

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**IMPLEMENTACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS
PATÓGENAS EN CARNE DE BOVINO**

Por

Viviana Leticia Mata Tijerina

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con
especialidad en Microbiología**

Julio, 2006

**Implementación de la PCR para la detección de bacterias patógenas
en carne de bovino**

Comité de Tesis

Dra. Marivel Gómez Treviño

Director de tesis

M.C. Arturo Espinoza Mata

Secretario

M.C. Irma O. Martínez Vázquez

Vocal

Dr. Alberto Morales Loredó

Asesor externo

**Implementación de la PCR para la detección de bacterias patógenas
en carne de bovino**

Comité Académico de Maestría

Subdirección de Estudios de Postgrado

LUGAR DE TRABAJO

La presente investigación se llevó a cabo en:

Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria del Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de M.C. Arturo Espinoza Mata y M.C. Irma Olivia Martínez Vázquez.

Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria de Nuevo León (CFPPNL), con la asesoría del Dr. Alberto Morales Loredo.

DEDICATORIA

A mi familia, Adrián, Elio, Lety, Gaby y David, que siempre me han apoyado en cada paso que he dado en esta vida.

AGRADECIMIENTOS

- Al M.C. Arturo Espinoza Mata, el Dr. Alberto Morales Loredo, y la Dra. Irma Martínez V., quienes asesoraron este trabajo aportando ideas y sugerencias que fortalecieron el mismo.
- A la Dra. Marivel Gómez Treviño por el apoyo brindado a este proyecto.
- Al Ing. Luis Gerardo Mendoza D., y la Dra Genoveva Álvarez Ojeda que apoyaron en la realización de este proyecto de forma desinteresada aportando sugerencias para su enriquecimiento.
- Al M.C. Francisco J. Sánchez V. y la Q.B.P. Ma Isabel Martínez, Martínez, por su interés y valiosas aportaciones para este proyecto.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico el cual permitió el desarrollo de mis estudios; además por el apoyo recibido durante el proyecto de investigación 034 de la Convocatoria SAGARPA-CONACYT 2003-02
- Al Comité para el Fomento y Protección Pecuaria de Estado de Nuevo León por haber dado las facilidades de desarrollar este proyecto en sus instalaciones, especialmente al Ing. José Guadalupe Muraira G. por el apoyo que ha brindado en el desarrollo de estos proyectos.
- Al Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, y a los integrantes del mismo, profesores y alumnos, por haber abierto las puertas para el desarrollo de este trabajo; los cuales realizaron aportaciones enriquecedoras durante el desarrollo de este proyecto, especialmente a Reyna Treviño, Karla González y Jesús Ríos.
- A la Fundación Produce Nuevo León por haber financiado la realización de este proyecto (Proyecto de Alimentos No 118).
- Se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por el apoyo recibido mediante el proyecto 6555947A: Desarrollo de Estrategias de Investigación (INIFAP) para mejorar la Calidad Sanitaria de Frutas y Hortalizas en México.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LUGAR DE TRABAJO.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
TABLA DE CONTENIDO.....	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
NOMENCLATURA.....	XIII
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 JUSTIFICACIÓN.....	2
3 IMPORTANCIA.....	3
4 HIPÓTESIS.....	4
5 OBJETIVO GENERAL.....	5
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
7 ANTECEDENTES.....	7
7.1. La carne y su contaminación por patógenos transmitidos por alimentos.....	7
7.2. Principales bacterias patógenas transmitidas por alimentos...	8
7.2.1. <i>Salmonella</i> spp.....	8

	7.2.1.1. Generalidades de <i>Salmonella</i> spp.....	8
	7.2.1.2. Métodos convencionales para la detección de <i>Salmonella</i> spp en alimentos.....	9
	7.2.1.3. Métodos moleculares para la identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	9
	7.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
	7.2.2.1. Generalidades de <i>L.monocytogenes</i>	14
	7.2.2.2. Métodos convencionales para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos.....	14
	7.2.2.3. Métodos moleculares para la Identificación de <i>L. monocytogenes</i>	15
	7.2.3. <i>E. coli</i> O157: H7 y otras STEC (<i>Escherichia coli</i> productoras de Toxinas Shiga).....	17
	7.2.3.1. Generalidades de <i>E. coli</i> O157: H7 y otras STEC...	17
	7.2.3.1.1. Cepas atípicas de <i>E. coli</i> O157:H7.....	18
	7.2.3.1.2. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> O157:H7.....	19
	7.2.3.2. Métodos convencionales para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7 spp en alimentos.....	19
	7.2.3.3. Métodos moleculares para la identificación de <i>E. coli</i> O157:H7 y otras STEC.....	21
8	MÉTODOS.....	27
9	RESULTADOS.....	40
10	DISCUSIÓN.....	63
11	CONCLUSIONES.....	69
12	PERSPECTIVAS DE TRABAJO.....	70
13	LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores utilizados para detectar los patógenos en estudio.....	29
2. Características de morfología colonial para <i>Salmonella</i> spp.....	32
3. Tabla de contingencia para el análisis de muestras inoculadas.....	38
4. Tabla de contingencia para el análisis de muestras de campo.....	39
5. Iniciadores, gen al que van dirigidos, tamaño del fragmento y referencia para cada uno de los patógenos en estudio.....	40
6. Condiciones de alineamiento para para cada par de iniciadores utilizados.....	44
7. Resultados de las pruebas de especificidad de los iniciadores seleccionados con diferentes templados de ADN.....	47
8. Resultados de la inoculación de <i>S. Typhimurium</i> por análisis microbiológico y por PCR.....	48
9. Resultados de la inoculación de <i>L. monocytogenes</i> por análisis microbiológico y por PCR.....	50
10. Resultados de preenriquecimiento con CST con cefsulodin, cefixima y vancomicina.....	51
11. Resultados de preenriquecimiento con ECm con novobiocina.....	53
12. Resultados de la inoculación de <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 por análisis microbiológico y por PCR.....	54
13. Resultados de muestras problema.....	57

14. Resultados de PCR y aislamiento microbiológico para <i>Salmonella</i> spp, <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.....	58
15. Índices Kappa de los métodos probados utilizando muestras inoculadas artificialmente.....	61
16. Resultados de sensibilidad, especificidad, precisión relativa e índice Kappa para <i>Salmonella. L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras de campo.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de <i>Salmonella</i> sp.....	33
2. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> y otras especies.....	35
3. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de <i>E. coli</i> O157:H7.....	37
4. Simulación de PCR utilizando los iniciadores 139 y 141.....	41
5. Simulación de PCR utilizando los iniciadores 420 A y 420 B.....	41
6. Simulación de PCR utilizando los iniciadores O157-AF y O157-AR.....	41
7. Simulación de PCR utilizando los iniciadores H7-F y H7-F.....	42
8. Simulación de PCR utilizando los iniciadores VT1-A y VT1-B.....	42
9. Simulación de PCR utilizando los iniciadores VT2-Am y VT2-Bm.....	43
10. Simulación de PCR utilizando los iniciadores AE-19 y AE-20.....	43
11. Gradiente de temperatura para <i>Salmonella</i>	44
12. Productos de amplificaciones de controles positivos.....	45
13. PCR Multiplex de serotipos para <i>E. coli</i> O157:H7.....	46
14. PCR Multiplex de factores de virulencia para <i>E. coli</i> O157:H7.....	46
15. Inoculación de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	49
16. Inoculación de <i>L. monocytogenes</i>	50

17. Inoculación de <i>E. coli</i> O157:H7. PCR multiplex de factores de virulencia (<i>eae</i> , VT1 y VT2). Preenriquecimiento en CST+ccv.....	52
18. Inoculación de <i>E. coli</i> O157:H7. PCR multiplex de serotipos (O157 y H7). Preenriquecimiento en CST+ccv.....	52
19. Inoculación de <i>E. coli</i> O157:H7. Preenriquecimiento en ECm, PCR multiplex de factores de virulencia (<i>eae</i> , VT1 y VT2).....	53
20. Inoculación de <i>E. coli</i> O157:H7. Preenriquecimiento en CST+ccv. PCR multiplex de serotipos (O157 y H7).....	53
21. Inoculación de <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.....	53
22. Muestras de campo de <i>Salmonella</i> sp.....	56
23. Muestras de campo de <i>L. monocytogenes</i>	56
24. Porcentaje de cepas productoras de verotoxinas en muestras de campo. PCR multiplex (factores de virulencia).....	58
25. Porcentaje de muestras de campo positivas para O157 y/o H7. PCR multiplex (Serotipos).....	58
26. Muestras de campo de <i>E. coli</i> O157:H7. PCR de factores de Virulencia.	59
27. Muestras de campo de <i>E. coli</i> O157:H7.PCR de factores de Virulencia..	59
28. Detección simultánea de <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras de campo.....	59
29. Resultados de índices kappa obtenidos del análisis microbiológico y de la PCR para <i>Salmonella</i> spp, <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras inoculadas artificialmente.....	60

NOMENCLATURA

HCl	Ácido clorhídrico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DMLIA	Agar Hierro Lisina doblemente modificado
SMAC	Agar McConkey Sorbitol
OXA	Agar Oxford
AST	Agar Soya Trypticaseína
BGA	Agar Verde Brillante
BGS	Agar Verde Brillante con Sulfapiridina
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
ATCC	American Type Culture Collection
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
ICC	Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)
CST	Caldo Soya Trypticaseína (TSB)
CDC	Center for Diseases Control
WT	Cepa silvestre “Wild Type”

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
HC	Colitis hemorrágica
CFPPNL	Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León.
M	Concentración molar
Da	Daltones
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatos
CO ₂	Dióxido de carbono
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
Taq	Enzima polimerasa de ADN obtenida de <i>Thermus aquaticus</i>
ECVT	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica
ECEP	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
sp	Especie
spp	Especies
GUD	Glucuronidasa
°C	Grados Celsius
Gpo	Grupo
h	Hora
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
LMMS	Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
LPS	Lipopolisacárido

UV	Luz ultravioleta
MDa	Megadaltons
μL	Microlitros
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minuto
ng	Nanogramos
NCBI	National Center of Biotechnology Information
-	Negativo
NM	No motil
No	Número
X	Número de veces la concentración con respecto a la de trabajo
pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
+	Positivo
pg	Picogramos
pmoles	Picomoles
%	Por ciento
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos

Sl _t	<i>Shiga like toxin</i>
HUS	Síndrome Urémico Hemolítico
SOR	Sorbitol
ssp	Subespecie
Stx	Toxina shiga
Tris	Trizma® Base Tris [Hidroximetil] aminometano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VT	Verotoxina
<i>et al</i>	Y colaboradores

RESUMEN

Los microorganismos patógenos transmitidos por carne son de importancia en salud pública. El consumo de carne y sus derivados se ha incrementado debido a las exportaciones e importaciones de los mismos. Los patógenos pueden causar enfermedades tales como fiebre tifoidea, salmonelosis, listeriosis, colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico, las cuales merman la salud de la población, inclusive causan la muerte. En México, como en el ámbito internacional existen metodologías para la detección de patógenos como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, sin embargo, estos protocolos incluyen etapas de enriquecimiento, aislamiento e identificación bioquímica y serológica, las cuales involucran costos y tiempo. Un método alternativo para la realización de estos análisis es el uso de técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual puede determinar la presencia de estos patógenos en tiempos de análisis de alrededor de 24-36 h, por lo que se propuso desarrollar métodos de PCR para la detección de estos patógenos. En este trabajo se desarrollaron ensayos de PCR para la detección de *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 a nivel de cepa. Se realizaron ensayos con muestras de carne cruda inoculadas artificialmente, y analizadas simultáneamente por PCR y análisis microbiológico. Las PCRs para *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* detectaron concentraciones hasta 10^{-1} UFC/g similares a los resultados obtenidos con los ensayos con métodos tradicionales. En el caso de *E. coli* O157:H7, se realizaron dos ensayos de PCR multiplex en donde se detectó el serotipo O157:H7 (genes *rfbE* y *fliC*) y los factores de virulencia (intimina, verotoxinas 1 y 2), se probaron dos medios de preenriquecimiento (CST+ccv y ECm+n) y se realizaron simultáneamente los ensayos microbiológicos. Se detectó *E. coli* O157:H7 a una concentración ≤ 1 UFC/g y $\leq 10^{-1}$ UFC/g (CST+ccv y EC+n respectivamente), mientras que por el método microbiológico fue de ≤ 10 UFC/g utilizando CST+ccv y ≤ 10 UFC/g con ECm+n, obteniendo un mayor porcentaje de sensibilidad, precisión relativa e índice Kappa con el caldo ECm+n en comparación con CST+ccv. Para el ensayo de factores de virulencia la sensibilidad fue de ≤ 10 UFC/g, independientemente, del preenriquecimiento utilizado. También se desarrolló un ensayo de PCR multiplex para la detección de *Salmonella* y el serotipo de *E. coli* O157:H7 utilizando como preenriquecimiento caldo ICC y CST donde se logró una detección de 10^{-1} UFC/g para *Salmonella* y H7 y de 10^0 UFC/g para O157 en ambos preenriquecimientos. Además, fueron analizadas con el uso de estas técnicas 40 muestras de campo las cuales consistían en muestras de carne corte New York o Rib Eye, en donde se detectaron 6 (15 %) muestras positivas para *Salmonella* por PCR comparadas con solo 2 aislamientos microbiológicos. En el caso de *L. monocytogenes* se detectaron 14 muestras (35 %) por PCR, mientras por análisis microbiológico solo 10 (25 %). Para *E. coli* O157:H7 se presentaron 2 muestras positivas (5 %) por PCR multiplex mientras que el análisis microbiológico no detectó ninguna (0 %). La PCR multiplex permitió la detección de 10 (25%) muestras positivas en contener el gen *fliC*, y 12 (30%) positivas en contener otras cepas verotoxigénicas. La PCR multiplex resultó ser más sensible y específico que el método microbiológico para la detección de estos patógenos, permitiendo realizar el análisis en menor tiempo y la emisión de resultados rápidos y eficaces, así como también, puede ser adaptable para el análisis de grandes números de muestras.

ABSTRACT

The pathogenic microorganisms transmitted by meat are of importance in public health. The consumption of meat and its derivatives have been increased due to the exports and imports of such. The pathogens can cause diseases such as typhoid fever, salmonellosis, listeriosis, hemorrhagic colitis or hemolytic uremic syndrome, which decrease the health of the population, inclusively cause the death. In Mexico, like other countries several methodologies have been developed for the detection of pathogens such as *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Many of these techniques include enrichment stages, isolation, biochemical and serological identification, which involve costs and time. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique is an alternative method for pathogen detection, in around 24-36 h, for this reason the aim of this study was developed PCR methods for detection of pathogens in meat. In this work were developed PCR tests for the detection of *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 strains. Raw meat samples were inoculated artificially, where PCR and microbiological analysis were done simultaneously. *Salmonella* spp and *L. monocytogenes* PCR test, detected concentrations until 10^{-1} CFU/g, similar results were obtained with traditional methods. In case, of *E. coli* O157:H7, two tests of multiplex PCR were developed, the first for O157:H7 serotype (genes *rfbE* and *fliC*) and the second for virulence factors (intimine, verotoxins 1 and 2) detection, where two preenrichment media (TSB+ccv and ECm+n) did simultaneously with microbiological analysis. *E. coli* O157:H7 was detected by PCR to a concentration ≤ 1 CFU/g and $\leq 10^{-1}$ CFU/g using TSB+ccv and ECm+n respectively, while microbiological method was of ≤ 10 CFU/g used both preenrichment mediums. ECm+n had a better sensibility percentage, relative precision and Kappa index than TSB+ccv. Virulence factors sensitivity was ≤ 10 CFU/g in two preenrichment mediums. Multiplex PCR was developed for *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 serotype using BHI and TSB. *Salmonella* and H7 were detected 10^{-1} CFU/g concentration while O157 was detected 10^0 CFU/g in both preenrichments. In addition, forty samples (New York or Rib Eye) were analyzed by PCR and microbiological methods. *Salmonella* was detected in 6 (15 %) positive samples by PCR and two by microbiology. *L. monocytogenes* was detected in 14 samples (35 %) by PCR, while microbiological analysis only ten samples (25 %). *E. coli* O157:H7 was found in 2 samples (5 %) by multiplex PCR, differing by microbiological method where *E. coli* O157:H7 was no detected (0 %). Ten samples (25%) were *fliC* gene positives and twelve (30%) positive for verotoxigenic strains by multiplex PCR. The multiplex PCR was more sensible and specific than the microbiological method in pathogens detection. PCR analysis can be done in short time with fast and effective results; also, it can be adaptable for the analysis of great numbers of samples.

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos transmitidos por carne, son de importancia a nivel nacional e internacional ya que la exportación e importación de este producto y sus derivados, se ha incrementado. En México existen metodologías para determinar la presencia o ausencia de patógenos nocivos para la salud, sabiendo de antemano que este producto es sensible a sufrir contaminación bacteriana por el contenido intestinal del propio animal, donde la presencia de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* es factible. La detección de estos patógenos mediante análisis microbiológico involucra un enriquecimiento, aislamiento e identificación de la bacteria con un tiempo mínimo de 7 días, lo cual es una desventaja cuando se desean resultados rápidos, además del alto costo del material empleado. Un método alternativo para apoyar los actualmente utilizados en inocuidad alimentaria, es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la cual se puede determinar la presencia o ausencia de patógenos en una muestra en un tiempo de 36 h, por lo que nuestro objetivo fue el estandarizar la técnica molecular de PCR para detectar la presencia de patógenos de importancia en inocuidad en muestras de carne; una vez implementada dejarla establecida en el laboratorio de biología molecular del Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León (CFPPNL). La implementación de la PCR apoyará a los establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF) que exportan carne, en el control de su proceso y además a cumplir con las regulaciones establecidas por el FSIS/USDA. Con la técnica molecular propuesta, se puede determinar individualmente o en grupos, la presencia de microorganismos patógenos en alimentos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp, con un alto porcentaje de sensibilidad, en un tiempo corto y a bajo costo.

2. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha establecido un programa continuo de vigilancia sanitaria, buscando tener mayor control de aquellos alimentos que representan riesgos para la salud debido a la transmisión de patógenos causantes de salmonelosis, listeriosis y síndrome urémico hemolítico. El análisis microbiológico tradicional para la detección de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 requiere de tiempo, inversión y espacio para su realización, factores que serían minimizados si se llegara a incluir en el diagnóstico de rutina técnicas moleculares como la PCR que ya se ha probado en diversos microorganismos y ha demostrado ser muy sensible. Aunque en nuestro país no existe la reglamentación para el uso de técnicas moleculares en la detección de patógenos en alimentos, los resultados obtenidos de esta investigación, arrojarían datos importantes y sentarían las bases para el establecimiento de técnicas de diagnóstico de patógenos de importancia en alimentos, las cuales reducirían tiempos de detección y aumentarían la sensibilidad. Con dicha prueba molecular, además de poder enfrentar las demandas de los usuarios locales, regionales e importadores y exportadores interesados en la inocuidad de los productos cárnicos, se reducirían costos, tiempo del análisis y espacio para realizar la prueba. Como aportación al conocimiento, esta investigación generó un método de diagnóstico basado en PCR-Multiplex para la detección simultánea de *Salmonella*, y *E. coli* O157:H7 no reportado a la fecha.

3. IMPORTANCIA

En México existe metodologías para determinar en alimentos la presencia o ausencia de patógenos nocivos para la salud (NOM-115-SSA1-1994, NOM-114-SSA1-1994, NOM-143-SSA1-1996), mismas que han sido implementadas para garantizar la inocuidad de los alimentos a los cuales se les aplican. Por tal razón, determinar que la carne y sus derivados estén libres de estos microorganismos es una prioridad en los establecimientos TIF que exportan estos productos, además de cumplir con las regulaciones establecidas por el FSIS/USDA. A nivel nacional, la detección de patógenos es mediante análisis microbiológico que involucra un tiempo mínimo de 7 días, esto presenta una desventaja además del alto costo del material empleado. Una buena alternativa para verificar la presencia o ausencia de microorganismos patógenos gastrointestinales en carne, es la implementación de métodos moleculares de detección como la PCR. Con esta técnica se pueden detectar bacterias de interés en forma aislada o en grupos, con beneficios como la obtención de resultados a bajo costo, rápidos y confiables; confiabilidad que garantizaría la liberación de canales o productos libres de patógenos de importancia en carne. Con la implementación de este método, se tiene además la ventaja de realizar una gran cantidad de pruebas sin necesidad de ocupar gran espacio en el área destinada para el análisis de control de calidad. Por esta y todas las ventajas anteriormente mencionadas se propuso la siguiente hipótesis y objetivos.

4. HIPÓTESIS

Las pruebas moleculares aplicadas en alimentos para detectar la presencia de *Salmonella* spp y *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 superan en sensibilidad y tiempo de detección a los métodos microbiológicos establecidos.

5. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar las técnicas de PCR y PCR multiplex, para verificar la presencia de bacterias patógenas de importancia en carne y productos cárnicos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6.1. Estandarizar la PCR para la detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en cepas de referencia.
- 6.2. Estandarizar la PCR para la detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 en carne inoculada artificialmente.
- 6.3. Comparar la PCR con el análisis microbiológico tradicional para la detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 en muestras de campo remitidas al Laboratorio Central Regional de Monterrey CFPPNL.
- 6.4. Estandarizar un PCR multiplex para la detección simultánea de *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 en muestras de carne

7. ANTECEDENTES

7.1. La carne y su contaminación por patógenos transmitidos por alimentos

Desde 1983 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), declararon que las enfermedades producidas por alimentos contaminados eran los problemas de salud más ampliamente distribuidos a nivel mundial. Esta conclusión sigue estando vigente, ya que el incremento de la población, la demanda de alimentos de origen animal y cambios en la forma de producir, transportar, procesar y preparar los alimentos ha cambiado. La carne y los productos cárnicos son susceptibles a contaminación de patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp y *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), haciendo a estos alimentos peligrosos, sobre todo en el caso de los dos últimos microorganismos que han sido reportados como de los más importantes patógenos transmitidos por alimentos (148).

Existen pruebas suficientes de que los alimentos comúnmente implicados en las toxiinfecciones alimentarias son las carnes, incluidas las aves. Generalmente las tres cuartas partes de los casos en los que se ha identificado el alimento en los brotes de intoxicación, están implicadas carnes recalentadas o carnes frías precocinadas principalmente carne de vacuno, porcino (jamón cocido) y ovino, así como pollo, pavo, pato, estofados, carnes picadas y pasteles de carne (66).

Según información publicada por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta (CDC) de 2,423 brotes causados por alimentos en el período 1988-1992, el 36 % fue debido a malas prácticas de higiene en la manipulación de los alimentos y el resto a la temperatura de conservación (148).

En México, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, en el período comprendido entre 1990 y 1997, identificó 861 cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos donde los serotipos más frecuentes fueron *S. Newport*, *S. Agona* y *S. Enteritidis*. Para 1999 el mismo laboratorio reportó que de 9518 muestras analizadas, 284 resultaron positivas a *Salmonella*, encontrando al serotipo Enteritidis en un 9.5 % y al serotipo Typhimurium en un 8.8%, el serotipo Enteritidis fue aislado con mayor frecuencia en aves mientras que Typhimurium en aves, moluscos y productos cárnicos (130). Según la OMS los

serotipos que afectan con mayor frecuencia a nivel mundial son Typhimurium y Enteritidis, los cuales cada vez se hacen más resistente a los antibióticos comunes (148).

