGGCTTCGATATCCGTTTT  
AATGGCTATCTGCCATCATACCCGGCATTAGGTGCCAAGCTGATGTATGAGCAGTATTATGGTGATAATGTT  
GCTTTGTTAATTCTGATAAGCTGCAGTCAATCCTGGTGCAGGCGACCGTTGGTGAACTATACTCCGATT  
CCTCTGGTGACGATGGGGATCGATTACCGTCATGGTACGGGTAATGAAAATGATCTCCTTACTCAATGCAG  
TTCCGTTATCAGTTTGATAAACCCTGGTCTCAGCAAATGAGCCACAATATGTTAACGAGTTAAGAACATTA  
TCAGGCAGCCGTTACGATCTGGTTCAGCGTAATAACAATATTATTCTGGAGTACAAAAGCAGGATATTCTT  
TCTCTGAATATTCCGCATGATATTAATGGTACTGAACGCAGTACGCAGAAGATTCAATTGATCGTTAAGAGC  
AAATACGTTGTGCACGTATCGTAAAGAAATTTTTCCAACCCCCACCATAACCAACACCGACGTGTAGAGTA
```

Secuencia del Fw del gen *bfp* en formato FASTA del programa BioEdit

```
AGTCGCAGAATGCTATTTTCAGAAGTAATGAGCGCAACGTCTGCAAATAATGGTCTGTATATTGGGCAGACC  
AGTTATAGTGGATTGGACTCAACGATTTTACTTAACACATCTGCAATTCCGGATAATTACAAAGATACAACA  
AACAAAAAATAACCAACCCATTTGGGGGGGAATTAATGTAGGTCCAGCAAACAATAACACCGCATTG  
TTACTATCTGACGCTTACCAGGTTGGATAAAGCGGCATGTGTTAGTCTTGCAACCTTGAACCTTAGGTACTC  
AGCGAAAGGCTACGGTGTTAATATCTCTGGCGAAAATAACATTACATCATTGTTAATAGCGCTGATCAGG  
CTGCTAAATCGACTGCTATTACTCCTGCTGAAGCGGCAACTGCATGTAAAAATACTGATTCAACCAATAAAG  
TTACATATTTTATGAAGTAATCTACATAATACGCCCTGTTTTGGGCGTATTATATGGGAGGTATATGTGAGG  
ACAGTAATCCTTTTTTTTTGTCTTTTGGTATCCTGTTTTACTCAGGCACAGGAAAGTGCAAATAAAAACGAGA  
AACTTTTTTTCAGGGGACACAACGTCTGTTGCACTGCAGGCAAGTGAAAGAACAATTAATAATGCCAAAGCT  
GACTGGTCTGTAATAAAAGGACAGACTTTATATGGCGTTCCTTCCGACTGGGCGCAACAGAGCGGATGGAC  
TGTATTATGGCATGCAAATTATAACTATACTTTAATGCATCTGCAGTGTTTAA
```