Al igual que *Salmonella*, bacterias como *E. coli* y *L. monocytogenes* son también responsables de enfermedades gastrointestinales, como lo reportó en 1994 el Laboratorio Nacional de Salud Pública, al determinar la presencia de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* en alimentos responsables de un brote de intoxicación en Tijuana Baja California, México (129). Por tal razón, determinar que la carne y sus derivados estén libres de estos patógenos, es una prioridad en los establecimientos dedicados a su comercialización como los establecimientos TIF que exportan carne y productos cárnicos.

La detección y aislamiento de microorganismos responsables de intoxicación alimenticia se ha llevado a cabo mediante métodos tradicionales que durante mucho tiempo han sido la herramienta base (94; 95). Algunos son más efectivos que otros por lo que la comparación entre ellos ha sido realizada con frecuencia (136), incluyendo métodos convencionales y kits para hibridación de ADN y/o ELISA (114). La manera tradicional de realizar el análisis microbiológico de alimentos involucra la experiencia del analista, espacio suficiente, alto costo del material empleado, un previo enriquecimiento, aislamiento e identificación de la bacteria con un tiempo mínimo de 7 días o más, lo que representa hasta cierto punto una desventaja.

Considerando que la carne es un producto sensible a sufrir contaminación bacteriana, procedente del contenido intestinal del propio animal y en donde la presencia de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* es factible, ha surgido la necesidad de detectar estos patógenos mediante de métodos moleculares mas eficaces, por lo que la comparación, sensibilidad, especificidad y valores de predicción han sido desarrollados (110). Así, se han reportado metodologías para detectar en diferentes tipos de alimentos el genoma de *Salmonella* (76; 77; 47; 72), de *Escherichia coli* O157:H7 (19; 2; 116; 56; 49) y de *L. monocytogenes* (32; 68; 109; 108; 59; 107; 84).

7.2. Principales bacterias patógenas transmitidas por alimentos

7.2.1. *Salmonella* spp

7.2.1.1. Generalidades de *Salmonella* spp

Es un bacilo móvil, excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, no esporulado y Gram negativo, ampliamente distribuido entre animales, principalmente cerdos y aves de corral. Lo podemos encontrar en agua, suelo, insectos, superficies de cocina, heces de animales y todo tipo de carne cruda. Con la ingesta de solo unas pocas *S. Typhi* se produce la fiebre tifoidea en humanos.

En el periodo comprendido entre 1972 y 1999 los laboratorios de salud pública y privada de México, analizaron los serotipos de 24,394 cepas de *Salmonella* aisladas de diversas fuentes, en donde lograron identificar 199 serotipos. La más frecuente en muestras clínicas fue *Salmonella* Typhimurium (20.4 %) y en segundo lugar *S. Enteritidis* (18.3 %). En muestras de alimentos cárnicos preparados, carne molida de res, pollo, pescado, lácteos y huevo, las más frecuentes fueron *S. Derby* (13.8 %) seguido por *S. Anatum* (8.5 %) (64).

De enero de 1995 a junio de 1997 en Cuba, se estudiaron los resultados de la vigilancia de *Salmonella* spp en alimentos de establecimientos de producción, expendio o consumo. Se encontraron las mayores contaminaciones por *Salmonella* spp en alimentos semielaborados de carne (11 %) y de pescado (10 %) (17).

7.2.1.2. Métodos convencionales para la detección de *Salmonella* spp en alimentos

Los procedimientos para detectar *Salmonella* generalmente incluyen el preenriquecimiento del alimento en un medio no selectivo, enriquecimiento en un medio selectivo, aislamiento en medios diferenciales, análisis bioquímico y confirmación serológica de los aislados presumibles de *Salmonella* (28). El preenriquecimiento en medios no selectivos incrementa la recuperación de *Salmonella* de productos expuestos a condiciones extremas ambientales durante el procesamiento y almacenamiento (54). En 1975, van Schothors realizó una comparación de medios de cultivo para el aislamiento de *Salmonella* a partir de productos de huevo, en donde encontró que el caldo lactosado y el agua peptonada amortiguada resultaron ser igual de efectivos como medios de preenriquecimiento, en el caso de agares selectivos, el agar verde brillante resultó ser mas confiable que el agar sulfito bismuto, demostrando que la metodología ISO propuesta para carne y sus productos puede también ser utilizada para huevos (136).

Los medios de enriquecimiento, los cuales tienen como función el inhibir el crecimiento de las no-*Salmonella*, se han comparado también, resultando mas eficiente el medio Rappaport-Vassiliadis que el caldo tetrionato verde brillante en leche pasteurizada contaminada artificialmente con *S. Typhimurium*, ya que los resultados arrojaron mayor sensibilidad y selectividad del primero (138).

Además se han desarrollado diversos agares diferenciales, desde los poco selectivos, como el agar McConkey, los moderadamente selectivos como el agar *Salmonella-Shigella*, agar citrato desoxicolato, el entérico de Hektoen y el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) hasta los altamente selectivos como el sulfito bismuto, verde brillante y el agar verde brillante con sulfa (38).

7.2.1.3. Métodos moleculares para la Identificación de *Salmonella* spp

En 1992 se evaluó la amplificación de secuencias nucleotídicas dentro del gen *invA* de *Salmonella* Typhimurium con la finalidad de detectar a *Salmonella*, esto fue posible

en el 99.4 % de las 630 cepas de *Salmonella* probadas, en donde se incluyeron 100 serovariedades. Sin embargo, no se amplificaron 2 cepas de *S. Litchfield* y 2 de *S. Senftenberg*. Además se evaluaron 142 cepas que no eran *Salmonella*, las cuales no amplificaron, por lo que no generaron falsos positivos (117).

En 1996, se evaluó la eficiencia de la amplificación del gen *fimA* como un método específico para la detección de cepas de *Salmonella*. Esto lo llevaron a cabo seleccionando una serie de iniciadores internos de la secuencia del gen *fimA* obteniendo un producto de 85 pb el cual fue visualizado en gel de poliacrilamida y teñido con bromuro de etidio. Se evaluaron por este método 376 cepas de *Salmonella* comprendiendo cerca de 80 serovariedades aisladas de animales y humanos en Canadá, y 40 cepas que eran no-*Salmonella* también fueron probadas por este método. La detección de todas las cepas de *Salmonella* y la falta de amplificación del fragmento en las cepas de no-*Salmonella* confirmó que el gen *fimA* contiene secuencias únicas para las cepas de *Salmonella* y demostraron que este gen es un blanco apropiado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de cepas de este género en alimentos, ya que muestras de alimentos y leche contaminadas con cepas de *Salmonella* también fueron positivas por este procedimiento (26).

En 1997, Braümler, A., *et al.*, diferenciaron a *Salmonella enterica* a través del uso de iniciadores específicos para el gen *iroB* en donde lograron la amplificación por PCR de 197 aislados bacterianos. También indicaron que una combinación de preenriquecimiento en agua peptonada suplementada con ferrioxamina E y la amplificación del gen *iroB* con PCR-inmunomagnético permite la detección de *S. enterica* en albúmina en 24 h. (4). En 1998, Cocolin, L., *et al.*, evaluaron oligonucleótidos para el gen *invA* de *Salmonella* para la detección específica de *Salmonella* spp, los resultados obtenidos arrojaron la amplificación de 33 serovariedades de *Salmonella*, pero la no amplificación de 16 bacterias no-*Salmonella*. Después de la amplificación por PCR, fue posible identificar a *Salmonella* Typhimurium por análisis de enzimas de restricción (PCR-RE) (25). En el mismo año, Stefanovicova, A. *et al.*, confirmaron con PCR, colonias presuntivas de *Salmonella* obtenidas a partir del método estándar ISO 6579 (131).

Un año mas tarde, Waage, A.S., *et al.*, aplicaron un ensayo de nested PCR con iniciadores para secuencias conservadas dentro de un fragmento de ADN clonado al azar del cromosoma de *Salmonella* Typhimurium, en donde 128 de las 129 cepas de *Salmonella* probadas (pertenecientes a subespecies I, II, IIIb y IV) se identificaron correctamente, solo *Salmonella* Arizona (ssp. IIIa) resulto negativa y ningún falso positivo fue obtenido de 31 cepas de no-*Salmonella*. (143). Al mismo tiempo, Gooding., C.M. y Choundary.,P.V., compararon diferentes iniciadores en la PCR para la rápida detección de *Salmonella*, esta comparación abarco 5 pares de iniciadores previamente reportados para amplificar fragmentos de diversos genes blanco (Secuencia específica para *Salmonella*, *oriC*, *invA-invE*, Secuencia repetida, *ompC*) en donde los evaluaron bajo un panel de 14 diferentes cepas de *Salmonella* y otro panel de 14 diferentes no-*Salmonella*, encontrando que los iniciadores diseñados en base a una secuencia repetida de 199 pb de *S. Weltevreden* dieron óptimos resultados en la mayoría de las cepas probadas (60).

Chiu, C.H., y Ou, J.T. 1996, desarrollaron un método de detección de *Salmonella* Enteritidis en niños basado en un enriquecimiento en caldo de cultivo GN y ensayo de PCR multiplex para identificar serovariedades directamente de las heces fecales, este ensayo obtuvo una sensibilidad de 200 células por reacción de PCR, la reacción de PCR utilizó iniciadores específicos para amplificar el gen cromosomal *invA* y el gen plasmídico *spvC* (23).

Rijpens, N., *et al.*, en 1999, describieron una detección rápida de un promedio de 5.9 células estresadas de *Salmonella* en 25 g de alimento, en el cual utilizaron un preenriquecimiento de 16 h en agua peptonada amortiguada (BPW), separación inmunomagnética y PCR. (120), mientras que en el mismo año, Nastasi, A., *et al.*, lograron detectar 0.2 UFC/g en muestras de alimento aplicando un preenriquecimiento de 6 h y una amplificación con iniciadores seleccionados de las secuencias de los genes *invA* e *invE* (92).

Por otro lado, Waage, A.S., *et al.*, en 1999 aplicaron un ensayo de nested PCR con iniciadores para secuencias conservadas dentro de un fragmento de ADN clonado al azar del cromosoma de *Salmonella* Typhimurium, en muestras de agua obteniendo un límite de detección de 10 UFC/100 mL, mientras que al aplicar esta técnica en alimentos detectó hasta < 10 UFC/g de muestra después de un proceso de enriquecimiento en medio no selectivo (143). Por otro lado, Rychlik, I., *et al.*, aplicaron un protocolo para la detección de *Salmonella* spp en varias muestras en donde utilizó un nested PCR obteniendo un límite de detección de 10⁵ UFC/g de heces o muestras de carne sin aplicar un paso de preenriquecimiento (122). Lin, J.S. y Tsen H.Y. en 1999 utilizaron una PCR con iniciadores específicos para el gen *mdh* que codifica para la enzima ácido málico deshidrogenasa de *Salmonella* Typhimurium y lo aplicaron en muestras artificialmente inoculadas de heces humanas y muestras de alimentos como leche y carne de pollo cruda encontrando un límite de detección de 10⁰ UFC/0.1 g de heces o 1 mL de leche o alimento homogenizado (81).

Makino S., *et al.*, en 1999 utilizaron un sistema de detección por PCR para especies de *Salmonella* el cual se basó en el gen de la enterotoxina de *Salmonella* (*stn*) y donde se obtuvo un límite de detección de 1 célula/g de heces y de muestras de carne picada con preenriquecimiento de caldo soya tripticasa y caldo de enriquecimiento de *Salmonella* respectivamente (83). Por otro lado, Fach, P., utilizó un kit comercialmente disponible de PCR para la detección de *Salmonella* en alimentos en donde combina la amplificación por PCR y una hibridación tipo sándwich, con este sistema se evaluó la especificidad del mismo con 52 cepas de *Salmonella* y 51 cepas de no-*Salmonella* demostrando que este ensayo es fiable y con un límite de detección de 3 UFC/25 g después de un preenriquecimiento de 18 h en alimentos artificialmente inoculados (36).

Trkov, M., *et al.*, desarrollaron un método para la detección de *Salmonella* en alimentos en donde involucran un preenriquecimiento de 6 a 8 h en agua peptonada amortiguada, separación inmunomagnética (IMS) con Dynabeads® anti-Salmonella, enriquecimiento selectivo en caldo Rappaport Vassiliadis durante 16-18 h, lisis de las células bacterianas en solución de dodecilsulfato de sodio y NaOH a 95 °C y PCR con

los iniciadores ST11 y ST15. El límite de detección fue de 10^0 UFC/25 g en alimentos artificialmente inoculados con *S. Enteritidis*. Cuando se comparó este método con el método estándar ISO 6579 en 42 muestras de alimentos, una fue positiva para PCR, una para el método ISO y 2 para ambos métodos (133).

Burtscher, C., *et al.*, en 1999, desarrollaron un método de detección de las bacterias patógenas *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* basándose en una extracción de ácidos nucleicos y PCR. Con este método lograron obtener un límite de detección menor de 10 células por mililitro de desechos biológicos (15).

Maciorowski, *et al.*, en 2000, utilizaron el sistema “BAX for Screening/*Salmonella*” en alimentos artificialmente contaminados con *Salmonella* Typhimurium y analizados por metodología BAX, las muestras fueron inoculadas con 1200 UFC/10 g o 40 UFC/10 g detectando a este organismo después de 13 o 24 h de preenriquecimiento (82). Posteriormente, Siang Hoong, D.T., *et al.*, utilizaron el sistema BAX™/*Salmonella* (Qualicon, Wilmington, USA) para detectar la presencia de *Salmonella* en diferentes alimentos asiáticos, de manera adicional aplicaron ribotipificación automatizada usando RiboPrinter® Microbial Characterization System (Qualicon, Wilmington, US) para identificar y caracterizar los aislados (128).

Guo, *et al.*, en 2000, utilizaron un PCR con iniciadores para *hliA*, es regulador positivo de los genes de invasión de *Salmonella*, con la finalidad de identificar a *Salmonella enterica* serotipo Montevideo en tomates y sobre los mismos teniendo límites de detección de 10^2 y 10^0 UFC/g, respectivamente en muestras inoculadas artificialmente (63). Mientras que Gado, I. *et al.*, desarrolló un método para detectar *Salmonella* en muestras de alimentos donde se obtuvieron resultados después de 28 h 30 min, se utilizó un preenriquecimiento de 6 h en agua peptonada amortiguada, un enriquecimiento en medio Rappaport-Vassiliadis por 18 h seguido de la PCR con oligonucleótidos para el gen *invA* en donde se demostró la contaminación por *Salmonella* con un mínimo de 10 UFC/g de muestra (55).

Por otra parte, se probó el sistema “Probelia trade mark PCR” para *Salmonella* sp, esto se realizó inoculando *Salmonella* Agona en leche en polvo y queso Ricotta con un límite de detección de 79 UFC/mL y resultados dentro de 24-28 h (144).

Vantarakis, A. *et al.*, elaboraron un ensayo de PCR multiplex para la detección de *Salmonella* spp y *Shigella* spp en mejillones a través de la amplificación de los genes *invA* y *virA* respectivamente. Ellos detectaron de 10-100 células de cada uno de estos microorganismos por mL de homogenizado después de un paso de preenriquecimiento (137).

Li, X., *et al.*, en 2000, lograron la detección de *Salmonella* Typhimurium y *L. monocytogenes* por un ensayo de PCR acoplado con una detección de slot blot, primeramente se extrajo el ADN bacteriano a partir de diluciones de cultivo de bacterias con un amortiguador de extracción. Posteriormente se realizó la PCR y la detección de slot blot fue usada para detectar los productos de PCR. El nivel de detección para este método fue 10^3 UFC/mL en el medio de cultivo original para ambos patógenos o 5

células bacterianas en la reacción de PCR combinada con la separación inmunomagnética (IMS), para separar y concentrar bacterias de las muestras, donde el límite de detección puede ser 40 UFC/mL en muestras de leche (80).

Sharma y Carlson en 2000 desarrollaron y evaluaron un ensayo de PCR multiplex fluorogénico para la detección simultánea de cepas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 para utilizarlo en la detección de muy bajos niveles de estos patógenos en carne y heces. Se utilizaron dos grupos de iniciadores para amplificar un segmento de unión de los genes de virulencia *sipB* y *sipC* de *Salmonella* y un segmento intragénico del gen *eae* de *E. coli* O157:H7. El ensayo pudo detectar <10 UFC de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium o *E. coli* O157:H7/g de carne o heces inoculadas artificialmente con estos patógenos y cultivados por 6 a 8 h en un caldo de enriquecimiento GNTSB (preparado en volúmenes iguales de caldo gram negativo y caldo soya tripticasa) a 37 °C/160 rpm. La detección de los productos de amplificación se completó en menos de 4 h después del enriquecimiento (126).

Santos, L.R., *et al.*, en 2001, desarrollaron una PCR para la detección de *Salmonella* en carne de pollo inoculada artificialmente. Las pruebas fueron realizadas con diferentes diluciones de células de *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis (10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} UFC/mL) inoculadas en muestras de carne de pollo, para establecer los límites de detección, tiempos de incubación (0, 6, 8 y 24 h de preenriquecimiento en PBW 1%) y 3 protocolos de ADN. Los ensayos permitieron detectar hasta 10^{-9} UFC/mL de la dilución inicial de células de *Salmonella* inoculadas en carne de pollo, la cual permite la detección de este organismo dentro de 48 h incluyendo 24 h de pre-enriquecimiento y un protocolo extracción de ADN fenol-cloroformo (124).

Kawasaki, 2001, compararon la eficiencia del sistema de PCR Taqman para *Salmonella* contra 4 protocolos oficiales de métodos de cultivo en diversas muestras de carne, encontrando que ninguno logró una recuperación óptima de este microorganismo comparado con el método de PCR (76).

Se evaluó los sistemas basados en PCR para la detección de *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., y *Listeria monocytogenes* en vegetales y frutas frescas los cuales fueron inoculados con estos microorganismos por separado en un nivel predictivo de 1 UFC/25 g de muestra. La detección del sistema BAX fue comparado con los métodos de detección de FDA, BAM, con los cuales se observó que ambos fueron igual de efectivos para la detección de *Salmonella* Enteritidis y *L. monocytogenes*, sin embargo, en el caso de la detección de *E. coli* O157:H7, el ensayo BAX fue superior que el establecido por FDA, BAM (127).

En 2003, Malorny, B. *et al.*, realizaron un estudio colaborativo involucrando laboratorios de Europa para determinar la precisión de un método basado en la PCR específico para *Salmonella* con iniciadores específicos para el gen *invA* y donde aplicaron un preenriquecimiento en agua peptonada amortiguada seguido de una lisis celular térmica. Las muestras de estudios correspondieron a carne cruda, medio ambiente y canales de cerdo entre otras, logrando obtener un límite de detección de 5

células por 25 g de carne. Los datos fueron comparados con el método de cultivo microbiológico con una sensibilidad y especificidad de 97.5 %. La coamplificación de un control de amplificación interno indicó posibles inhibidores en las muestras. (85). En este mismo año, Ellingson, J.L.E., *et al.*, aplicaron PCR en tiempo real para la detección de *Salmonella* en productos cárnicos crudos, así como listos para comer. Los iniciadores específicos para *Salmonella* fueron diseñados para amplificar un producto de 251 pb de la unión de *SipB* y *SipC*. Las sondas fueron diseñadas para alinear a *SipB* y *SipC* con límites de detección menores de 1 UFC/mL en alimentos. Los resultados correlacionaron con el cultivo y la inmunoprecipitación visual (34).

7.2.2. *Listeria monocytogenes*

7.2.2.1. Generalidades de *L.monocytogenes*

Las listerias están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser encontradas en vegetación en descomposición, suelos, heces de animales, agua residual, silos y agua. De las especies del género *Listeria*, *L. monocytogenes* es el patógeno que concierne a los humanos, ya que es causante de listeriosis, la cual presenta síntomas tales como dolor de cabeza, vómito, fiebre, malestar general o meningoencefalitis. Una persona raramente contrae la enfermedad, pero aquellas con un sistema inmunológico comprometido o deficientemente activo como los ancianos, recién nacidos, mujeres embarazadas, etc. pueden ser infectados y desarrollar un cuadro clínico de listeriosis (39). La bacteria es un bacilo móvil, gram positivo, no esporulado del que se conocen varias estirpes, siendo la 4b la mas frecuente en los brotes naturales, puede crecer en un rango de temperatura de 2 a 45 °C y a un pH de 4.1 a 9.6. Se ha establecido que cualquier alimento fresco, ya sea de origen animal o vegetal puede contener a este microorganismo (93).

7.2.2.2. Métodos convencionales para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos

Para llevar a cabo el aislamiento del microorganismo a partir de materiales biológicos, Gray, *et al.*, en 1948, utilizaron un enriquecimiento frío como una manera de selección aprovechando su carácter psicrófilico, este método incrementó la concentración de especies de *Listeria*, mientras suprime los competidores menos capaces o incapaces de crecer a 4 °C (61).

Investigaciones realizadas por Johansson, T., en 1998, permitieron comparar medios de cultivo utilizados para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en comestibles y medio ambiente de proceso de alimentos; ellos encontraron que la sensibilidad de detección (después del enriquecimiento) de los medios Palcam, Oxford, LA y LMBA fue de 68%, 67%, 74% y 96% respectivamente, y 64%, 73%, 76% y 80% en la enumeración de especies, de alimentos listos para consumir (70).

Duarte *et al.*, en 1999, probó la eficiencia de cuatro protocolos de enriquecimiento para la diferenciación y aislamiento de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* de cadenas de procesamiento de pescado ahumado, los cuales eran métodos convencionales como UVM II, Fraser a 24 y 48 h y un método impedimétrico (medio para detección eléctrica de listerias) y encontraron que el medio Fraser presentó menos falsos negativo para *Listeria* spp (31).

Pritchard y Donnelly, en 1999, al emplear dos caldos de enriquecimiento primario (UVM y LRBS) no encontraron diferencia significativa entre ambos ya que con el uso del medio UVM se identificaron 66 muestras positivas para *Listeria*, y 65 al emplear LRBS, por otro lado, al utilizarse un medio de enriquecimiento secundario, el índice de detección de *L. monocytogenes* se incrementó (113).

En la actualidad los métodos microbiológicos para la detección de *L. monocytogenes* están basados en el uso de preenriquecimientos, enriquecimientos, medios de aislamiento, así como el uso de técnicas que permiten ver el perfil bioquímico de los aislados para poder identificar el microorganismo de interés, estos parámetros son contemplados en metodologías nacionales (NOM-143-SSA1-1995) e internacionales (USDA, FSIS MLG 8.04) (95; 134).

7.2.2.3. Métodos moleculares para la identificación de *L. monocytogenes*

Se han desarrollado diversos métodos para la detección o identificación de *L. monocytogenes*, como el propuesto por Fitter, S. *et al.*, 1992, en el cual desarrollaron un ensayo para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos donde combinaron un preenriquecimiento selectivo con PCR con oligonucleotidos que reconocen una región del gen *hlyA*. La sensibilidad del ensayo en presencia de piel de pollo y queso suave fue determinada en 10-100 UFC/g (45); un año después, Blais y Phillippe desarrollaron un método basado en una sonda de ARN específica para el mismo gen de *L. monocytogenes* por una transcripción *in vitro* de templados incorporados a secuencias contiguas del promotor del bacteriofago T7. El método produce una gran cantidad de ARN los cuales se hibridan con productos de PCR transferidos a una membrana generando híbridos ARN-ADN, tales híbridos son detectados con ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos anti-híbridos ARN-ADN. Este método de hibridación con la sonda de ARN fue más sensible en el análisis de productos de PCR que el método convencional de electroforesis en gel de agarosa (10).

Winters, E.K., *et al.*, desarrollaron un protocolo de PCR basado en la amplificación de un producto de 90 pb proveniente de un gen que codifica para una aminopeptidasa, esta amplificación fue posible en todas las cepas de *L. monocytogenes* probadas pero no en otras especies del mismo género u otros géneros bacterianos. Este ensayo no involucra la purificación del ADN y puede ser realizado en 4 h (151). En el mismo año, Scheu, P, *et al.*, desarrollaron un sistema de detección a partir de una PCR con iniciadores y sondas específicas para el gen *mpl*, permitió la detección de un total de 103 cepas de *L. monocytogenes*, además corroboraron que otras 73 cepas de *Listeria* y no-*Listeria* fueron negativas para dichas pruebas. Además establecieron un ensayo de microplaca con sondas biotiniladas, en donde usaron una cadena de ADN para prevenir falsos negativos, cuando se uso una amplificación interna como control en la PCR-

ELISA. El método requiere aproximadamente de 5 a 6 h para hacer la detección en alimentos (125).

Mientras que Paziak-Domanska, B. *et al.*, compararon la posibilidad de identificar cepas de *L. monocytogenes* aisladas de carne y salchichas en base al API-Listeria test, la producción de fosfatidilinositol-fosfolipasa C específico (PI-PLC) y la PCR para un fragmento de ADN del gen *hlyA* que codifica para la listeriolisina O. Se examinaron 46 cepas, todas las que fueron identificadas como *L. monocytogenes* en el API test dieron señal positiva en PCR. Las cepas identificadas como *L. welshimeri* o *L. innocua* en API test, fueron negativas en PCR. Todas las cepas que dieron positivas en API test y PCR dieron positivas para PI-PLC. Sin embargo, esta actividad no se limita a esta especie ya que algunas *L. welshimeri* (3 de 10) y 17 *L. innocua* fueron positivas para esta prueba (107).

Por otro lado, Bubert, A., *et al.*, detectaron y diferenciaron *Listeria* spp por medio de un ensayo multiplex de PCR el cual tiene como blanco el gen *iap* que codifica para la p60 que es común en especies de *Listeria*, este gen contiene porciones específicas de especie y conservadas en el género. El ensayo se llevó a cabo con 5 diferentes iniciadores, de los cuales el primero correspondió a una secuencia conservada 3' terminal y específico de todas las especies de *Listeria*, los otros cuatro fueron específicos para *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* y otro para las especies de *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (14).

Norton, D.M., y Batt, C.A. en 1999 realizaron un ensayo 5' nucleasa para detectar RNAm como un monitor de viabilidad de *L. monocytogenes*. Los blancos fueron los transcritos de hemolisina (*hlyA*), los cuales son encontrados solo en *L. monocytogenes*. Esta prueba tiene potencial como un método rápido y específico para la detección de *L. monocytogenes* viables. La prueba fue primero optimizada usando RNA templado transcrito *in vitro* y luego aplicado para la detección de RNAm de *L. monocytogenes* de cultivos tratados térmicamente (96). Un año después, Nogva, H.K., *et al.*, presentaron un ensayo para la detección cuantitativa de *L. monocytogenes* basado en una PCR 5' nucleasa utilizando un amplicón de 113 pb del gen de la listeriolisina O (*hlyA*) como blanco, el ensayo fue positivo para los 65 aislados de este organismo que se probaron y negativo para todas las otras cepas de *Listeria* (16 aislados de 5 especies) y algunas otras especies (18 especies diferentes) (93).

Norton, D., *et al.* (2000), introducen métodos de detección como el sistema BAX para el monitoreo de *L. monocytogenes* por la técnica de PCR (usando como blanco el gen *hlyA*) en muestras de pescado ahumado frío y en el medio ambiente de procesamiento de pescado, en donde muestras presuntamente negativas resultaron 4% positivas por este método (97).

En 1993 se desarrolló un sistema inmunomagnético-PCR (MIPA), para detectar a *L. monocytogenes* de alimentos. Este método separa células de *Listeria* de factores inhibidores de PCR presentes en los caldos donde se enriquecen las muestras de alimentos, usando perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales específicos (Mab's). Con esta técnica se logró detectar a 1 UFC de *L. monocytogenes* /g en muestras

de queso después de un segundo enriquecimiento en caldo Fraser (46). Por otro lado, el grupo de trabajo de Wiedmann, *et al.* (1993), estableció un protocolo para la detección de *L. monocytogenes* al emplear PCR no isotópico acoplado con el ensayo de reacción en cadena de ligasa la cual tiene una sensibilidad de 10 UFC (150).

En 1996, Bansal, N.S., *et al.*, validaron un ensayo de PCR multiplex para la detección de *Listeria*, el cual empleó un paso corto de enriquecimiento, seguido del aislamiento de las células bacterianas y la detección por PCR multiplex. Probaron esta metodología en 350 muestras de alimentos de forma paralela a los procedimientos de cultivo estándares para comparar ambos métodos. Demostraron que los ensayos de PCR no mostraron falsos positivos o falsos negativos, que es altamente sensible, de bajo costo y extremadamente rápido con resultados dentro de 48 h (3).

Wieckowska, M., *et al.*, en 1998 utilizaron la PCR para la identificación de *L. monocytogenes* en leche, con iniciadores selectivos para áreas del gen de la listeriolisina O, los cuales permiten diferenciar *L. monocytogenes* de otras especies del mismo género, y teniendo límites de detección de 50-500 UFC/mL de leche o agua (149).

Por otro lado, en 2000, O'Connor, L., *et al.*, desarrollaron un método de detección e identificación de *Listeria* y *L. monocytogenes* basado en ensayos de PCR e hibridación. Los iniciadores de PCR fueron diseñados para la región espaciadora intergénica de ARN ribosomal 16S y 23S, los productos amplificados fueron hibridados en membranas, las cuales contenían sondas de oligonucleótidos específicas para *Listeria* y *L. monocytogenes*; con estos ensayos lograron obtener un límite de detección de 1 a 10 UFC/25 mL de muestras inoculadas de leche cruda y pasteurizada (99).

7.2.3. *E. coli* O157: H7 y otras STEC (*Escherichia coli* productoras de Toxinas Shiga)

7.2.3.1. Generalidades de *E. coli* O157: H7 y otras STEC

Aunque *E. coli* no figura a menudo como patógeno, algunas de las cepas son peligrosas. *E. coli* se encuentra dentro de la familia Enterobacteriaceae, las cuales son informalmente referidas como bacterias entéricas.

En virtud de que existen muchas cepas diferentes de *E. coli* [*E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteropatogénica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* Uropatogénica (UPEC) y *E. coli* meningitis-neonatal (NMEC)], los microbiólogos las han clasificado en más de 170 serogrupos y dentro de cada uno de ellos, hay uno o más serotipos. *E. coli* O157:H7 fue identificada por primera vez en el U. S. Center for Disease Control en 1975. Sin embargo esto fue útil hasta 1982, cuando *E. coli* O157:H7 fue considerada como la causa de enfermedades entéricas y designada como *E. coli* enterohemorrágica o EHEC debido a la colitis hemorrágica (HC) que ocasiona, la cual

puede desarrollar en Síndrome Uremico Hemolítico (HUS) por lo que figura como importante patógeno emergente que origina patologías muy severas en seres humanos.

El ganado vacuno saludable o enfermo constituye el principal reservorio de este tipo de microorganismos, y varios brotes han sido asociados con el consumo de carne o productos derivados de la misma (101), siendo la carne picada y las hamburguesas los principales vehículos de transmisión, pero el contagio de persona a persona también ha sido demostrada (111). El serotipo O157:H7 ha provocado en los últimos años un gran número de brotes de HC, aunque cepas de O26 y O111 también son causantes de HC pero en una frecuencia mucho menor (112). Se ha reportado que las cepas de *E. coli* productoras de toxinas shiga han causado una serie de brotes, especialmente en Canadá, Japón, Reino Unido y Estados Unidos (11). *E. coli* O157:H7 no fermenta el sorbitol, adonitol, salicilina, inositol, ni tampoco la celobiosa (118) y su patogenicidad parece estar asociada a la presencia de un plásmido de 60 MDa y la producción de varias enterotoxinas (18).

7.2.3.1.1. Cepas atípicas de *E. coli* O157:H7

En años recientes, Karch reportó una cepa de O157:H- SOR(+) y GUD(+) que causaron un brote de HUS en Alemania (73), demostrando que sus patrones de campos pulsados son únicos y diferentes a las cepas típicas de *E. coli* O157:H7. Pagano, H. *et al.*, reportó cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de Hokkaido Japón las cuales son GUD(+) SOR(-) y demostraron por PFGE que pudiera ser una clona distinta del serogrupo O157, estos aislados también producen enterohemolisina en agar sangre, producen toxinas Stx1 y 2 y fueron aislados de pacientes sin HUS (91). En Alemania, Gunzer *et al.*, en 1992 aislaron a partir de pacientes con HUS cepas de *E. coli* O157 que fermentaban sorbitol dentro de 24 h, tenían actividad de β -glucuronidasa y producían SLT-II (62), Fratamico, P., en 1993, también reportó una cepa mutante de *E. coli* O157:H7 que es fermentadora de sorbitol (50).

Bielaszewska reportó dos cepas de *E. coli* (STEC) O157:H- productoras de SLT que son fermentadoras de sorbitol, las cuales fueron aisladas de pacientes con HUS en la Republica Checa en 1995 (9). Hayes en 1995 reportó el aislamiento de una cepa de *E. coli* O157:H7 (G5101) la cual fue aislada de un paciente con diarrea sanguinolenta, la cual no fermentaba el sorbitol, pero si era β -glucuronidasa y ureasa positiva, producía SLT- I y II y contenía el gen *eae*, este tipo de cepas puede haberse no detectado cuando se observan las características microbiológicas de sorbitol y β -glucuronidasa negativo (65). En España se reportó el aislamiento de dos cepas de *E. coli* O-rough:K1:H7 aisladas de muestras de heces de 2 viajeros con diarrea quienes habían viajado a la India y Centroamérica, ambas cepas fueron sorbitol negativas, pero β -glucuronidasa positiva. β -galactosidasa negativa y solo produce VT1 (141).

También se han reportado cepas de *E. coli* O157 no lisogénicas (cepa A2, *E. coli* O157:K88:H19 no verotoxigenica) (112), aunque es probable que esta cepa haya perdido su carácter lisogénico (74); por otro lado, se ha publicado el aislamiento de cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de pacientes con HC que tienen VT2 o VT1 y VT2 (112); se ha reportado la cepa MA6 la cual es parecida a *E. coli* O157:H7, pero que no reacciona con muchos kits anti-O157, ya que aunque portan el gen *rfbE* que es esencial

para la expresión de O157 y porta factores de virulencia, un análisis de LPS mostró que esta cepa “rouge” no produce el antígeno O157, pero genéticamente pertenece a la clona. Esto podría hacer que la cepa sea no detectable o identificable con muchos ensayos serológicos en los análisis de alimentos (40). Fratamico, P, en 1998 reportó una cepa de *E. coli* O157:H7 no toxigénica que fue negativa para los tres productos de PCR (VT1, VT2 y *eaeA*) (52).

7.2.3.1.2. Factores de virulencia de *E. coli* O157:H7

Verotoxinas. Las *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) también llamadas *E. coli* productoras de verotoxinas, han emergido como patógenos que pueden causar intoxicación por alimentos enfermedad severa y potencialmente fatal. Son una de las principales causas de gastroenteritis que pueden complicarse y llegar a HC o HUS. Estos microorganismos elaboran 2 potentes citotoxinas codificadas en fagos conocidas como toxinas shiga (11). Destruyen las células Vero y están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae*, tipo I. Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 (o SLT-I) y VT2 (o SLT-II), y algunas variantes de VT2, entre las que se incluye, VT2e (toxina edematosa), constituidas por una subunidad enzimática A de aproximadamente 32,000 Da y 5 subunidades B de un PM de 7,700 Da que fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (globotriaosilceramida, Gb3). La VT2e se une a Gb4. De todos los serotipos de *E. coli* verotoxigénicos solamente algunos llamados colectivamente enterohemorrágicos como el O157:H7, o H⁻, O26:H11, O111:H⁻, O145:H⁻, O45:H2, O128:H⁻, O4:H⁻, O103:H2, producen enteritis y complicaciones siendo el primero O157:H7 el que causa patología mas frecuente y más grave; esto puede deberse a que los otros serotipos toxigénicos producen toxina en menor cantidad o adolecen de algún cofactor de patogenicidad. (gen *eae* u otros) (86).

Intimina. Adicionalmente posee otros factores de virulencia como la proteína llamada intimina, esta es una proteína de membrana exterior de 94 a 97 kDa la cual tiene como función la intima adhesión de las STEC a las células epiteliales intestinales causando lesiones de adhesión y borrado en la mucosa intestinal como lo hacen las EPEC clásicas (86). La intimina es codificada por el gen cromosomal *eae*, el cual es parte de la isla de patogenicidad del locus del enterocyte effacement. Existen 8 variedades de estas proteína (tipo α , β 1, β 2, γ 1, γ 2, δ , ϵ y ζ) (11).

Enterohemolisina. Un factor que puede afectar la virulencia de las cepas de STEC es la enterohemolisina (Ehly), también llamada enterohemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC-HlyA) y codificada por el gen *ehxA* (11).

7.2.3.2. Métodos convencionales para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos

Los medios de cultivo para el enriquecimiento, aislamiento y confirmación de *E. coli* O157 productora de verotoxinas están en constante evolución. Generalmente contienen varios antibióticos que suprimen efectivamente el crecimiento de la flora acompañante. Han sido descritos varios medios selectivos de enriquecimiento, de los cuales, el caldo soya tripticasa (CST) con novobiocina y el caldo EC modificado (ECm) con

novobiocina, han mostrado ser los más apropiados. Estos medios son caldos minimamente selectivos que proporcionan de alguna manera limitada especificidad diferencial favoreciendo el aislamiento de *E. coli* O157 verotoxigénica e inhibiendo el crecimiento de otras bacterias gram negativas en la muestra.

Para el aislamiento de *E. coli* O157:H7, se han desarrollado varios métodos para diferenciar a este microorganismo de acuerdo a ciertas características que las distinguen del resto de las *E. coli* y que facilitan su cultivo y detección. Uno de estos rasgos, en contraste con la mayoría (90 %) de las cepas de esta especie, es la incapacidad de fermentar el sorbitol en 24 h y no hidrolizar el metil-umbeliferil-glucuronido u otro sustrato que detecte la actividad β -glucuronidasa.

Los métodos convencionales para la detección de *E. coli* O157:H7 incluyen el aislamiento de colonias no fermentadoras de sorbitol en agar MacConkey sorbitol, así como en la incapacidad de producir β -glucuronidasa. Los medios de cultivo que contienen 5-bromo-5-cloro-3-indoxyl- β -D-glucorónido o 4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido, han sido desarrollados para explotar esta característica, tal es el caso del Agar Fluorocult *E. coli* O157:H7, ya que cuando este sustrato es hidrolizado por la enzima, se produce un producto fluorescente que puede ser detectado con luz ultravioleta de onda larga (41). Estas características fenotípicas, seguido de la confirmación bioquímica y serológica con antiseros específicos para los antígenos O157 y H7 son utilizadas para su identificación. El medio de cultivo por si solo puede ser insensible, especialmente para la detección de pequeños números de la bacteria, además, es incapaz de detectar cepas de *E. coli* verotoxigénicas no O157 (98).

Varios métodos microbiológicos pueden ser utilizados para aislar *E. coli* O157:H7 de alimentos; el agar MacConkey Sorbitol ha sido utilizado extensamente para el aislamiento de este microorganismo, el agar Colitis Hemorrágica, es un medio selectivo y diferencial utilizado en un método directo de plaqueo para aislar *E. coli* O157:H7 de alimentos. Un tercer procedimiento utiliza el medio MacConkey Sorbitol suplementado con telurito de potasio y cefixima, esta última inhibe el crecimiento de especies del género *Proteus*, las cuales son sorbitol negativas y pueden ser confundidas con *E. coli* O157:H7 en este medio (146). Estudios en los cuales se evaluó la selección de *E. coli* O157 verotoxigénica utilizando telurito de potasio, demostraron que los índices de concentración mínima inhibitoria fueron más altos para las cepas de *E. coli* O157 verotoxigénicas que para otras cepas de *E. coli* y *Aeromonas* spp; el medio MacConkey sorbitol, que contiene telurito y cefixima permitió el crecimiento de *E. coli* O157 verotoxigénica, inhibiendo parcial o completamente el crecimiento de 67 % de otras cepas de *E. coli* y todas o la mayoría de otras especies no fermentadoras de sorbitol que fueron analizadas. Los autores concluyeron que la introducción del telurito de potasio en el agar MacConkey sorbitol incrementa marcadamente el grado de aislamiento de cepas de *E. coli* O157 verotoxigénicas (152).

Un procedimiento de enriquecimiento y aislamiento en donde se utilizó el medio MacConkey Sorbitol con cefixima y telurito (TC-SMAC) fue introducido para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos. Análisis comparativos del procedimiento que utiliza TC-SMAC con el método de agar Colitis Hemorrágica (HC) utilizando una variedad de

alimentos naturalmente contaminados mostró que el procedimiento que utiliza el TC SMAC fue superior al método que utiliza el agar HC para la recuperación de *E. coli* O157:H7. Este procedimiento incluyó un paso de enriquecimiento con Caldo Soya Trypticasea con cefixima, cefsulodín y vancomicina (146).

También se ha introducido en el mercado un medio MacConkey sorbitol conteniendo cefixima y ramosa para diferenciar las *E. coli* O157:H7 sorbitol negativas (20). Además se desarrolló una versión modificada de medio MacConkey sorbitol conteniendo cefixima y telurito, (CT-SMAC), al cual se le adicionó salicilina y 4-metilumberifenil- β -D-galactopiranosido (medio CT-SSMAC). Éste fue utilizado para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de brotes en rábano mostrando a las colonias de este microorganismo incoloras y β galactosidasa positiva (53). Con respecto a la cuantificación selectiva de este microorganismo se ha recomendado el uso del SMAC, suplementado con MUG (MSMA), sin embargo al recuperar células tratadas con calor, el TSB es mejor que el MSMA (121).

Aunque el medio de cultivo en placa más ampliamente utilizado para el aislamiento de cepas típicas no fermentadoras de sorbitol de *E. coli* O157 verotoxigénica es el agar MacConkey Sorbitol con cefixima y telurito, algunas cepas de esta bacteria son sensibles al telurito y/o son fermentadoras del sorbitol, por lo que se recomienda el uso de un segundo medio de aislamiento para garantizar el aislamiento de tales cepas (29). Muchos de los métodos utilizados para la detección de *E. coli* O157:H7 requieren de tiempo ya que están basados en el cultivo del microorganismo, estos métodos se basan en la detección de este serotipo y se descartan a otras cepas productoras de verotoxinas, que también han causado brotes y casos esporádicos de intoxicación (5). Para poder detectar el resto de las ECVT se precisa investigar la producción de verotoxinas por técnicas fenotípicas, genotípicas o inmunológicas (29).

7.2.3.3. Métodos moleculares para la identificación de *E. coli* O157:H7 y otras STEC

Lang *et al.*, en 1994 aplicaron métodos de PCR para la amplificación de secuencias génicas de varias toxinas de *E. coli*, entre ellas, LT, SLT-I y SLT-II de 258, 130 y 346 pb respectivamente; los aislados procedentes de agua marina y estuarios del Sur de California y Norte de Carolina, no presentaron cepas con secuencias homologas a SLT-II (78).

En 1995, Cebula y colaboradores desarrollaron un ensayo en formato MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) con iniciadores específicos para una sustitución única de una base en el gen *uidA* de *E. coli* O157:H7 acoplado con iniciadores para los genes de SLT-I y SLT-II en un ensayo de PCR multiplex. Este ensayo consideró a *uidA*, el cual codifica para la β glucuronidasa en *E. coli* y aunque *E. coli* O157:H7 no presenta esta actividad, este microorganismo porta el gen. Analizaron 108 cepas bacterianas, incluyendo cepas de referencia y serotipos *E. coli* O157:H7 y O157:H⁻ aislados de pacientes y alimentos, otros serotipos de *E. coli* verotoxigénica, así como varios géneros de bacterias entéricas y no entéricas. Todas las cepas de referencia de *E. coli* O157:H7, incluyendo dos cepas O157:H⁻ fueron correctamente identificadas, así como el tipo de verotoxina producido, ya que los tres amplicones generados fueron

de tamaños predecidos. En las cepas de serotipos verotoxigénicos no O157:H7 examinados solo se obtuvieron productos de PCR específicos para el tipo de verotoxina de las mismas (18). Ese mismo año, P. Fratamico *et al.*, desarrollaron un PCR multiplex donde utilizaban iniciadores específicos para el gen *eaeA*, secuencias conservadas de SLT-I y II y para un plásmido de 60 MDa, logrando amplificarlos simultáneamente y utilizándolos para identificar específicamente al serogrupo O157. La especificidad de este ensayo fue evaluado con 61 cepas bacterianas, incluyendo 16 cepas de *E. coli* O157:H7, 8 cepas de *E. coli* O157 (NM y H⁻), así como cepas de *E. coli* de otros serotipos. Los productos de amplificación antes mencionados fueron obtenidos con todas las cepas de *E. coli* O157:H7, O157:NM y O157:H⁻, excepto para una cepa O157:NM no toxigénica, la cuál fue negativa para todos los productos (51).

Gannon *et al.*, en 1997, describieron un ensayo de PCR multiplex para mejorar la especificidad de la identificación de cepas de *E. coli* enterohemorrágica, en donde emplearon iniciadores específicos para el gen *flic* que codifica para el antígeno flagelar H7, en combinación con otros iniciadores que tenían como gen blanco los genes de las verotoxinas VT1 y VT2 y el gen *eaeA* para el ensayo múltiple (58). Los iniciadores para este último gen (AE 19 y 20) habían sido probados y generaron productos de PCR con ADN de ECVT del serogrupo O157 de todas las cepas examinadas (H7 y H⁻), pero no lo hizo con otras cepas de ECVT o ECEP excepto una cepa verotoxigénica de serogrupo O145 y una enteropatógena de serogrupo O55 (57).

Szych, *et al.*, en 1998 amplificaron por PCR fragmentos de los genes que codifican para verotoxinas, enterohemolisina e intimina, encontrando 5 cepas de *E. coli* O157 que producían solo SLT-II y aisladas de alimentos procedentes de Polonia (132), mientras que Radu, *et al.*, aislaron 12 cepas de *E. coli* O157:H7 en 9 de 25 muestras de carne de res adquirida en punto de venta al público en tiendas de Malasia. Estas cepas producían SLT-II con o sin SLT-I y tenían el gen *eae* y el plásmido de 60Mda (115).

Franck, *et al.*, en 1998 reportaron el uso de un PCR multiplex para identificar cepas de *E. coli* enterotoxigénicas, productoras de toxinas shiga y lesiones de adhesión y esfacelamiento por la amplificación de los genes que codifican la fimbria K99 y F41, enterotoxina termoestable, intimina y toxinas shiga 1 y 2. Esto fue útil para identificar cepas que causan diarrea en becerros (48); Paton y Paton, desarrollaron un ensayo de PCR multiplex para detectar y caracterizar cepas STEC amplificando productos de los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA*, EHEC *hlyA*, *rfb*_{O111}, *rfb*_{O157}, utilizando para estos últimos dos iniciadores para las porciones del gen *rfb* que codifican para el antígeno O de O111 y O157, respectivamente (103).

Maurer *et al.*, en 1999 publicaron una prueba de PCR para la específica detección de *E. coli* O157 en la que utilizaron un par de iniciadores específicos para *rfb* de O157 (probablemente codifica una GDP-manosa deshidratasa) que amplifican un fragmento de 420 pb. Ellos analizaron cepas de *E. coli* O157:H7, así como otros serotipos y serogrupos (O11, O26, O55 y O11), además de cepas de otros géneros bacterianos. Obtuvieron el fragmento esperado en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 que fueron analizadas, pero no en los demás serotipos de *E. coli* y géneros bacterianos. Posteriormente, muestras de leche y de heces fecales de bovino fueron inoculadas con el

microorganismo, por medio de diluciones seriadas, encontrando límites de detección de menos de 10 células (88).

Radu, S., *et al.*, 2001, realizaron una detección de *E. coli* O157:H7 a partir de 25 muestras de filetes de res y 3 muestras de carne para hamburguesa de pollo. La bacteria fue recuperada utilizando un procedimiento de separación inmunomagnética, seguido de un plaqueo selectivo en agar MacConkey sorbitol, y posteriormente identificados como *E. coli* O157:H7 con 3 pares de iniciadores que amplifican fragmentos de los genes de SLT-I, SLT-II y H7 en ensayos de PCR. La huella digital de la bacteria se comparó utilizando RAPD y PFGE (116).

Por otra parte, Wang en 2002, desarrollaron un ensayo de PCR multiplex para detectar 8 de los mas importantes genes de *E. coli* asociados con la virulencia y dos que definen el serotipo. Estos genes fueron *stx*₁, *stx*₂, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f}, EHEC *hlyA* y *eaecA*, así como *rfbE* que codifica para el serotipo O157, *fliC* que codifica para el serotipo flagelar H7 de *E.coli* y el ARNr 16S de *E. coli* como control interno, esto se realizó a nivel de cepa y provee identificación genotípica del serotipo O157:H7 mas comúnmente asociado a enfermedad (145).

Margall aplicó la técnica de PCR amplificando secuencias genómicas de VT-I y VT-II a partir de muestras de pacientes con HUS y HC, la especificidad de los amplificados fue confirmado con digestión de enzimas de restricción (87).

Venkateswaran *et al.*, en 1997 desarrollaron un ensayo de PCR multiplex en carne para la detección de *E. coli* O157:H7 y sus toxinas; esto fue realizado utilizando iniciadores para una substitución única en una base específica en el gen *uidA* acoplado con oligonucleotidos para los genes de las toxinas SLT-I y II. Se requirió un mínimo de 10² UFC por PCR para amplificar las bandas específicas para la PCR multiplex, esto se realizó sin un paso de extracción de ADN, pero utilizando una técnica de filtración en dos pasos, suficiente para eliminar la inhibición por el alimento y otras partículas. Cuando el alimento inoculado se incubó toda la noche, se logró detectar hasta 1 UFC/g de inóculo inicial (139).

Chen *et al.*, en 1998 reportaron el uso de un sistema de PCR automatizado basado en la fluorescencia (Amplisensor) para detectar cepas STEC; en este sistema se amplifica un fragmento de 323 pb de los genes de las toxinas shiga *stx*₁, *stx*₂ y *stx*_e, y tiene un límite de sensibilidad de 1 a 5 UFC por PCR y de 3 UFC por 25 g en muestras de carne molida después de paso de preenriquecimiento de toda la noche (22).

Johnson, *et al.*, 1998, compararon el ensayo BAX con métodos convencionales de detección para la búsqueda de *E. coli* O157:H7, en carne molida con niveles extremadamente bajos del patógeno (0.28, 0.03-0.26 UFC/g). Ellos encontraron que el sistema BAX detectó a la bacteria en un 96.5 % comparado con el 39 % para el método de cultivo y 71.5 % para el método de inmunodifusión. El método de cultivo incluía el uso de CSTm con novobiocina, para el preenriquecimiento, mientras que para el aislamiento se utilizaba SMAC, TSMAC y CTSMAC (71). En el mismo año Oberst, *et al.*, en 1998, reportaron el uso de un ensayo de PCR basado en la amplificación de ADN

(gen *eaeA*) para la detección presuntiva de *E. coli* O157:H7 con una sonda fluorogénica y el ensayo 5' nucleasa (Taqman), que daba resultados presuntivos solo cuando la concentración del microorganismo era $\geq 10^3$ UFC/mL en CSTm o ECm, y $\geq 10^4$ UFC/mL cuando eran mezclas de CSTm con carne molida. También encontraron que si se le agregaba un paso de IMS, seguido de un paso de cultivo secundario y recuperación de ADN con "QIAamp tissue kit" (Quiagen), con un umbral de detección $\geq 10^2$ UFC/mL (100).

Desmarchelier, *et al.*, en 1998 desarrollaron un PCR para la detección de *E. coli* O157 basado en el gen que codifica para la síntesis del antígeno O *rfbE*; esto originó un producto de 479 pb que detectó < 1 UFC de *E. coli* O157 por mL en leche cruda después de un paso de preenriquecimiento (30).

Fagan, *et al.*, en 1999, mediante un ensayo de PCR multiplex en muestras fecales de cabras, ovejas y cerdos detectaron genes que codifican SLT's (*stx1* y *stx2*) intimina (*eaeA*) y enterohemolisina (EHEC *hlyA*). En el estudio aplicaban un preenriquecimiento en ECm y una extracción sin solventes, encontrando límites de detección de 18 y 37 genomas en muestras fecales y cultivos puros, respectivamente. Los resultados indicaron que los factores más comúnmente encontrados fueron *stx1* y *hlyA* (37). En el mismo año, Paton *et al.*, desarrollaron un ensayo de PCR multiplex para la detección en heces de STEC pertenecientes a tres serogrupos utilizando iniciadores específicos para la porción del loci genético (*rfb*) que codifica la biosíntesis del respectivo antígeno O de O157, O111 y O113 (105).

Un año más tarde, Pass, *et al.*, desarrollaron PCRs para amplificar 11 genes de virulencia de *E. coli*, entre los cuales se encontraban VT1, VT2 y *eaeA*, logrando aplicar esta técnica a heces de perro (102). A la par de Pass, Vertiev, *et al.*, desarrollaron un PCR para la detección de microorganismos productores de toxinas SLT's, encontrando cepas que contenían el gen SLT-II y que fueron aisladas de pacientes con HUS en Rusia (140). Más tarde, Paton, *et al.*, en 2002 desarrollaron un ensayo de PCR pentavalente para la detección de genes de virulencia como *saa* (gen de la adhesina de autoaglutinación de STEC), *stx1*, *stx2*, *eae* y *ehxA*, aplicándolo en cepas y en heces de pacientes con HUS (104).

Cocolin *et al.*, 2000, diseñaron un PCR multiplex para la detección de EHEC y EPEC en carne artificialmente inoculada, utilizando iniciadores para amplificar los genes *slt* (I y II) y *eaeA*, observando que al utilizar un solo par de iniciadores la sensibilidad era de 1 célula en 25 g, sin embargo cuando se probó el ensayo multiplex la sensibilidad disminuía a 10 células/25 g de muestra (24).

En otro estudio al sur de Tailandia se detectaron cepas de *E. coli* O157 provenientes de heces bovinas y carne de res en punto de venta, realizando un enriquecimiento previo seguido de una separación inmunomagnética, con el cual, 4 de las 5 cepas aisladas portaban el gen para SLT-II y una portaba además el SLT-I. Mediante PCR con iniciadores al azar, las cepas mostraron ser genéticamente distintas (142).

Fratamico *et al.*, 2000, desarrollaron un PCR multiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 utilizando iniciadores para el gen de la hemolisina que se encuentra codificada en un plásmido (hly933), un gen estructural flagelar del serogrupo H7 (*fliCh7*), los genes de las toxinas shiga (*stx1*, *stx2*) y el gen *eae*. Previamente se realizaron un preenriquecimiento de las muestras de carne molida, queso azul, mejillones, germinados de alfalfa y heces bovinas, los cuales fueron artificialmente inoculados con varios niveles de *E. coli* O157:H7 cepa 933. Después de un paso simple de extracción de ADN, se realizó la PCR y se visualizó en geles de agarosa. La sensibilidad fue menor o igual a 1 UFC/g de alimento o heces (nivel inicial de inóculo), por lo que concluyeron que la PCR multiplex facilita la detección de este microorganismo y puede reducir el tiempo requerido para la confirmación de los aislados (49).

Berry, E.D. (2000) desarrolló un método de detección de la expresión génica de *E. coli* O157:H7 en superficies de canales de res, a través de la utilización de RT-PCR. Esto se llevó a cabo detectando la expresión del gen de la proteína verde fluorescente selectivamente inducible (GFP) que se encuentra en un plásmido transformado de la cepa de *E. coli* O157:H7 inoculada en tejido superficial de canales de res (6).

McKillip, J.L., *et al.*, 2000, compararon el método de extracción de ADN directamente del alimento usando un procedimiento a base de solventes contra un método de concentración bacteriana y posteriormente isotiocianato de guanidina (GITC) para la detección *E. coli* O157:H7, en diferentes productos lácteos contaminados artificialmente. La obtención del ADN por el método del solvente fue mayor que la obtenida por el método de concentración, sin embargo, la pureza del ADN obtenido después de la concentración bacteriana fue significativamente mejor que la obtenida de la extracción orgánica. Se encontró que los límites de detección para la PCR varía con cada alimento (leche desnatada, leche deshidratada libre de grasa, queso cheddar y brie) en rangos de 10(1) a 10(4) UFC/mL exceptuando el suero en polvo (90).

Alexandre M., *et al.*, en 2001 evaluaron diferentes técnicas de diagnóstico en alimentos para la detección de *E. coli* enterohemorrágica para determinar la más apta para utilizar en ese país (Chile). Realizaron un análisis paralelo de 64 muestras de alimentos cárnicos (23 de carne molida refrigerada, 23 salchichas de cerdo refrigeradas y 18 hamburguesas congeladas) vendidos en Santiago de Chile usando sondas de ADN, ELISA y PCR. El 37.5% de las muestras fueron positivas por los tres métodos. Los valores predictivos positivo y negativos, la sensibilidad y la especificidad de la ELISA fueron de 26.7, 81.6, 30.8 y 78.4%, mientras que para la PCR de 91.7, 96.2, 84.6 y 98% respectivamente. Los serogrupos más frecuentes fueron O158, O157, O119, O125 y O114. Los resultados mostraron que aunque las técnicas moleculares como ELISA son útiles para la detección en alimentos cárnicos, la técnica de PCR tiene ventajas en términos de sensibilidad, especificidad, costo y fácil implementación (2).

En 2001 Li y Drake desarrollaron un ensayo de PCR cuantitativo competitivo (QC-PCR) para detectar a *E. coli* O157:H7. De 10^3 a 10^8 UFC de este organismo por mL fueron cuantificadas en caldo o leche descremada. Ellos utilizaron como blanco a *stx2* (79).

Campbell *et al.*, en 2001, evaluaron el uso de un ensayo de PCR multiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 en suelo y agua utilizando iniciadores para el gen de la intimina, SLT-I y II, O157 y H7 de este organismo y encontraron que con 8 h de preenriquecimiento se obtenía un límite de detección de 6 UFC/g, de suelo, mientras que con 6 h de 10^4 UFC/g (16).

Chapman *et al.*, en 2001, compararon la PCR, cultivo y dos inmunoensayos visuales (VIAs), BioSogn y Path-Stik, para la detección de *E. coli* O157 después de un paso de preenriquecimiento. De 120 muestras contaminadas naturalmente, la PCR fue positiva en 67 %, BioSing y el cultivo en 58 % y Path-Stik en 56 %. Las placas de las 11 muestras que fueron negativas para cultivo, pero positivas para PCR y VIA's, probablemente fue debido al sobrecrecimiento de organismos fermentadores de sorbitol que dificulta la detección de cualquier *E. coli* O157 presente (19).

McIngvale, 2002. demostraron la utilidad de la RT-PCR para detectar a STEC a través del uso de 4 pares de iniciadores que amplifican una región específica del operon *stx-II* que lograron detectar los ARNm blanco después de 12 h de preenriquecimiento de carne molida cocida con un inóculo inicial de 1 UFC/g (89). En ese mismo año, Ibekwe, A.M, *et al.*, desarrollaron un ensayo de PCR multiplex fluorogénico para cuantificar a *E. coli* O157:H7 en el suelo, heces de vacas y terneros y agua residual de una lechería. Los iniciadores y sondas amplificaban y cuantificaban los genes de SLT-I (*stx1*), SLT-II (*stx2*) y el gen de la intimina (*eae*) el límite de detección en estas muestras fue $\geq 3.5 \times 10^4$ UFC g⁻¹. Cuando a las muestras de suelo se les realizó un preenriquecimiento de 16 h, el límite de detección fue mejorado a menos de 10 UFC g⁻¹ de *E. coli* O157:H7 (69). Al mismo tiempo, Bélanger *et al.*, reportaron el uso de un ensayo de PCR en tiempo real para la detección de STEC, y otras bacterias productoras de toxinas shiga. Utilizando dos pares de iniciadores que amplificaban eficientemente todas las variantes de los genes de las toxinas Shiga *stx1* y *stx2* y el uso de dos "molecular beacons" con diferentes fluoróforos, detectaron cerca de 10 copias del genoma en cada reacción de PCR a partir de ADN genómico purificado de las cepas de STEC (5).

8. MÉTODOS

8.1. Selección de iniciadores

La búsqueda de iniciadores y secuencias de ADN de los genes de cada uno de los patógenos en estudio (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7), se llevó a cabo en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina/Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica y en publicaciones científicas.

8.2. Simulaciones de PCR

Con el programa Amplify 1.2 (35) se realizaron las simulaciones de PCR, para seleccionar los iniciadores con un mejor alineamiento.

8.3. Material Biológico

Se trabajó con muestras de carne de corte New York y Rib Eye procedentes de la zona metropolitana de Monterrey, N. L., México. Se utilizaron como controles positivos cepas de referencia de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Typhimurium* (ATCC 13076), *E. coli* O157:H7 (INDRE), y *S. aureus* (ATCC 6538P), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (Grupo D) (ATCC 13076), *S. Paratyphi* (Grupo A) (ATCC 9150), *S. Typhi* (CDC-99), *Escherichia coli* O157:H7 CDC (IPN), *E. coli* (ATCC 4350), *E. coli* (LMS), *Listeria seeligerii* (ATCC 35967), *L. innocua* (WT), *L. welshimeri* (WT), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (ATCC 11778), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341^a), *Rhodococcus equi* (ATCC 6939), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* (LMS), *E. aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella* sp. (LMS), *Citrobacter freundii* (LMS) y *E. faecalis* (LMS). ADN de *Brucella abortus* S19 (INDRE) y *Mycobacterium bovis* AN5 (INDRE).

8.4. Mantenimiento de las cepas

Todas las cepas utilizadas en este proyecto se mantuvieron a 4 °C en el medio agar soya tripticaseína (AST) (Difco Laboratories, Detroit Mich).

8.5. Extracción de ADN de cepas de referencia

A partir de paquetes bacterianos se realizaron las extracciones de ADN por el método CTAB (Bromuro de cetiltrimilamonio). A cada paquete celular, se le agregó 400 µL de amortiguador TE pH 8.0, se mezcló en vortex (MS1 Minishaker IKA[®] Works, Inc.) y se

colocaron por 5 min en agua hirviendo, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μL de lisosima (5 mg/mL), se mezcló e incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se agregaron 75 μL de SDS al 10% + proteínasa K [70 μL de SDS 10 % más 5 μL de proteínasa K (10 mg/mL)], se mezcló e incubó a 65 ° durante 10 min. Se adicionaron 100 μL de NaCl 5 M y 100 μL de CTAB/NaCl precalentada a 65 °C y se homogenizó hasta que presentó una apariencia lechosa. Se mezcló e incubó a 65 °C por 10 min y después en agua hirviendo por 5 min. Enseguida se adicionó 750 μL de solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm/6 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo (aproximadamente 600 μL) teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia. Se adicionaron 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico, se mezcló e incubó a -20 °C por 30 min. Se centrifugó a 10,000 rpm/15 min. Se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de etanol helado al 70 %. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante. Se centrifugó a 10,000 rpm/1.5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente (aproximadamente 20 min). Se resuspendió el ADN en 20 μL de TE 1X y se almacenó a -20 °C hasta su uso (33).

8.6. Estandarización de la prueba de PCR en cepas de referencia

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 μL , utilizando 25-50 pmoles de cada iniciador, 200 μM de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1-3 mM de MgCl_2 , 1X de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl) y 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (PROMEGA) y de 10-200 ng de ADN templado. Las condiciones del termociclador (Thermohybrid) fueron un ciclo 1 min/94 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento de iniciadores a 55-65 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final de 10 min/72 °C. Las temperaturas de alineamiento y los iniciadores para cada patógeno en estudio, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1
Iniciadores utilizados para detectar los patógenos en estudio.

Patógeno	Gen	Iniciadores	Secuencia	Fragmento	T° de alineamiento	Referencia
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	287 pb	58 °C	Rahn, K. <i>et al.</i> 1992
		141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC			
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	420-A	CATCGACGGCAACCTCGGAGA	420 pb	58 °C	Fitter, S <i>et al.</i> 1992
		420-B	ATCAATTACCGTTCTCCACCATTC			
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stx1</i>	VT1-A	CGCTGAATGTCATTGCTCTGC	302 pb	58 °C	Blanco, M., <i>et al.</i> 2003
		VT1-B	CGTGGTATAGCTACTGTCACC			
	<i>stx2</i>	VT2-Am	CTTCGGTATCCTATTCCC*	518 pb	58 °C	Blanco, M., <i>et al.</i> 2003*
		VT2-Bm	CTGCTGTGACAGTGACAAAACG*			
	<i>egea</i>	AE-19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	1087 pb	58 °C	Gannon, V.P., <i>et al.</i> 1993
AE-20		TCAGCGTGGTTGGATCAACCT				
<i>rbfE</i>	O157-AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497 pb	58 °C	Desmarchelier, P.M., <i>et al.</i> 1998	
	O157-AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG				
<i>fliC</i>	H7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625 pb	60 °C	Gannon, V.P., <i>et al.</i> 1997	
	H7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC				

* Iniciadores reportados por Blanco, M., *et al.*, 2003. Al iniciador VT2-A se eliminaron los últimos 2 nucleótidos y al VT2-B se eliminó el nucleótido final en las regiones 3'

8.7. Electroforesis

Una alícuota de 2.5 µL de cada producto de PCR fue cargado en gel de agarosa al 2.0 % el cual se sometió a 70 V, teñidos con bromuro de etidio en solución a una concentración de 1 µg/mL y analizados mediante cámara HP PhotoSmart 850 adaptada con filtro UV y transiluminador UVP-Epi-Chemi dark-Room.

8.8. Pruebas de especificidad con microorganismos relacionados

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µL, utilizando 25 pmoles de cada iniciador, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1.5 mM de MgCl₂, 1X de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl) y 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (PROMEGA) y de 10-200 ng de ADN templado. Las condiciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca Thermohybridy fueron un ciclo de 1 min/94 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento por 30 s dependiendo de los iniciadores empleados (tabla 1), por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final de 10 min/72 °C. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis como se describe en el punto No. 8.7.

8.9. Detección de *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes*, y *E. coli* O157:H7 en carne inoculada artificialmente.

8.9.1. Activación de cepas, preparación de diluciones (UFC/mL) y cuenta viable.

Cada cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Typhimurium* (ATCC 13076) y *E. coli* O157:H7 (INDRE), se sembraron por separado en agar soya tripticasa (AST) y se incubaron a 35°C por 24 h. A cada crecimiento se adicionaron 3 mL de solución salina estéril (0.85 %), para cosechar las bacterias, mismas que fueron homogenizadas en vortex (MS1 Minishaker IKA® Works, Inc.) y de este homogenizado se tomó una alícuota para ajustar la suspensión bacteriana a 0.1 de absorbancia a 600 nm de λ . De esta suspensión anterior se realizaron diluciones decimales hasta 10^8 y de cada dilución se realizó una cuenta viable en placa. Se incubaron las placas a 35 °C/24 h para estimar el número aproximado de UFC/mL en cada dilución.

8.9.2. Inoculación de patógenos en muestras de carne

8.9.2.1. Inoculación de *S. Typhimurium* ATCC 13076

Se seleccionó carne de corte Top Sirloin, que por análisis microbiológico no presentara *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Las diluciones a inocular fueron 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} UFC/g de muestra (10^{-1} UFC/g equivale a 1 célula por cada 10 g de muestra).

En condiciones de esterilidad se pesaron 25 g de carne, se depositaron en una bolsa estéril con malla (Whirl Pak®) y se inocularon con 2.5 mL de las diluciones para tener concentraciones celulares finales de 10^5 a 10^{-1} UFC de *Salmonella*/g de muestra; el experimento se realizó por triplicado. Se agregaron 225 mL de agua peptonada tamponada (Difco). Se homogenizó en un “stomacher” (Labeasy, Technology L.E.D. Inc.) durante 75 s y se incubó a 35 °C/24 h. Posteriormente, de cada una de las muestras inoculadas con diferentes concentraciones, se tomó una alícuota de 3 mL, para centrifugar y la pastilla obtenida se trabajó como se describe en el punto No. 8.5 para la extracción de ADN. Se continuó con el análisis microbiológico para el aislamiento del patógeno de acuerdo a lo descrito en el punto 8.9.4.1.

8.9.2.2. Inoculación de *L. monocytogenes* ATCC 7644

Se trabajó de la misma manera que en el punto No. 8.2.1, pero el medio de preenriquecimiento fue el caldo de enriquecimiento de *Listeria* UVM modificado (Difco).

8.9.2.3. Inoculación de *E. coli* O157:H7 (INDRE) usando dos medios de preenriquecimiento

Se trabajó de la misma manera que en el punto No. 8.2.1., con la variante de los medios de cultivo para preenriquecimiento de este patógeno que incluyeron caldo soya tripticasa (CST) adicionado con cefsulodin (Sigma), cefixima (Denvar, Galderma) y vancomicina (Sigma) (CST + ccv), así como caldo *Escherichia coli* modificado con novobiocina (Difco) (ECm + n). Ambos se incubaron a 35 °C/24 h y posteriormente se extrajo una alícuota de 3 mL para realizar la extracción de ADN como se describe en el punto No 5.

8.9.2.4. Inoculación simultánea de *E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*

Para estos ensayos se utilizaron dos métodos de preenriquecimiento, caldo soya tripticasa (CST) y caldo infusión cerebro corazón (ICC). Se trabajó de la misma manera que en el punto No. 8.2.1 inoculando cada muestra de carne con *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp en proporciones 1:1 de cada dilución de 10^2 a 10^{-1} UFC/g. Ambos medios de cultivo se incubaron a 35 °C/24 h y posteriormente se procedió a tomar alícuotas de 3 mL para extracción de ADN como se describe en el punto 8.5.

8.9.3. PCR en muestras de carne inoculada artificialmente

8.9.3.1. PCR para la detección de *Salmonella* sp o *L. monocytogenes* en muestras de carne inoculadas artificialmente

Las reacciones de PCR para cada uno de los patógenos se llevaron a cabo por separado en un termociclador marca MJ. Research. Las mismas condiciones de PCR y los iniciadores correspondientes a cada patógeno se describen en la tabla 1 del punto número 8.8.

8.9.3.2. PCR para la detección de *E. coli* O157:H7 en muestras de carne inoculadas artificialmente

Para la detección de este microorganismo se diseñaron 2 ensayos de PCR multiplex, los cuales se llevaron a cabo en un termociclador marca PCR Express-Thermo Hybaid.

- a. PCR multiplex para serotipos: En este ensayo se utilizaron los iniciadores O157-AF, O157-AR, H7-F y H7-R (ver tabla 1 del punto 8.6). Las condiciones de las reacciones de PCR fueron las establecidas en el punto número 8.8., con una temperatura de alineamiento de 62 °C.
- b. PCR multiplex para factores de virulencia. Se utilizaron los iniciadores VT1-A y VT1-B, VT2-Am y VT2-Bm, AE-19 y AE-20 (ver tabla 1 del punto 8.6). Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µL, utilizando 25 pmoles de los iniciadores (VT1-A, VT1-B, AE-19 y AE-20) y 37.5 pmoles de los iniciadores VT2-Am y VT2-Bm, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1.5 mM de MgCl₂, 1X de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (PROMEGA) y de 10-200 ng de ADN templado. Las condiciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca Thermo Hybaid cuyas condiciones correspondieron un ciclo 1 min/94 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento por 30 s a 58 °C y una extensión a 72 °C por 75 s, con una extensión final de 10 min/72 °C. La electroforesis de los productos de PCR se realizó como se describe en el punto No. 8.7.

8.9.3.3. Detección simultánea de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7

Se utilizaron los iniciadores 287 a y b para *Salmonella* y los de serotipo O157-AF y O157-AR, así como H7-F y R para *E. coli*. Las condiciones fueron llevadas a cabo en volúmenes de 25 µL de la misma forma que en el punto No. 8.8., y con una temperatura de alineamiento de 58 °C. La electroforesis de los productos de PCR se realizó de acuerdo a lo establecido en el punto No. 8.7.

8.9.4. Análisis microbiológico tradicional para el aislamiento de patógenos en muestras de carne

8.9.4.1. Aislamiento de *Salmonella* spp

- a. Preenriquecimiento no selectivo. Se pesaron asépticamente 25 g de la muestra de carne en una bolsa estéril con malla (Whirl Pak®) y se agregaron 225 mL de agua peptonada tamponada (Difco) para su homogenización por 1 minuto en un homogeneizador peristáltico (Labeasy, Technology L.E.D. Inc.). La solución obtenida se incubó durante 24 h a 35 °C.

Nota: En este paso se colectaron 3 mL del cultivo en agua peptonada tamponada de 24 h para utilizarlo en la extracción de ADN y los ensayos de PCR.

- b. Enriquecimiento Selectivo. A partir del agua peptonada tamponada, se tomó una alícuota de 0.5 mL para transferirla a un tubo con 10 mL de caldo tetrionato (Difco) suplementado con 0.2 mL de solución yodo-yoduro y otra de 0.1 mL para transferirlo a un tubo con 10 mL de caldo Rappaport-Vasiliadis R10 (Difco). Ambos tubos se incubaron a 35 °C /24 h.
- c. Aislamiento Selectivo. De cada tubo empleado para enriquecimiento selectivo, se tomó una asada para sembrarlos en medios de aislamientos selectivos como agar de hierro lisina doble modificado (DMLIA) (Dibico), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (Difco), agar enterico de Hektoen (HE) (Difco), agar verde brillante con sulfadiazina (BGS) (BBL™, Becton Dickinson France S.A.) y agar salmonella y shigella (SS) (Difco). Estos medios de cultivo se sembraron por estría en cuatro cuadrantes y se incubaron a 35 °C/24 h. Las colonias que presentaron características morfológicas típicas, de acuerdo a las mencionadas en la tabla 2, se resemebraron en AST para su posterior identificación.

Tabla 2

Características de morfología colonial para *Salmonella* spp

Medio de Cultivo	Morfología colonial de <i>Salmonella</i> sp.
DMLIA	Colonias pequeñas con centro negro y periferia transparente. <i>S. Typhi</i> . Colonia pequeña transparente
XLD	Del mismo color que el medio de cultivo, transparente, en ocasiones con centro negro <i>S. Typhi</i> . Anaranjadas, ligeramente opacas
HE	Colonias verde-azules con o sin centro negro
BGS	Colonias rojo-rosado con halo rojo
SS	Colonias incoloras con o sin centro negro

d. Identificación

Tinción de Gram.

Se realizó para confirmar la morfología y el gram de las células vegetativas que conformaron las colonias seleccionadas para identificar. Para ello se tomó una asada de la colonia misma que se depositó sobre una gota de agua bidestilada previamente colocada en un portaobjetos, se suspendió el inóculo en la gota y se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente fijar al calor; se tiñó con cristal violeta durante 1 min para después lavar con agua corriente, se dejó secar a temperatura ambiente para agregar el mordiente por 1 min, se lavó con agua corriente nuevamente, se decoloró con alcohol-acetona, y se agregó safranina como colorante de contraste durante 30 s, se dejó secar para realizar la observación microscópica.

Sistemas bioquímicos y antisueros.

Las colonias cuya clona resultó con morfología bacilar y que reaccionaron negativamente al gram se identificaron mediante sistema API 20 E (bioMérieux Marcy l'Etoile France) según especificaciones técnicas del fabricante y se aglutinaron con el antisuero para *Salmonella* O poly A-I & Vi (Difco) según metodología del fabricante.



Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de *Salmonella* sp

8.9.4.2. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

- a. Enriquecimiento selectivo primario. Se obtuvieron 25 g de carne y se colocaron en bolsa estéril con malla (Whirl Pak®). Se agregaron 225 mL de caldo de enriquecimiento de *Listeria* UVM modificado (Difco), se homogeneizaron e incubaron a 35°C por 24 h.

Nota: En este punto y después del período de incubación, también se separó una alícuota de 3 mL de caldo de enriquecimiento de *Listeria* UVM modificado (Difco), para extracción de ADN y PCR.

- b. Enriquecimiento selectivo secundario. Se tomó 1 mL del enriquecimiento selectivo primario para inocular 10 mL de caldo Fraser (Difco), previamente complementado con 0.1 mL de suplemento Fraser (Difco) y se incubó a 35 °C por 48 h.
- c. Aislamiento selectivo.-Los tubos de caldo Fraser que presentaron enegrecimiento se consideraron presuntivos para la presencia del microorganismo por lo que se tomó una alícuota después de haber agitado el tubo y se depositó en la superficie de placas con agar OXA (Difco) suplementado para siembra en cuatro cuadrantes. Las placas se incubaron a 35 °C/48 h.
- d. Identificación.- Se seleccionaron colonias típicas, que en medio Oxford (OXA) son de diámetro de 1-2 mm, negras y rodeadas de un halo negro, o con un tono café oscuro. Para llevar a cabo la identificación, de las colonias que presentaron estas características se seleccionaron 5 o más de ellas y se sembraron en placas de agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura (ASTEL) para descartar flora competitiva parcialmente inhibida. Se incubó por 24 h a 35 °C. Las colonias de este medio de cultivo se aislaron en 2 mL de CSTEL, posteriormente se incubó a 35 °C durante 24 h. A partir de este cultivo, se llevó a cabo la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas (a excepción de la movilidad, todas las pruebas bioquímicas se incubaron a 35 °C/48 h).

Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram a los cultivos de 24 y 48 h como se describe en 8.9.4.1. d).

Prueba de reducción de nitratos

Se inocularon tubos de caldo nitrado y se incubaron a 35 °C por 5 días; los nitratos fueron revelados con la adición de 3 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de solución de dimetil- α -naftilamina, que daba lugar al desarrollo de un color rojo en caso de que la prueba fuera positiva. Si esta coloración no se observa, se adiciona zinc en polvo, y el desarrollo de color rojo confirma una prueba negativa. *L. monocytogenes* es positiva para esta prueba.

Prueba de utilización de carbohidratos

Se observa la producción de ácido a partir de manitol, xilosa y ramnosa al usar púrpura de bromocresol como indicador en el medio de cultivo. Los tubos inoculados se incubaron por 24 h a 35 °C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. *L. monocytogenes* es positiva solo para ramnosa.

Prueba de movilidad en medio de cultivo SIM

Los tubos inoculados se incubaron a 20-25 °C por 24 h. La positividad de esta prueba se observa por un crecimiento típico en forma de pino invertido. Todas las especies del género *Listeria* son positivas para esta prueba.

Prueba de hemólisis.

Sobre una caja de agar sangre se estrió en cuatro cuadrantes un cultivo puro de nuestras colonias sospechosas. Se incubó a 35 °C/24 h. La positividad de la producción de β -hemólisis en agar sangre de carnero se caracteriza por la producción de zonas claras en el agar alrededor de la colonia. Esta prueba es positiva para *L. monocytogenes*.

Prueba de la catalasa

Se emulsificó un cultivo puro de la colonia sospechosa con una gota de solución de peróxido al 3 % colocada sobre un portaobjetos. La prueba se consideró positiva al detectarse la efervescencia en la suspensión.

Confirmación con API Listeria (bioMérieux Marcy l'Etoile France)

Este análisis se realizó a partir de un cultivo puro de la cepa problema y según las especificaciones del fabricante.

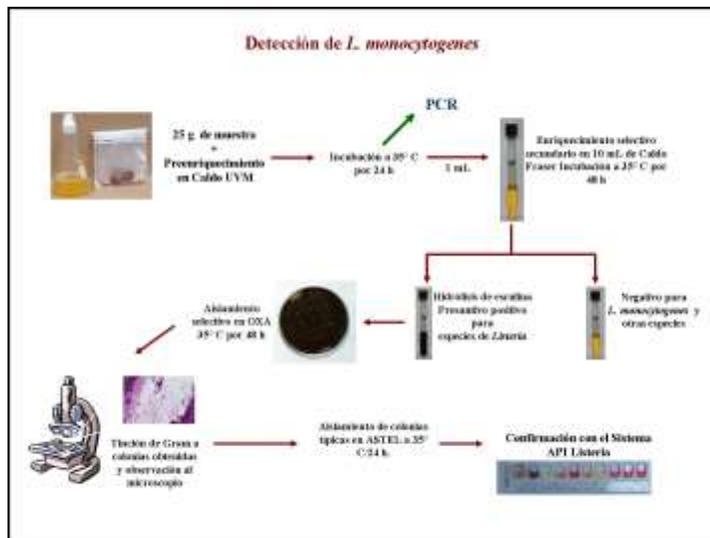


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de *L. monocytogenes* y otras especies.

8.9.4.3. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Enriquecimiento. En una bolsa estéril se homogeneizaron 25 g de la muestra con 225 mL de caldo soya tripticaseína complementado con Cefsulodín (Sigma), Cefixima (Denvar, Galderma) y Vancomicina (Sigma) a concentraciones de 10 mg/l, 0.05 mg/l y 8 mg/l respectivamente (CST + ccv). Este mismo protocolo fue seguido pero empleando el caldo EC modificado con Novobiocina 0.02 g/l (ECm +n). Ambas muestras homogeneizaron para incubar a 35 °C/18-24 h.

Nota: En este paso se toman 3 mL de los medios de preenriquecimiento de CST + ccv, y ECm + n para realizar los ensayos de PCR.

- a. Aislamiento Selectivo. Se tomó 1 mL del caldo de enriquecimiento, previamente agitado, para realizar 3 diluciones decimales del mismo, de cada dilución se tomó una alícuota que se depositó en la superficie de placas de agar McConkey Sorbitol (Difco) suplementado con 0.05 mg/l de cefixima (Denvar) y 2.5 mg/l de telurito de potasio (Sigma) (CT-SMAC), el inóculo se dispersó en cuatro cuadrantes sobre la superficie del medio mismo que se incubó a 35 °C/ 24 h.
- b. Aislamiento Selectivo Secundario. Se realizó por selección de 5 o más colonias incoloras (sorbitol negativas) en el agar CT-SMAC que fueron inoculadas por estría en cuatro cuadrantes en agar Fluorocult^{MR} *E. coli* O157:H7 (Merck) para determinar la actividad de β -glucuronidasa por su acción sobre el MUG (4 Metil umbeliferil B-D- glucuronido). Las placas se incubaron a 35 °C/24 h y una vez concluido este período se visualizaron las colonias desarrolladas con una lámpara de luz UV (Mineralight^R Lamp. Modelo UVGL-25, UVP, Upland CA, USA) en onda corta 254 nm. Las colonias de tonalidad verde (sorbitol negativas) que no presentaban fluorescencia o MUG negativas (β glucuronidasa negativas) se seleccionaron para su identificación.
- c. Identificación
Tinción de Gram
Se realizó para confirmar que los microorganismos aislados fueran bacilos gramnegativos. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó la metodología ya mencionada en 8.9.4.1. d).

Antisueros y Sistema Bioquímico

Colonias que presentaron estas características se sembraron a un tubo de AST (Difco) y se incubaron durante 24 h a 35 °C para después realizar la aglutinación con antisueros O157 (Difco) y H7 (Difco), además del Sistema API 20E (bioMérieux Marcy l'Etoile France), siguiendo las instrucciones del fabricante para cada uno de ellos.

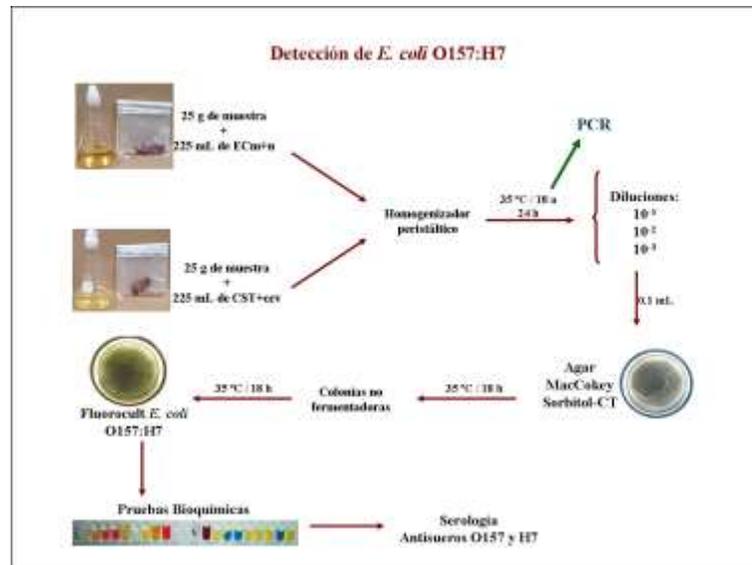


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada en el aislamiento de *E. coli* O157:H7

8.10. Análisis microbiológico tradicional y PCR para la detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7 en muestras de campo remitidas al Laboratorio Central Regional de Monterrey del CFPPNL

8.10.1. Análisis microbiológico tradicional para la detección de patógenos en muestras de campo

La metodología utilizada para este punto es la misma que la que se realizó en las muestras inoculadas y descrita en punto 8.9.4.

8.10.2. Extracción de ADN y PCR para *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en muestras de campo

Se siguió el mismo protocolo mencionado en 8.5 y 8.9.3., se realizaron reacciones de PCR para *Salmonella*, *L. monocytogenes*, PCR multiplex para serotipos de *E. coli* O157:H7, PCR multiplex para factores de virulencia de *E. coli* O157:H7 (estos dos últimos utilizando como preenriquecimiento el caldo ECm + n) y PCR multiplex para la detección simultánea de *Salmonella* y serotipos de *E. coli* O157:H7 (este último utilizando como preenriquecimiento el caldo ICC).

8.11. Análisis estadístico

8.11.1. Muestras inoculadas

La comparación del análisis microbiológico y la PCR se realizó de manera indirecta comparando sus respectivos índices Kappa los cuales se obtuvieron con la ayuda de una tabla de contingencia (Tabla 3) de dos por dos en donde se obtiene la concordancia entre los resultados del método aplicado (resultados del método microbiológico o PCR) con

respecto a las muestras inoculadas independientemente de la concentración del patógeno en las mismas (referencia; muestras inoculadas), incluyendo los controles negativos.

Tabla 3

Tabla de contigencia para el análisis de muestras inoculadas

		Resultados del método	
		+	-
Referencia Muestras inoculadas	+	a Verdadero positivo	b Falso negativo
	-	c Falso positivo	d Verdadero negativo

La fórmula aplicada para obtener el índice kappa correspondió a:

$$\text{Índice Kappa} = \frac{2(ad - bc)}{(a + c)(c + d) + (a + b)(b + d)}; \text{ En donde:}$$

Significado de los valores Kappa (Malorny, B., *et al*, 2003):

< 0.01 no concordancia

0.1 a 0.4 débil concordancia

0.41 a 0.60 clara concordancia

0.61 a 0.80 fuerte concordancia

0.81 a 1.00 casi completa concordancia.

8.11.2. Muestras de campo

Con respecto a las muestras de campo, se realizó una comparación entre el método tradicional y la PCR para *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. En este caso, las formulas aplicadas en las que se basó el análisis fueron las publicadas por Malorny, B., *et al.*, en 2003.

Tabla 4

Tabla de contingencia para el análisis de muestras de campo

		PCR	
		+	-
Microbiológico	+	a	b
	-	c	D

Sensibilidad relativa (%) = 100 x (a / a +b)

Especificidad Relativa (%) = 100 x (d / d + c)

Precisión Relativa (%) = 100 x (a + d /a + b +c +d)

$$\text{Indice Kappa} = \frac{2(ad - bc)}{(a + c)(c + d) + (a + b)(b + d)}$$

Malorny, B., *et al.*, en 2003, marca que la sensibilidad relativa es la capacidad del método alternativo (PCR) para detectar el analito comparado con el método de referencia (Método tradicional de cultivo). Por otro lado, la especificidad relativa es la capacidad de la PCR de no detectar al organismo blanco cuando este no es detectado por el método de referencia. La precisión relativa es el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método alternativo y el método de referencia en muestras idénticas. Los índices Kappa obtenidos nos da la concordancia entre los resultados del método alternativo (PCR) con respecto al método de referencia (Método tradicional microbiológico).

9. RESULTADOS

9.1. Selección de iniciadores

Se realizó después de la búsqueda de diversos iniciadores tomando en cuenta que fueran los más adecuados para la amplificación de productos específicos para cada patógeno (ver tabla 5). Se seleccionaron un par de iniciadores para *Salmonella* sp, uno para *L. monocytogenes* y cinco para *E. coli* O157:H7. A cada par de iniciadores se les realizó simulaciones de PCR en el programa Amplify 1.2 (ver figuras 4 a 10).

Tabla 5

Iniciadores, gen al que van dirigidos, tamaño del fragmento y referencia para cada uno de los patógenos en estudio.

Patógeno	Gen	Iniciadores	Secuencia	Fragmento	Referencia
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	139 141	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	287 pb	Rahn, K., <i>et al.</i> , 1992
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	420-A 420-B	CATCGACGGCAACCTCGGAGA ATCAATTACCGTTCTCCACCATT	420 pb	Fitter, S., <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stx1</i>	VT1-A VT1-B	CGCTGAATGTCATTGCTCTGC CGTGGTATAGCTACTGTCACC	302 pb	Blanco, M., <i>et al.</i> , 2003
	<i>stx2</i>	VT2-Am VT2-Bm	CTTCGGTATCCTATTCCC* CTGCTGTGACAGTGACAAAACG*	518 pb	Blanco, M., <i>et al.</i> , 2003*
	<i>eaeA</i>	AE-19 AE-20	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	1087 pb	Gannon, V.P., <i>et al.</i> , 1993
	<i>rfbE</i>	O157-AF O157-AR	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG CATTGGCATCGTGTGGACAG	497 pb	Desmarchelier, P.M., <i>et al.</i> , 1998
	<i>fliC</i>	H7-F H7-R	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625 pb	Gannon, V.P., <i>et al.</i> , 1997

* Estos iniciadores fueron basados en los reportados por Blanco, M., *et al.*, 2003, solo que al iniciadores VT2-A se eliminaron los últimos 2 nucleótidos y al VT2-B se eliminó el nucleótido final en las regiones 3'

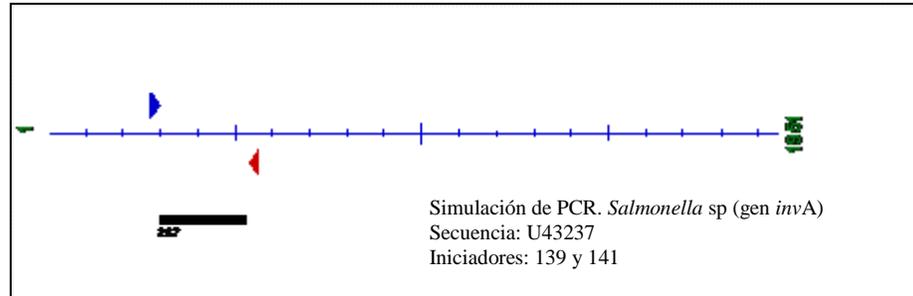


Figura 4. Simulación de PCR utilizando los iniciadores 139 y 141. La línea azul representa la secuencia U43237 del gen *invA* de *Salmonella*. El triángulo azul es el iniciador 139; el triángulo rojo es el iniciador 141; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

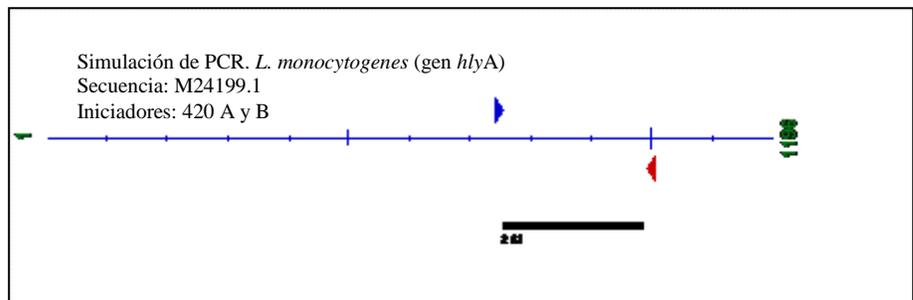


Figura 5. Simulación de PCR utilizando los iniciadores 420 A y 420 B. La línea azul representa la secuencia M24199.1 del gen *hlyA* de *L. monocytogenes*. El triángulo azul es el iniciador 420 A; el triángulo rojo es el iniciador 420 B; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

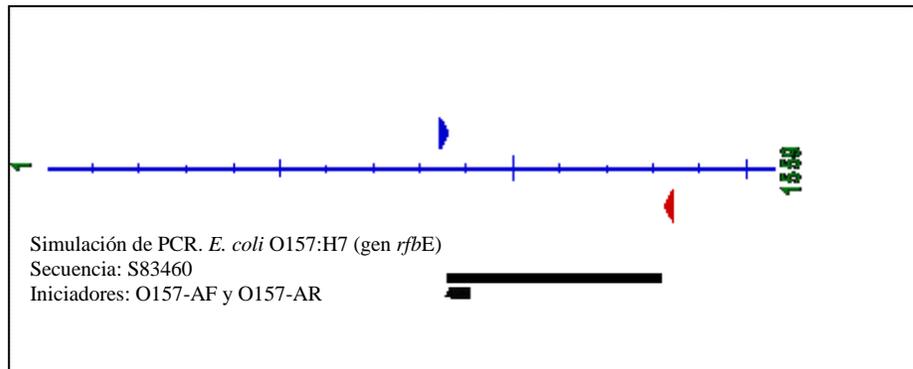


Figura 6. Simulación de PCR utilizando los iniciadores O157-AF y O157-AR. La línea azul representa la secuencia S83460 del gen *rfbE* de *E. coli* O157:H7. El triángulo azul es el iniciador O157-AF; el triángulo rojo es el iniciador O157-AR; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

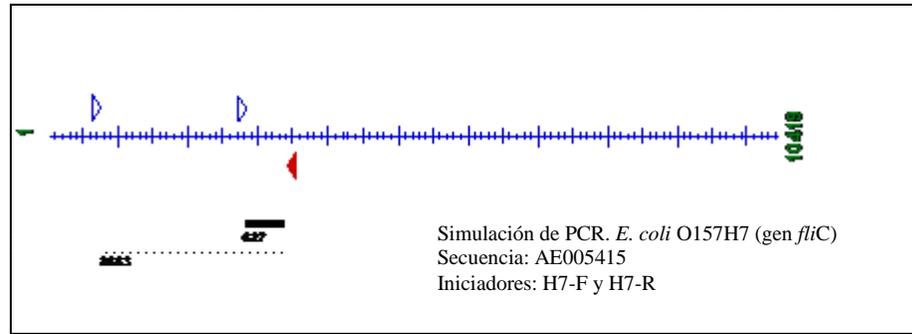


Figura 7. Simulación de PCR utilizando los iniciadores H7-F y H7-F. La línea azul representa la secuencia AE005415 del gen *fliC* de *E. coli* O157:H7. El triángulo azul es el iniciador H7-F; el triángulo rojo es el iniciador H7-R; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

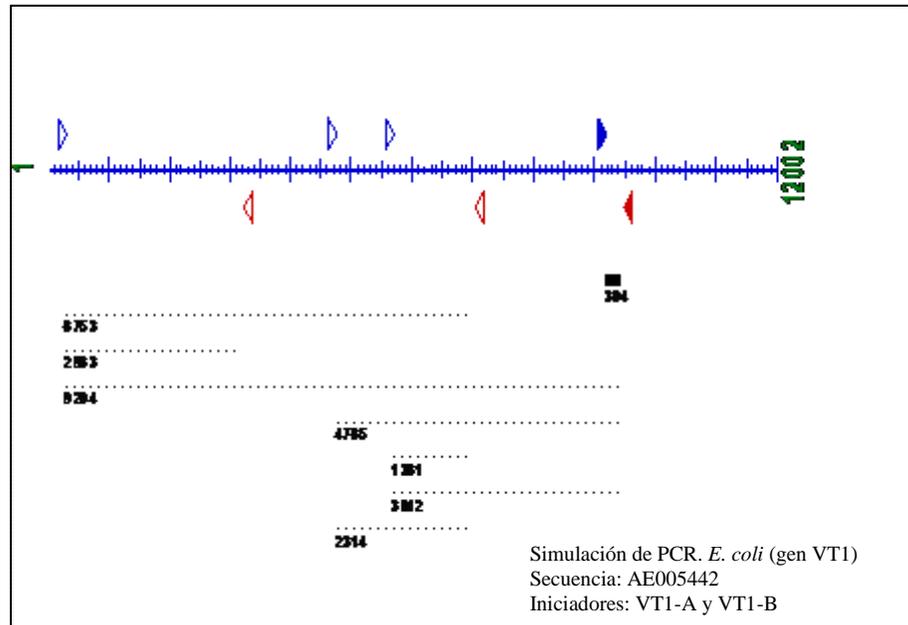


Figura 8. Simulación de PCR utilizando los iniciadores VT1-A y VT1-B. La línea azul representa la secuencia AE005442 del gen VT1 de *E. coli* O157:H7. El triángulo azul es el iniciador VT1-A; el triángulo rojo es el iniciador VT1-B; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

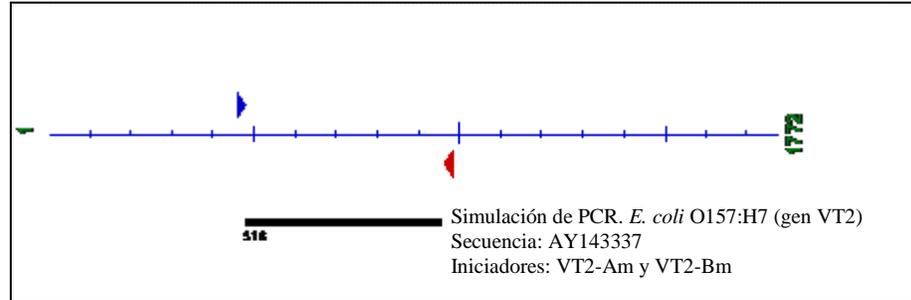


Figura 9. Simulación de PCR utilizando los iniciadores VT2-Am y VT2-Bm. La línea azul representa la secuencia AY143337 del gen VT2 de *E. coli* O157:H7. El triángulo azul es el iniciador VT2-Am; el triángulo rojo es el iniciador VT2-Bm; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

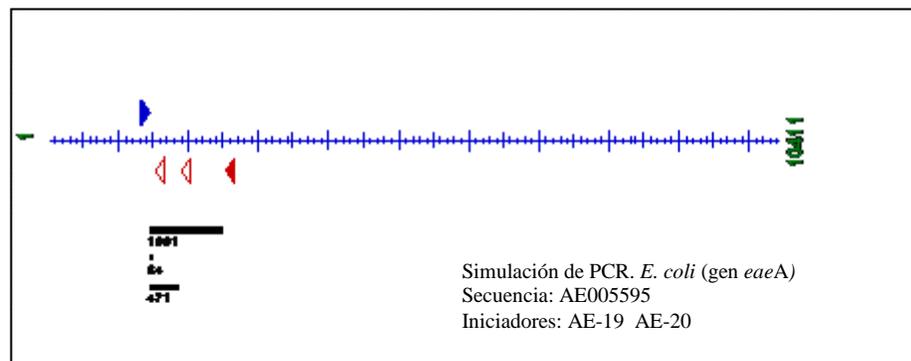


Figura 10. Simulación de PCR utilizando los iniciadores AE-19 y AE-20. La línea azul representa la secuencia AE005595 del gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7. El triángulo azul es el iniciador AE-19; el triángulo rojo es el iniciador AE-20; la barra negra representa el fragmento amplificado en pb.

9.2. Estandarización de la PCR en cepas de referencia:

Se establecieron las condiciones de amplificación para cada uno de los patógenos, determinando las condiciones óptimas para cada uno de los pares de iniciadores utilizados en el proyecto.

Para obtener las condiciones de amplificación más adecuadas, se optó por realizar extracciones de ADN a partir de cepas previamente tipificadas de *S. Typhimurium* (ATCC 13076), *L. monocytogenes* (ATCC 7644) y *E. coli* O157:H7 (INDRE). El método de extracción de elección fue el CTAB por haber sido más eficiente con respecto al de fenol-cloroformo en nuestros primeros ensayos (datos no mostrados).

Posterior a esto, se procedió a realizar la estandarización de las condiciones de PCR. Esto se hizo a través de diversos gradientes de temperatura (ver figura 11), concentración de $MgCl_2$ e iniciadores, concluyendo que las condiciones óptimas para cada uno de los PCR simples fue como sigue: 1 ciclo (1 min a 95 °C), 35 ciclos de (30 s, 95 °C, 30 s, temperatura de alineamiento específico para cada par de iniciadores, 30 s 72 °C) y por último, 1 ciclo de 10 min a 72 °C. Las reacciones de PCR se realizaron en

volúmenes de 25 μ L, utilizando 25 pmoles de cada iniciador, 200 μ M de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1.5 mM de $MgCl_2$, 1X de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (PROMEGA) y de 10-200 ng de ADN templado.

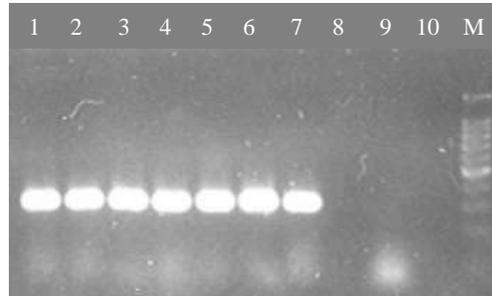


Figura 11. Gradiente de temperatura para *Salmonella*. Iniciadores 139 y 141. Carril 1 a 7, productos de PCR generados en diferentes temperaturas de alineamiento: 55, 56.1, 56.7, 58.3, 59.1, 60.0 y 61.1 $^{\circ}C$, respectivamente; carril 8 y 10, vacíos; carril 9, control negativo; M, marcador 100 ladder.

Las condiciones de temperatura de alineamiento para lograr las ampliaciones mediante PCR de cada par de iniciadores se presentaron en la tabla 6. En la figura 12 se pueden observar los productos de dichas ampliaciones a partir de controles positivos.

Tabla 6

Condiciones de alineamiento para cada par de iniciadores utilizados

Patógeno	Iniciadores	Fragmento	T $^{\circ}$ de alineamiento
<i>Salmonella</i>	139 141	287 pb	58 $^{\circ}C$
<i>L. monocytogenes</i>	420-A 420-B	420 pb	58 $^{\circ}C$
<i>E. coli</i> O157:H7	VT1-A VT1-B	302 pb	58 $^{\circ}C$
	VT2-Am VT2-Bm	518 pb	58 $^{\circ}C$
	AE-19 AE-20	1087 pb	58 $^{\circ}C$
	O157-AF O157-AR	497 pb	58 $^{\circ}C$
	H7-F H7-R	625 pb	60 $^{\circ}C$

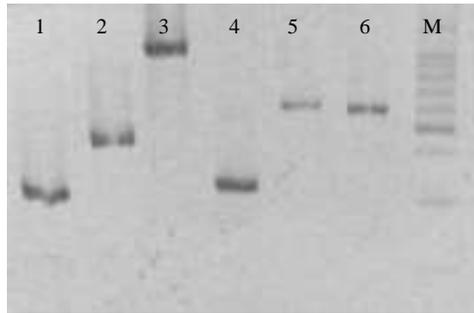


Figura 12. Productos de amplificaciones de controles positivos: carril 1, iniciadores 139 y 141 para *Salmonella*; carril 2, iniciadores 420 a y b para *L. monocytogenes*; carril 3 a 6, amplificaciones de *eae*, VT1, VT2 y O157 respectivamente para *E. coli* O157:H7; M, marcador 100 ladder.

Posteriormente, se realizó para *E. coli* O157:H7 ensayos multiplex para eficientizar la técnica de PCR, amplificando los productos en dos reacciones:

- a. **PCR multiplex para Serotipo:** Se amplificaron fragmentos de los genes que codifican para el serotipo O157 y H7, (gen *rfbE* y *fliC*, respectivamente), generándose productos de 497 y 625 pb (ver figura 13). Las condiciones fueron iguales que con la PCR simple, solo que agregando los 4 iniciadores a la mezcla de reacción.
- b. **PCR multiplex para Factores de Virulencia:** Se amplificaron los fragmentos de los genes de las SLT-I y II y el gen de la intimina (*eaeA*), generándose productos de 302, 518 y 1087 respectivamente (ver figura 14); para realizar esta PCR se utilizó una mezcla de reacción diferente con el fin de eficientizar la técnica la cual se elaboró en volúmenes de 25 μ L, utilizando 25 pmoles de los iniciadores VT1-A, VT1-B, EA19 y EA20; y 30 pmoles de VT2-A VT2-B; 200 μ M de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1.5 mM de $MgCl_2$, 1X de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl) y 2.5 unidades de la enzima Taq-DNA polimerasa (PROMEGA) y de 10-200 ng de ADN templado con 1 ciclo (1 min a 95 $^{\circ}$ C), 35 ciclos de (30 s 95 $^{\circ}$ C, 30 s-59 $^{\circ}$ C, 75 s 72 $^{\circ}$ C) y por último, 1 ciclo de 10 min a 72 $^{\circ}$ C.

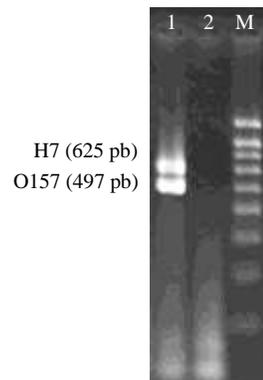


Figura 13. PCR Multiplex de Serotipos para *E. coli* O157:H7. Carril 1, PCR ADN de cepa de *E. coli* O157:H7 con amplificaciones de *rfbE* (497 pb) y *fliC* (625 pb); carril 2, control negativo; M, marcador 100 ladder.

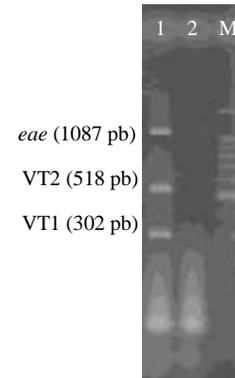


Figura 14. PCR Multiplex de Factores de Virulencia para *E. coli* O157:H7. Carril 1, PCR ADN de *E. coli* O157:H7 con amplificaciones de los genes *eae* (1087 pb), VT1 (302 pb) y VT2 (518 pb); carril 2, control negativo; M, marcador 100 ladder.

Además se realizó un ensayo de PCR donde se detectó a *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, combinando los iniciadores para *Salmonella* (139 y 141) y los iniciadores para amplificar el serotipo (O157-AF y O157-AR; H7-R y H7-R), en donde se generaron los productos antes mencionados de *Salmonella* (287 pb), para el serotipo O157 (497 pb) y para el serotipo H7 (625 pb), estos últimos dos de *E. coli*. Las condiciones fueron iguales que con la PCR simple, solo que agregando los seis iniciadores a la mezcla de reacción y utilizando como templado a ADN de los 2 microorganismos.

9.3. Pruebas de Especificidad

Se realizó con el ADN de microorganismos caracterizados bioquímicamente. Se tomó en cuenta la morfología colonial en medios diferenciales, tinción de Gram, crecimiento en medios selectivos como TSI, LIA, pruebas de movilidad, indol, ornitina, utilización de citratos, reducción de nitratos, hemólisis, prueba de rojo de metilo, degradación de la urea, fermentación de azúcares, prueba de coagulasa, prueba de la termonucleasa, oxidasa, catalasa, antisueros, así como API 20E y API *Listeria*. Se observó que no se generaron falsos positivos ni tampoco se visualizaron productos inespecíficos como se demuestra en la siguiente tabla 7.

Tabla 7

Resultados de las pruebas de especificidad de los iniciadores seleccionados con diferentes templados de ADN

Cepa	Origen	Iniciadores						
		<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7				
		139 y 141	420(a y B)	O157(AF y AR)	H7(F y R)	VT1 (A y B)	VT2 (A y B)	EA19 y EA20
<i>S. Typhimurium</i>	13076	+ ¹	- ²	-	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	14028	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (Gpo D)	13076	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. Paratyphi</i> (Gpo A)	9150	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. Typhi</i>	CDC-99	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	7644	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	INDRE	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 CDC	IPN	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. seeligerii</i>	35967	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	Cepa silvestre	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	Cepa silvestre	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6538P	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	12228	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	4350	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	Lab. UANL	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	6633	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	11778	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	9341*	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. equi</i>	6939	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	13315	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	25931	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumonie</i>	13883	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	27853	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	Lab. UANL	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	13048	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp	Lab. UANL	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	Lab. UANL	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. abortus</i> S19	CFPPNL	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i> AN5	CFPPNL	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	Lab. UANL	-	-	-	-	-	-	-

¹ El signo (+) indica un resultado positivo a la prueba

² El signo (-) indica un resultado negativo a la prueba

9.4. Estandarización de la PCR en muestras artificialmente inoculadas

9.4.1. *Salmonella* spp

Para las inoculaciones de este patógeno se utñizaron de 10^5 a 0.1 UFC/g de carne en 25 g de muestra, se realizaron tres ensayos con tres repeticiones cada uno, encontrando que no existe diferencia entre los resultados de ambos métodos ya que se logró detectar a este microorganismo hasta en 0.1 UFC/g de carne por PCR y por análisis microbiológico. En la tabla 8 se observan los resultados de PCR y análisis microbiológico para cada concentración de patógeno inoculado. En la figura 15 se visualizan los resultados de PCR para *Salmonella* spp en cada una de las concentraciones de este patógeno.

Tabla 8

Resultados de la inoculación de *S. Typhimurium* por análisis microbiológico y por PCR

UFC/g de carne	PCR	Microbiológico
10^5	9/9 ^a	9/9
10^4	9/9	9/9
10^3	9/9	9/9
10^2	9/9	9/9
10^1	9/9	9/9
10^0	9/9	9/9
10^{-1}	9/9	9/9

^a. 9 resultados positivos de 9 resultados totales (se realizaron 3 ensayos independientes con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 resultados)

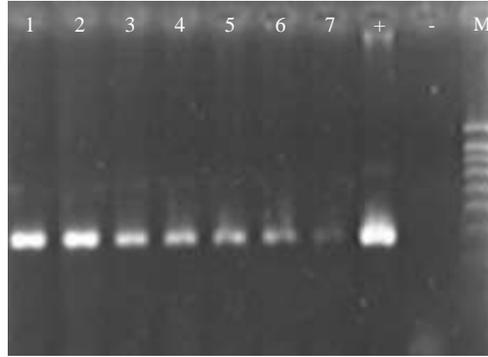


Figura 15. Inoculación de *Salmonella* Typhimurium. Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10^5 a 10^{-1} UFC de *S. Typhimurium* por g de carne; carril 8, control positivo, cepa de *S. Typhimurium* ATCC 13076; carril 9, control Negativo; M, marcador 100 ladder.

9.4.2. *L. monocytogenes*

Para este patógeno, se realizaron 3 ensayos con tres replicas, las cantidades de células inoculadas fueron 10^5 a 0.1 UFC/g de carne en 25 g de muestra, los resultados fueron similares a los obtenidos para *Salmonella*. En la tabla 9 se observan los resultados de PCR y análisis microbiológico para cada concentración de patógeno inoculado. En la figura 16 se visualizan los resultados de PCR para *L. monocytogenes* en cada una de las concentraciones de este patógeno en muestras inoculadas artificialmente.

Tabla 9

Resultados de la inoculación de *L. monocytogenes* por análisis microbiológico y por PCR

UFC/g de carne	PCR	Microbiológico
10^5	9/9 ^a	9/9
10^4	9/9	9/9
10^3	9/9	9/9
10^2	9/9	9/9
10^1	9/9	9/9
10^0	9/9	9/9
10^{-1}	9/9	9/9

^a. 9 resultados positivos de 9 resultados totales (se realizaron 3 ensayos independientes con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 resultados)

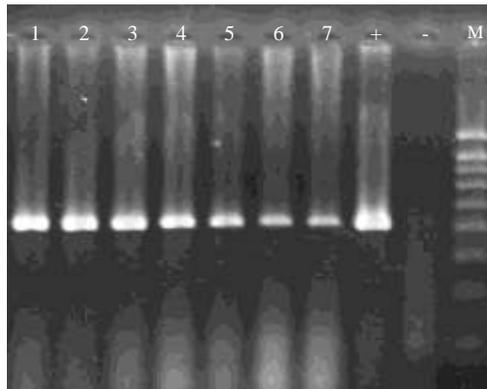


Figura 16. Inoculación de *L. monocytogenes*. Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10^5 a 10^{-1} UFC de *L. monocytogenes* por g de carne; carril 8, control positivo, cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644; carril 9, control Negativo; M, marcador 100 ladder.

9.4.3. *E. coli* O157:H7

Para este patógeno, también se realizaron tres inoculaciones con tres replicas, pero se diseñaron dos ensayos de PCR, el primero que amplifica a los genes que nos dan el serotipo O157:H7 y el segundo ensayo amplifica factores de virulencia (intimina y verotoxina 1 y 2). Se aplicaron dos medios de preenriquecimiento y a ambos se les realizó la PCR y análisis microbiológico. Los ensayos realizados con CST+ccv arrojaron resultados positivos hasta la concentración de 10^0 UFC/g en solo 4 de las 9 repeticiones, en el caso del ensayo de PCR para factores de virulencia se detectó la misma cantidad de resultados positivos en las amplificaciones de VT1 y VT2, sin embargo en las amplificaciones del fragmento del gen de la intimina solo 2 de las 9 repeticiones fueron positivas cuando se inoculó esta concentración de *E. coli* O157:H7. Por otro lado, cuando se realizaron los ensayos de serotipos se detectaron para O157 y H7 9 de las 9 repeticiones de la misma concentración. Cuando se inocularon concentraciones superiores de este patógeno (muestras inoculadas de 10^1 a 10^5 UFC/g), tanto los ensayos de PCR (serotipos y factores de virulencia), como el ensayo microbiológico fueron positivos. Cuando las muestras fueron inoculadas con 0.1 UFC/g, ninguno de los métodos detectó a este patógeno (0 de 9 repeticiones). En la tabla 10 se observan los resultados de PCR y análisis microbiológico con enriquecimiento de CST+ccv y en las figuras 17 y 19 se muestran los resultados de factores de virulencia y serotipos respectivamente, con amplificaciones de muestras inoculadas con las diferentes concentraciones de *E. coli* O157:H7.

Tabla 10

Resultados de preenriquecimiento con CST con cefsulodin, cefixima y vancomicina

UFC/g de carne	PCR (Serotipos)		PCR (Factores de Virulencia)			Microbiológico
	O157	H7	VT1	VT2	<i>eae</i>	
10^5	9/9 ^a	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^4	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^3	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^2	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^1	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^0	9/9	9/9	4/9	4/9	2/9	4/9
10^{-1}	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9

Resultados de la inoculación de *E. coli* O157:H7 por análisis microbiológico y por PCR.

^a. 9 resultados positivos de 9 resultados totales (se realizaron 3 ensayos independientes con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 resultados)

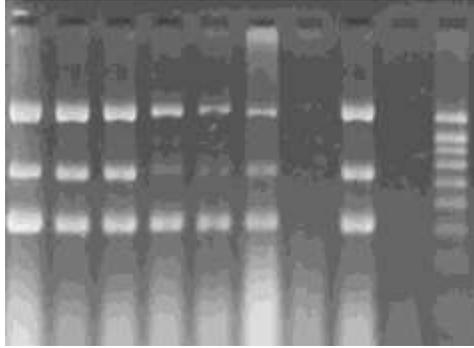


Figura 17. Inoculación de *E. coli* O157:H7. PCR multiplex de Factores de Virulencia (*eae*, VT1 y VT2). Preenriquecimiento en CST+ccv. Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10^5 a 10^{-1} UFC de *E. coli* O157:H7 por g de carne; carril 8; control positivo, ADN de *E. coli* O157:H7; carril 9, control negativo; M, marcador 100 ladder.

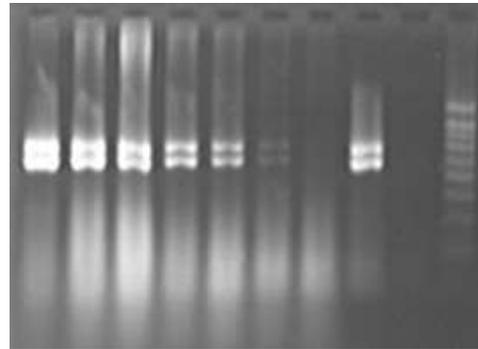


Figura 18. Inoculación de *E. coli* O157:H7. PCR multiplex de Serotipos (O157 y H7). Preenriquecimiento en CST+ccv. Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10^5 a 10^{-1} UFC de *E. coli* O157:H7 por g de carne; carril 8, control positivo, ADN de *E. coli* O157:H7; carril 9, control negativo; M, marcador 100 ladder.

En los ensayos utilizando caldo ECm con novobiocina el análisis microbiológico obtuvo resultados positivos en una proporción de 4 a 9 repeticiones al analizar muestras inoculadas con 0.1 UFC/g y en 5 de 9 repeticiones cuando se analizaron muestras inoculadas con 10^0 UFC/g; en el caso de muestras inoculadas con 10^1 a 10^5 las 9 repeticiones de cada concentración del patógeno fueron positivas para este ensayo.

Al realizar los experimentos de PCR para determinar factores de virulencia utilizando caldo ECm con novobiocina todas las repeticiones de las muestras inoculadas con 10^1 a 10^5 UFC/g fueron positivas (9 de 9) para los tres blancos (VT1, VT2 y *eae*), sin embargo cuando se realizaron ensayos con muestras inoculadas con 10^0 UFC/g solo 4 de 9 fueron positivas para VT1 y VT2 y solo 2 de 9 fueron positivas para *eae*. Cuando se inoculó con 10^0 UFC/g ninguna de las muestras generó los fragmentos de amplificación esperados.

Por otro lado, las repeticiones resultaron positivas para los dos blancos (O157 y H7) en las pruebas de serotipo en muestras inoculadas con 10^0 a 10^5 UFC/g utilizando ECm + novobiocina como preenriquecimiento; sin embargo, al igual que el ensayo de factores de virulencia, no se logró detectar la presencia de este patógeno cuando se probaron muestras con 0.1 UFC/g de *E. coli* O157:H7. En la tabla 11 se desglosan los resultados de PCR y análisis microbiológico con preenriquecimiento de ECm + novobiocina y en las figuras 19 y 20 se ilustran las amplificaciones obtenidas en los ensayos de factores de virulencia y serotipos respectivamente.

Tabla 11

Resultados de preenriquecimiento con ECm con novobiocina

UFC/g de carne	PCR (Serotipos)		PCR (Factores de Virulencia)			Microbiológico
	O157	H7	VT1	VT2	<i>eae</i>	
10 ⁵	9/9 ^a	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10 ⁴	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10 ³	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10 ²	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10 ¹	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10 ⁰	9/9	9/9	6/9	5/9	4/9	5/9
10 ⁻¹	9/9	9/9	4/9	3/9	3/9	4/9

Resultados de la inoculación de *E. coli* O157:H7 por análisis microbiológico y por PCR.

^a. 9 resultados positivos de 9 resultados totales (se realizaron 3 ensayos independientes con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 resultados)

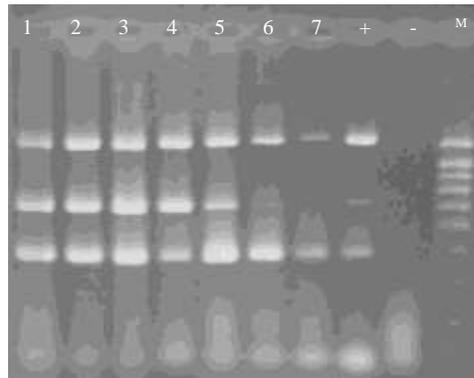


Figura 19. Inoculación de *E. coli* O157:H7. Preenriquecimiento en ECm+n, PCR multiplex de Factores de Virulencia (*eae*, VT1 y VT2). Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10⁵ a 10⁻¹ UFC de *E. coli* O157:H7 por g de carne; carril 8, control positivo, cepa de *E. coli* O157:H7; carril 9, control negativo; M, marcador 100 ladder.

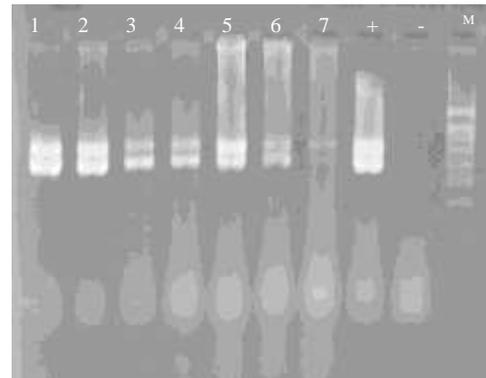


Figura 20. Inoculación de *E. coli* O157:H7. Preenriquecimiento en ECm+n. PCR multiplex de Serotipos (O157 y H7). Carriles 1 a 7, PCR de carne inoculada con 10⁵ a 10⁻¹ UFC de *E. coli* O157:H7/g de carne; carril 8, control positivo, cepa de *E. coli* O157:H7; carril 9, control negativo; M, marcador 100 ladder.

9.5. Ensayo para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*

En esta prueba, se detectó en una sola reacción de PCR a *Salmonella* sp y a *E. coli* O157:H7 (serotipo), Para este ensayo, se aplicaron dos preenriquecimientos y se observó su sensibilidad a través de 3 experimentos con tres réplicas, inoculando a estos microorganismos en proporción 1:1. En la tabla se ilustran resultados similares tanto por el método que empleó ICC como con el que usó CST, ya que al probarse con muestras inoculadas con 10^0 a 10^2 UFC de cada patógeno/g, los tres blancos (*invA*, *rfbE* y *fliC*) resultaron positivos cuando se utilizaron ambos medios. En el caso de ambos preenriquecimientos cuando se analizaron muestras inoculadas con 10^{-1} UFC de cada patógeno/g, se obtuvieron las amplificaciones de *Salmonella* spp y H7, pero no de O157 como se ilustra en la tabla 12 y figura 21.

Tabla 12

Resultados de la inoculación de *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 por análisis microbiológico y por PCR

UFC de cada patógeno/g de carne	PCR (Enriquecimiento ICC)			PCR (Enriquecimiento CST)		
	<i>invA</i>	O157	H7	<i>invA</i>	O157	H7
10^2	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^1	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^0	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
10^{-1}	9/9	0/9	9/9	9/9	0/9	9/9

^a. 9 resultados positivos de 9 resultados totales (se realizaron 3 ensayos independientes con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 resultados)

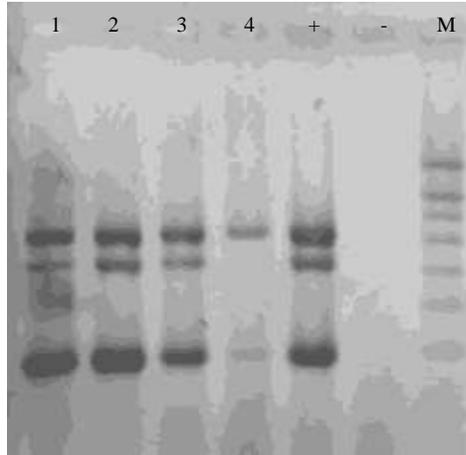


Figura 21. Inoculación de *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7. Preenriquecimiento en ICC. Carriles 1 a 4, PCR de carne inoculada con 10^2 a 10^{-1} UFC cada patógeno por g de carne; (+), control positivo, ADN de cepa de *S. Typhimurium* y de *E. coli* O157:H7; (-), control negativo; M, marcador 100 ladder.

9.6. Muestras de campo

Se analizaron 40 muestras de carne de bovino procedentes de la zona metropolitana de Monterrey, N. L., México, las cuales consistieron en cortes estilo New York o Rib Eye. La detección de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 se realizó con métodos microbiológicos. Además se realizó la detección *Salmonella* y *L. monocytogenes* con PCR. La detección de *E. coli* O157:H7 y sus factores de virulencia, se llevó a cabo con ensayos de PCR multiplex, en donde se detectaron otras cepas verotoxigénicas.

Salmonella fue detectada en 2 de 40 muestras (5 %) por método microbiológico, mientras que por PCR fue detectado en 6 de las muestras (15 %). *L. monocytogenes* se detectó en 10 muestras (25 %) por método microbiológico, mientras que por PCR se detectó en 14 muestras (35 %), ver tablas 13 y 14. En la figura 22 y 23 se visualizan en gel de agarosa los productos de PCR de *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* que se obtuvieron a partir de muestras de campo en donde se observaron muestras positivas de *Salmonella* spp ya que se generó un producto de 287 pb (figura 22) y en el caso de *L. monocytogenes* se observó un producto de 420 pb (figura 23).

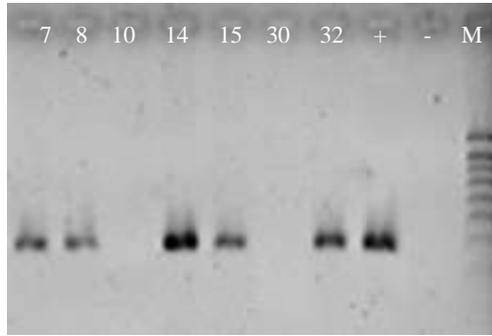


Figura 22. Muestras de campo de *Salmonella* sp. PCR de muestra 7, 8, 10, 14, 15, 30 y 32; (+), control positivo, ADN de *S. Typhimurium* ATCC 13076 fragmento de 287 pb; (-), control Negativo; M, marcador 100 ladder.

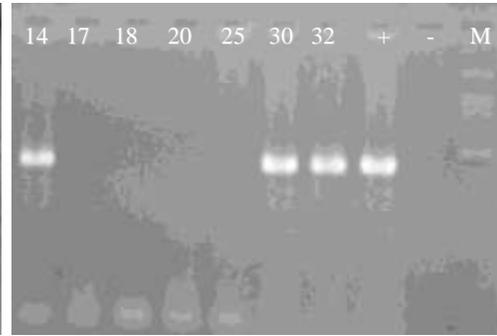


Figura 23. Muestras de campo de *L. monocytogenes*. Muestras 14, 17, 18, 20, 25, 30 y 32; (+), Control positivo ADN de *L. monocytogenes* ATCC 7644; (-), control Negativo; M. Marcador 100 ladder.

E. coli O157:H7 no se detectó por el método microbiológico, mientras que por PCR multiplex se detectaron 2 muestras positivas (5 %). En un segundo ensayo de PCR multiplex se determinó la presencia de otras cepas productoras de SLT's, en total fueron 10 muestras positivas de las cuales 5 fueron VT1 (+) (12.5 %), 2 VT2 (+) (5 %), y 4 VT1 y VT2 (+) (10 %). En las muestras resultantes con O157 (+) y H7 (+) por PCR multiplex, se determinó una no verotoxigénica y otra VT2 (+). Solo una muestra amplificó el gen de la intimina (muestra 25, 2.5 %) y otras 12 muestras amplificaron solamente H7 y no O157 (30 %), ver tabla 13 y 14.

Tabla 13

Resultados de muestras de campo

Mta	<i>Salmonella</i> spp		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i> O157:H7					
	Aislam.T radic	PCR	Aislam Tradi.	PCR	Aislam Tradic	PCR multiplex (serotipo)		PCR multiplex (Factores de Virulencia)		
						O157	H7	VT1	VT2	EAE
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
7	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
9	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
14	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
15	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
19	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
21	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
22	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
24	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
26	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
28	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
32	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
34	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 14

Resultados de PCR y aislamiento microbiológico para *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7.

<i>Salmonella</i> spp		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i> O157:H7	
Aislamiento	PCR	Aislamiento	PCR	Aislamiento	PCR
2/40	6/40	10/40	14/40	0/40	2/40
5 %	15 %	25 %	35 %	0 %	5 %

En la figura 24 se observa un diagrama de los porcentajes de muestras de campo positivas a verotoxinas determinadas con el uso de PCR multiplex para factores de virulencia; mientras que en la figura 25 se describen los porcentajes de muestras de campo positivas a serotipo O157 y/o H7. En la figura 26 se observan las amplificaciones de factores de virulencia en muestras de campo en donde se observan muestras negativas, VT1(+), VT2 (+), VT1 y VT2 (+) y *eae* (+). Mientras que en la figura 27 se observan productos de PCR de serotipo en muestras de campo en el cual se observan muestras negativas, H7 (+) y que también fueron positivas para O157 y H7 simultáneamente.

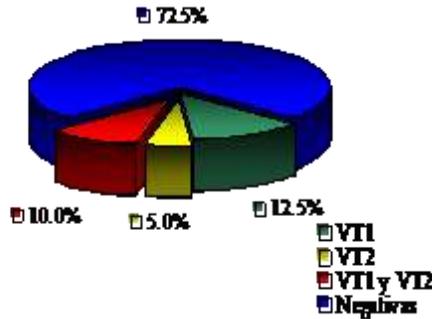


Figura 24. Porcentaje de muestras de campo positivas a verotoxinas. PCR multiplex (factores de virulencia)

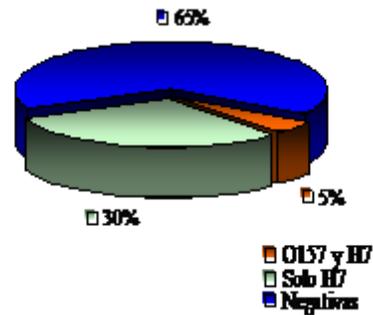


Figura 25. Porcentaje de muestras de campo positivas para O157 y/o H7. PCR multiplex (serotipos)

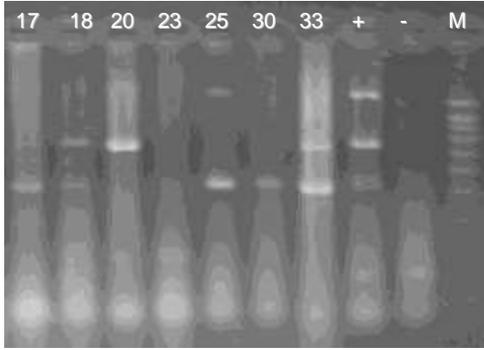


Figura 26. Muestras de campo de *E. coli* O157:H7. PCR de factores de virulencia. Muestras 17, 18, 20, 23, 25, 30 y 33; (+), Control positivo ADN de *E. coli* O157:H7 (INDRE); (-), control negativo; M. marcador 100 ladder.

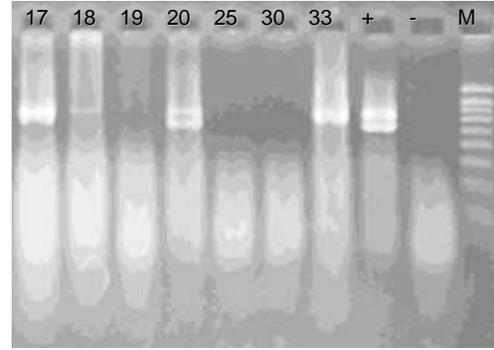
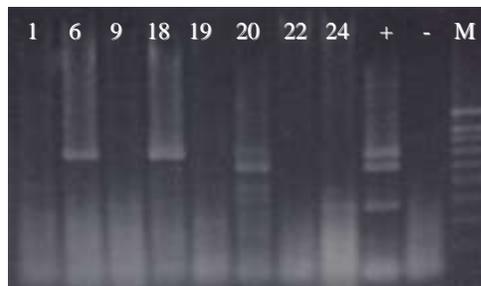


Figura 27. Muestras de campo de *E. coli* O157:H7. PCR de serotipos. Muestras 17, 18, 19, 20, 25, 30 y 33; (+), control positivo ADN de *E. coli* O157:H7 (INDRE); (-), control negativo; M. marcador 100 ladder.

Se realizó el ensayo de PCR multiplex para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7 (serotipo) y *Salmonella* sp, con un preenriquecimiento en caldo ICC. En el caso de *Salmonella*, se observaron los mismos resultados que los mostrados con el preenriquecimiento de agua peptonada amortiguada y PCR simple (6 muestras positivas) (15%), al igual que la amplificación de O157 realizada en la PCR multiplex de serotipos con preenriquecimiento de ECm (2 muestras) (5 %). Sin embargo, la amplificación del serotipo H7 por este PCR multiplex, mostró 10 muestras positivas (incluyendo las 2 que fueron O157 positivas). Comparado con los datos de la PCR multiplex para serotipos (O157:H7), estos divergen un poco, ya que en este ensayo se amplificaron a 14 muestras en total (incluyendo a las dos positivas para O157). Las muestras positivas por PCR multiplex para el serotipo H7 que detecta simultáneamente *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 fueron las muestras 6, 8, 14, 15, 16, 18, 20, 31, 32 y 33.

Cuando se realizó el ensayo de PCR multiplex para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, se logró una sensibilidad similar que cuando se hizo por separado utilizando como preenriquecimiento el caldo ICC (ver figura 28).



muestras de campo. Preenriquecimiento en ICC. PCR-multiplex para *Salmonella/E. coli* O157:H7. Muestras 1, 6, 9, 18, 19, 20 y 24; (+), control positivo, ADN de cepa de *Salmonella* y de *E. coli* O157:H7; (-), control negativo; M, marcador 100 ladder.

9.7. Interpretación de los resultados obtenidos

En muestras inoculadas, el índice kappa de 1.00 para los patógenos *Salmonella* y *L. monocytogenes*, significa que existe una completa concordancia entre los dos métodos utilizados (microbiológico y PCR), para detectar a dichos patógenos (ver figura 29 y tabla 15).

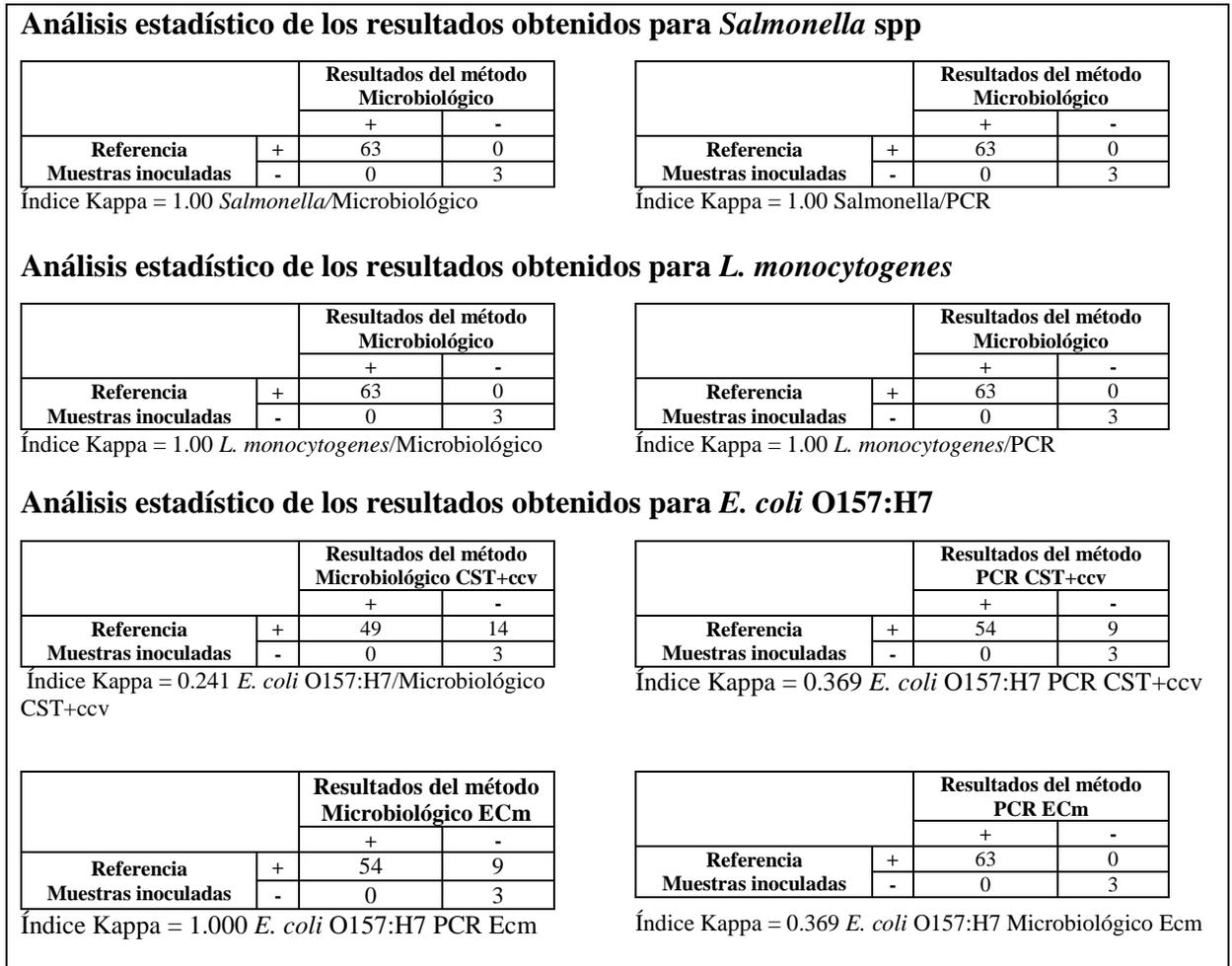


Figura 29. Resultados de índices kappa obtenidos del análisis microbiológico y de la PCR para *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en muestras inoculadas artificialmente

Tabla 15

Índices Kappa de los métodos probados utilizando muestras inoculadas artificialmente

Método a probar	Índice Kappa
<i>Salmonella</i> Microbiológico	1.00
<i>Salmonella</i> PCR	1.00
<i>L. monocytogenes</i> Microbiológico	1.00
<i>L. monocytogenes</i> PCR	1.00
<i>E. coli</i> O157:H7 Microbiológico CST+ccv	0.241
<i>E. coli</i> O157:H7 Microbiológico ECm	0.369
<i>E. coli</i> O157:H7 PCR CST+ccv	0.369
<i>E. coli</i> O157:H7 PCR Ecm	1.00

Para las determinaciones *E. coli* O157:H7 se obtuvieron 4 índices kappa, de los cuales solo uno dió completa concordancia. Por lo anterior, concluimos que la PCR que se realizó a partir del preenriquecimiento con ECm, fuera elegida para los ensayos de PCR subsecuentes con *E. coli* O157:H7 en muestras de campo. Por otro lado, en el caso del microbiológico con ECm aunque presenta una débil concordancia con respecto a la presencia o ausencia del patógeno, se eligió este caldo debido a que con CST+ccv el índice era mucho menor (ver figura 29 y tabla 15).

En muestras de campo, los valores Kappa para *Salmonella* indican clara concordancia (0.459), para *L. monocytogenes* fuerte concordancia (0.765) y para *E. coli* O157:H7 casi completa concordancia (0.95). Los valores no fueron tan altos en algunas ocasiones debido a que hubo muestras positivas para PCR, pero negativas para análisis microbiológico (ver tabla 16).

Tabla 16

Resultados de sensibilidad, especificidad, precisión relativa e índice Kappa para *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en muestras de campo.

Patógeno	Sensibilidad relativa (%)	Especificidad Relativa (%)	Precisión Relativa (%)	Índice Kappa
<i>Salmonella</i>	100	89.5	90	0.459
<i>L. monocytogenes</i>	100	86.7	90	0.765
<i>E. coli</i> O157:H7	- ^a	95	95	0.95

^a El valor de sensibilidad relativa no se puede estimar debido a que en el análisis microbiológico no se obtuvo ninguna muestra positiva para *E. coli* O157:H7, la única recomendación pertinente sería que se aumentara el número de muestras para de esta manera tener mas posibilidades de que obtengamos aislamientos y poder hacer los cálculos pertinentes.

Los valores de sensibilidad, especificidad y precisión relativa de los métodos de PCR mostraron ser altos tomando como referencia el método microbiológico tradicional para cada uno de estos tres patógenos.

10. DISCUSIONES

***Salmonella* spp**

Durante la selección de iniciadores para *Salmonella* se probó una serie de genes blanco como IS200 (secuencia de inserción), secuencias al azar específicas, genes *agfA*, *hin*, *iagAB*, *spvR*, *viaB*, *mkfA*, *ompC*, y *oriC*; algunos, solo se han probado con un grupo pequeño de cepas, o con algunas cepas no-*Salmonella*; otros son específicos para el gen *iagAB* que solo identifica a serotipos de *Salmonella enterica* subespecie I. Por lo anterior, se tomó la decisión de utilizar iniciadores específicos para amplificar un fragmento interno del gen *invA* el cual se ha demostrado ser esencial en la invasión de *Salmonella* en cultivos celulares. Este gen es localizado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* spp, la cual codifica proteínas del sistema de secreción tipo III. (27). Se ha reportado que amplifica tanto a *S. enterica* y *S. bongori*, estos iniciadores fueron evaluados en 142 cepas no pertenecientes al género *Salmonella* en donde se observó que no se generaban falsos positivos y en 630 cepas de *Salmonella*, en donde solo 2 cepas de *S. Lichfield* y 2 *S. Seftenberg* no amplificaron, lo que indicó una aparente ausencia de este gene, lo que se ha sugerido que estas cepas no son invasivas o tienen una vía alternativa para penetrar las células, la cual aún no es conocida (117). En un estudio posterior se evaluaron 242 cepas de este patógeno y solo una cepa del serotipo Saintpaul no fue detectada, pero las dos cepas de *S. Lichfield* y las dos de *S. Seftenberg* que fueron incluidas fueron positivas y concluyeron que la ausencia del gen *invA* parece ser poco frecuente (85).

Las no amplificaciones de estos dos serotipos no es de suma importancia en nuestro país ya que los reportes desde 1972 a 1999 demuestran que *S. Lichfield* y *S. Saintpaul* no se han reportado, mientras que la proporción de aislados de *S. Seftenberg* no ocupa un lugar preponderante en las frecuencias de aislados, tanto de origen humano, como las no-humano debido a que los serotipos detectados con son en orden de frecuencia *S. Typhimurium*, *Enteritidis*, *Derby*, *Agona*, *Anatum* y *Typhi*, entre otras (64).

Cuando se probaron los iniciadores específicos para *Salmonella* spp contra cepas de referencia y otros microorganismos, no se encontró que generaran falsos positivos contra otras bacterias y las cinco cepas de *Salmonella* probadas generaron el producto de amplificación esperado; estos resultados concuerdan con los obtenidos en un proyecto internacional de validación y estandarización de la PCR, en donde estos iniciadores fueron comparados contra otros 3 pares, encontrando que este par de iniciadores fueron los más selectivos (85).

Al comparar el ensayo microbiológico contra la PCR en muestras inoculadas artificialmente, observamos una sensibilidad similar para cada una de los patógenos ya que el límite de detección fue de 10^{-1} UFC/g de muestra utilizando agua peptonada amortiguada. Este medio de enriquecimiento ya ha sido citado como preenriquecimiento para ensayos de PCR (43; 85; 124; 15). No logramos determinar un límite de detección menor debido a que la manipulación de la muestra se dificultaría ya que para tener una proporción de 10^{-2} UFC/g se necesitaría tener una célula del patógeno en 100 g de muestra de carne con un volumen de 900 mL de caldo de preenriquecimiento.

En el análisis de campo, la PCR detectó 6 muestras positivas para *Salmonella* spp (15 %) y 2 el método microbiológico (5 %). Las dos muestras que fueron positivas por el método microbiológico (muestras 14 y 15) fueron también positivas para la PCR, sin embargo, en el resto de las muestras positivas para PCR (6, 7, 24 y 32) no fue posible el aislamiento microbiológico del patógeno. Lo anterior se podría deber principalmente a que el análisis microbiológico requiere que el microorganismo se encuentre en condiciones viables, a diferencia de la prueba molecular en donde se puede detectar el ADN de este microorganismo sin importar si este vivo o muerto. Además de la posible falta de viabilidad del microorganismo, la excesiva flora acompañante pudo ser un factor que enmascaró la presencia de *Salmonella*.

Listeria monocytogenes

Se seleccionaron iniciadores que amplifican un fragmento de 420 pb del gen *hlyA*, el cual codifica para una hemolisina conocida como listeriolisina O, que participa como factor de virulencia en la patogenia de esta bacteria, ya que una vez que es fagocitada por el macrófago, libera la listeriolisina que tiene actividad lítica en el fagosoma por lo que el microorganismo queda libre en el citoplasma del macrófago. Los ensayos de especificidad de estos iniciadores mostraron buenos resultados ya que generó el producto de amplificación esperado con la cepa de *L. monocytogenes* y no se produjeron falsos positivos con el resto de las cepas probadas.

Al comparar el ensayo microbiológico contra la PCR en muestras inoculadas artificialmente, encontramos una sensibilidad igual ya que el límite de detección para ambos métodos fue de 10^{-1} UFC/g de muestra utilizando caldo UVM modificado. Este medio de enriquecimiento ya ha sido citado como preenriquecimiento para ensayos de PCR (15). No se logró determinar un límite de detección menor a 10^{-1} UFC/g debido a que la manipulación de la muestra se dificultó ya que para tener una proporción de 10^{-2} UFC/g se requiere tener una célula del patógeno en 100 g de muestra de carne con un volumen de 900 mL de caldo de preenriquecimiento.

L. monocytogenes fue detectada en 14 muestras positivas por PCR, y sólo en 10 se logró aislar por el método microbiológico. Las causas de estos resultados pueden ser similares a los de *Salmonella* spp, ya que la falta de viabilidad de *L. monocytogenes* y la competencia con la flora acompañante son factores que pueden influenciar la discrepancia de los resultados de PCR y microbiológicos. Este último factor incluye la posibilidad de que en la misma muestra se encuentren otras especies del género *Listeria* que pueden enmascarar a la especie de interés.

***Escherichia coli* O157:H7 y otras cepas verotoxigénicas**

Los iniciadores para la detección del locus que codifica para el antígeno somático O157 ya han sido reportados que son específicos para O157:H7 y O157:H-, además se probaron otros serotipos de *E. coli* y otros microorganismos y no generaron falsos positivos. Se ha reportado que este par de iniciadores tampoco generan falsos positivos con *Salmonella* Angora la cual reacciona con el antisuero O157 (Oxoid) en pruebas de aglutinación en látex (30), asimismo se menciona que se podrían detectar cepas del fenotipo fermentador y no fermentador de sorbitol y no se discrimina si produce o no las toxinas shiga.

Los iniciadores para el serotipo H7, amplifican cepas como O157:H7, O121:H7, O55:H7, O1:H7, O18ac:H7, O19:H7, O88:H7 u O156:H7, pero no a otros serotipos de *E. coli* (no H7) (58); al ser probados éstos con diversas cepas bacterianas solo amplificaron con *E. coli* O157:H7 y no generaron falsos positivos con el resto de las cepas utilizadas.

Gannon, *et al.*, en 1993 desarrollaron un par de iniciadores (AE-19 y AE-20) complementarios a la región 3' terminal del gen *eae* de *E. coli* O157:H7 y parece ser relativamente específica para este serogrupo ya que amplifica a todas las cepas de *E. coli* O157 (H7 y H-) pero no a otras *E. coli* productoras de toxinas shiga o EPEC con excepción de una cepa productora de toxinas (*E. coli* O145) y una EPEC (*E. coli* O55) (57), con esta última cepa se ha demostrado por electroforesis de enzimas multilocus (147) que ambos serotipos están muy relacionados y además *E. coli* O55:H7 se ha reconocido como causante de diarrea (51).

Para eficientizar la detección del patógeno se optó por realizar dos ensayos de PCR multiplex, uno para el serotipo O157:H7 y otro para factores de virulencia (VT1, VT2 y *eae*). No se logró estandarizar la prueba en un solo ensayo de PCR multiplex debido a que los productos de amplificación de algunos iniciadores eran similares en talla molecular y se traslaparon los productos al verlos en gel de agarosa al 2 % (VT2:518 pb y O157: 497 pb).

Preenriquecimiento y extracción de *E. coli* O157:H7 en muestras de carne

Para realizar los ensayos, tanto microbiológicos como de PCR fueron probados dos medios de preenriquecimiento (CST+ccv y E_{Cm}+n), algunos estudios recomiendan el uso de un preenriquecimiento en E_{Cm} durante la noche con la finalidad de diluir los inhibidores de PCR e incrementar el número de bacterias blanco (37), (139), (126). Uyttendaele, M, *et al.*, en 1998 recomienda que para muestras de carne molida naturalmente contaminadas, es necesario un período de incubación de 24 h para la apropiada detección de bajos números de organismos de EHEC por PCR. Por otra parte McKillip, J.L. *et al.*, en 2000 menciona que la eficiencia de extracción de ADN es una limitante importante y frecuentemente es pasada por alto en las estrategias de detección basadas en la PCR (135).

Sensibilidad de PCR y análisis microbiológico tradicional para *E. coli* O157:H7 en muestras inoculadas

El ensayo de PCR-multiplex para *E. coli* O157:H7 resultó ser igual o más sensible que la prueba microbiológica, esto dependiendo del caldo de enriquecimiento utilizado. La sensibilidad de la detección de EHEC es esencial ya que la dosis de infección para humanos puede ser tan baja como la de 1 UFC, es por tal motivo que es importante tener un límite de detección bajo para este patógeno. Al comparar los dos medios de preenriquecimiento utilizados en los ensayos de detección de *E. coli* O157:H7, encontramos divergencias en las proporciones de muestras positivas con ambos métodos de preenriquecimiento, ya que en CST+ccv la PCR detectó el serotipo de este patógeno solo hasta 10^{-0} UFC/g por PCR, mientras que en el ensayo microbiológico se detectó en este grado de inoculación en solo 4 de las 9 repeticiones realizadas para esta concentración. Por otro lado, en el caldo ECm+n se detectó hasta 10^{-1} UFC/g en el ensayo multiplex de serotipos mientras que el microbiológico se detectó en 5 de 9 muestras cuando el microorganismo se encuentra en 10^{-0} UFC/g y en 4 de 9 muestras cuando hay 10^{-1} UFC/g.

Al realizar un prueba de McNemar para ver si había diferencia significativa entre los métodos, no se encontró ninguna al realizar la comparación de PCR contra el análisis microbiológico para cada uno de los caldos, ni al comparar los ensayos de PCR con CST+ccv y ECm+n. Sin embargo, en el ensayo de serotipos, se obtuvo una sensibilidad de un logaritmo más cuando se utilizó ECm+n que utilizando CST+ccv. En un análisis Kappa comparando los resultados de PCR contra el hecho de que todas las muestras están positivas (exceptuando los controles negativos), los resultados mostraron que la PCR multiplex de serotipos en ECm+n, obtuvo un índice Kappa de 1.0000, esto significa una completa concordancia entre lo que se inoculó y lo obtenido por ensayo de PCR multiplex. En CST+ccv el índice Kappa fue de 0.3529, demostrando una débil concordancia entre lo que se inoculó y el resultado de la prueba de PCR multiplex.

En las pruebas de PCR multiplex para *E. coli* O157:H7, los límites de detección no fueron tan satisfactorios como los obtenidos en los ensayos de *Salmonella* o *L. monocytogenes*, probablemente debido a que el límite de detección puede ser influenciado en algún grado por el crecimiento relativo de flora normal, ya que la extracción de ADN de otros microorganismos presentes en la muestra, interfiere con la eficiencia de la PCR (67), aunado a lo anterior la sangre ha sido implicada como uno de los más importantes inhibidor de la PCR (1).

En la estandarización del ensayo de PCR multiplex para factores de virulencia de *E. coli* O157:H7, se presentaron problemas de amplificación al intentar utilizar las mismas condiciones que se utilizaron por separado, para cada uno de los blancos utilizados, por lo cual, se procedió a estandarizar nuevas condiciones, como lo han reportado diversos autores (51; 24), Con respecto al número de copias que detectaron los ensayos de PCR multiplex, no se presentó el mismo límite de detección para cada uno de los productos. Un factor que pudo afectar el desempeño en la amplificación de estos productos a bajas concentraciones celulares en las muestras de carne es que el gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7 es un gen cromosomal, mientras que los genes que codifican a las verotoxinas

se encuentran en fagos en múltiples copias y eso permite que se amplifiquen en mayor proporción de muestras que las del fragmento de *eaeA*.

Muestras de campo

No se detectó ninguna muestra positiva para *E. coli* O157:H7 por método microbiológico, mientras que por PCR multiplex se observaron dos muestras positivas. Estas diferencias quizás se deban al método de detección de este patógeno que se seleccionó para este estudio, el cual presenta ciertas desventajas como la detección de un solo serotipo, ya que por este método no se muestran otras cepas verotoxigénicas, no es posible saber que toxina produce, la metodología microbiológica empleada no detecta cepas atípicas que sean SOR (+) (51) o GUD (+), no se podría descubrir una cepa *O:rouge:H7*. Se ha mencionado también que diferencias en la flora competitiva puede tener un impacto sobre la sensibilidad de detección de *E. coli* O157:H7, haciendo más difícil la detección en cierto tipo de muestras (123), además de presentarse dificultades al expresar el antígeno flagelar H7. Aunado a esto, se han reportado inespecificidades de los antisueros utilizados, ya que anticuerpos contra *E. coli* O157:H7 pueden reaccionar contra otras *E. coli* (119) y los sueros anti O157 frecuentemente tienen reacciones cruzadas con *Citrobacter freundii*, *E. hermannii*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas maltophilia*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii* y *Salmonella* del grupo N (7; 21; 13). Esta situación es problemática principalmente con *E. hermannii* porque presenta un perfil bioquímico similar a *E. coli* O157:H7 (88), además el análisis solo con suero anti O157 ha reconocido aislados que no producen SLT's o no eran H7. Estas desventajas afectan el desempeño de la prueba microbiológica. También se menciona que la utilización del medio de cultivo MacConkey Sorbitol específico para detectar la clona de *E. coli* O157:H7 que no fermentan sorbitol, característica que la hace diferente del resto de las cepas de *E. coli* incluidas las de otros serotipos enterohemorrágicos, aporta un sesgo en los estudios hechos en muchos países, ya que podría ser que este serotipo (O157:H7) fuese infrecuente, pero que existieran otros serotipos enterohemorrágicos frecuentes (sorbitol positivos) (86). En este caso no se detectó ninguna cepa de *E. coli* O157:H7, posiblemente debido a la competencia de flora fermentadora de sorbitol, así como la posibilidad de que la cepa detectada sea una variante atípica fermentadora de sorbitol o con actividad de β glucuronidasa. Por otro lado, a estas muestras también se les determinó la presencia de otros factores de virulencia encontrando que una no presentó la amplificación de ninguno de los tres productos esperados, mientras que la segunda muestra solo presentó la amplificación de VT2. En el primer caso es posible la no amplificación de factores de virulencia, ya que se ha reportado una cepa de *E. coli* O157:H7 no toxigénica la cual fue negativa para los tres productos de PCR (VT1, VT2 y *eaeA*) (52). En el segundo caso, existen variantes de *E. coli* O157:H7 productoras de una , otra, o ambas verotoxinas y la no amplificación del *eaeA* podría ser un caso similar al anteriormente citado o deberse a que cuando el microorganismo se encuentra en muy bajas proporciones podría generarse la no amplificación del mismo mostrando un falso negativo, como lo mostró el ensayo de sensibilidad; Wang, 2002, menciona que una cepa de *E. coli* O157: no H7 no amplificó con los iniciadores para *eaeA* (145), además la producción de intimina no es esencial para la patogénesis, porque un número de casos esporádicos de HUS son causados por cepas STEC no-O157 *eae* negativas, como las

cepas STEC O104:H21 y O113:H21 que son *eae* negativas y causaron un brote y un grupo de tres casos en Estados Unidos y Australia respectivamente (42, 106).

Sin embargo, al realizar los ensayos de simulación de PCR con el programa Amplify 1.2 con los iniciadores para VT1 y utilizando como templado secuencias de *Shigella dysenteriae* se observó que también se amplifica el fragmento esperado, dándonos la posibilidad de que en algunas muestras que analizamos y que fueron positivas solo para VT1 y no para O157 y H7, sean *Shigella dysenteriae*. Wang, en 2002 menciona que entre aislados de STEC parecen tener un grado de virulencia para humanos, mientras que algunos datos sugieren que el tipo de toxina es importante para determinar la probabilidad de desarrollo de HUS. También se ha demostrado que las cepas con Stx2 son más críticas para el desarrollo de HUS que las que tienen Stx1, ya que las cepas que producen Stx2 son más frecuentemente aisladas con casos de HUS que los aislados que expresaban solo Stx1 (145).

Información revisada sobre los genotipos de aislados de STEC menciona que pueden tener consideraciones microbiológicamente y clínicamente significativas porque su capacidad de causar enfermedad gastrointestinal severa en humanos y complicaciones como HUS parecen estar ligado con ciertas combinaciones de rasgos. La presencia de estos genotipos particulares de STEC en alimentos como la carne es también extremadamente significativa desde el punto de vista de seguridad alimentaria o salud pública (103). Por otro lado, se menciona que el valor de detectar la presencia de los genes SLT's o las mismas toxinas es controversial, ya que aunque otras *E. coli* las produzcan, no significa que sean un problema para el hombre (51). Sin embargo, serotipos como O26:H11 y O111:NM, las cuales son productoras de SLT's han sido asociadas con HC y HUS (12), (75). Se ha sugerido que las cepas *stx* positivas a las cuales les falta secuencias de *eaeA* pueden ser menos virulentas para humanos que los aislados de EHEC que son *eaeA* positivos (8).

Por PCR multiplex se encontraron 8 muestras que solo amplificaban H7, es posible que esto se deba a la presencia de O121, O55, O1, O18ac O19, O88, u O156 que son H7 positivas (57). Aunque Fields, 1997 reportó que podría ser que algunas cepas que son serologicamente NM, genéticamente son H7 (44).

Aunque se ha mencionado el uso de separación inmunomagnética después de un período de 6 h de enriquecimiento junto con la detección de PCR lo cual podría reducir el tiempo de análisis sin perder sensibilidad, esta técnica solo está disponible para *E. coli* O157:H7 y es difícil desarrollar para otras cepas productoras de verotoxinas, las cuales representan un grupo no definido de *E. coli* (135).

11. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de PCR para la detección de *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 a partir de cepas de referencia.
- Se estandarizó la técnica de PCR para la detección *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* en muestras de carne inoculadas artificialmente.
- Se estandarizó la técnica de PCR multiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 y factores de virulencia más importantes en esta bacteria en muestras de carne cruda de res inoculada artificialmente.
- Se estandarizó un ensayo de PCR multiplex para la detección simultánea de *Salmonella* spp y el *E. coli* O157:H7 (serotipo).
- Los ensayos de PCR multiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 (serotipo) y para los factores de virulencia tuvieron mayor sensibilidad utilizando un preenriquecimiento de ECm+n comparado con el CST+ccv. Mientras que en el ensayo microbiológico no hubo diferencias al usar estos medios de cultivo.
- El PCR multiplex para *E.coli* O157:H7 resultó ser superior que el ensayo microbiológico, mientras que para *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* no hubo diferencia en muestras inoculadas artificialmente.
- Se logró detectar mayor porcentaje de muestras positivas por PCR, que con el aislamiento microbiológico.
- De 40 muestras de campo analizadas *Salmonella* spp se detectó en 6 muestras positivas por PCR y 2 por el método tradicional, para *L. monocytogenes*, 14 y 10 y para *E. coli* O157:H7 2 y 0 respectivamente.
- El ensayo de PCR multiplex para la detección simultánea de *Salmonella* spp y *E. coli* O157:H7, dió los mismos resultados que los PCR por separado.
- La detección de factores de virulencia en *E.coli* permitió conocer la presencia de otras cepas productoras de verotoxinas en las muestras de campo.
- El método molecular disminuyó el tiempo de análisis a 36 h, comparado con el análisis microbiológico tradicional que es de 5 días o más.

12. PERSPECTIVAS DE TRABAJO

- Estandarización de otras pruebas moleculares para la detección de otros patógenos transmitidos por alimentos.
- Estandarización de pruebas de PCR en tiempo real para la detección de bacterias patógenas en alimentos con el fin de brindar resultados cuantitativos para estas determinaciones
- Validación del método con el uso de diferentes matrices (alimentos), así como mayor cantidad de muestras para su posible uso como prueba de rutina en laboratorios de análisis microbiológicos
- Uso de los métodos moleculares como prueba confirmatoria en apoyo al método microbiológico de rutina para la detección de *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, sobre todo en lugares donde los resultados se requieren con prontitud.
- Estas son técnicas alternativas que apoyan la detección rápida de patógenos como *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en carne fresca, con la cual se pueden obtener resultados en menor tiempo (36 h) que con el método microbiológico (hasta 5 días o más).
- Es una prueba que apoyaría a los establecimientos que exportan carne en el control de su proceso; asimismo, ayudaría al cumplimiento de las regulaciones internacionales.

13. LITERATURA CITADA

1. Abu Al-Soud, W., and P. Radstrom. 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 64:3748-53.
2. Alexandre, M., V. Prado, M. T. Ulloa, C. Arellano, and R. Rios. 2001. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in meat foods using DNA probes, enzyme-linked immunoabsorbent assay and polymerase chain reaction. *J Vet Med Infect Dis Vet Public Health* 48:321-330.
3. Bansal, N. S., F. H. McDonell, A. Smith, G. Arnold, and G. F. Ibrahim. 1996. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int.J. Food Microbiol* 33:293-300.
4. Bäumlner, A. J., F. Heffron, and R. Reissbrodt. 1997. Rapid detection of *Salmonella* enterica with primers specific for iroB. *J Clin Microbiol.* 35:1224-30.
5. Belanger, S. D., M. Boissinot, C. Menard, F. J. Picard, and M. G. Bergeron. 2002. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J Clin Microbiol* 40:1436-40.
6. Berry, E. D. 2000. Development and demonstration of RNA isolation and RT-PCR procedures to detect *Escherichia coli* O157:H7 gene expression on beef carcass surfaces. *Lett Appl Microbiol* 31:265-269.
7. Bettelheim, K. A., H. Evangelidis, J. L. Pearce, E. Sowers, and N. A. Strockbine. 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol* 31:760-761.
8. Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, and H. Karch. 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J Clin Microbiol.* 33:631-5.
9. Bielaszewska, M., H. Schmidt, M. A. Karmali, Khakhria R, J. Janda, K. Blahova, and H. Karch. 1998. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 36:2135-7.

10. Blais, B. W., and L. M. Phillippe. 1993. A simple RNA probe system for analysis of *Listeria monocytogenes* polymerase chain reaction products. *Appl Environ Microbiol.* 59:2795-2800.
11. Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, J. Rey, J. M. Alonso, M. Hermoso, J. Hermoso, M. P. Alonso, G. Dahbi, E. A. González, M. I. Bernárdez, and J. Blanco. 2003. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clin Microbiol* 41:1351-1356.
12. Bopp, C. A., K. D. Greene, F. P. Downes, E. G. Sowers, J. G. Wells, and I. K. Wachsmuth. 1987. Unusual verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 25:1486-9.
13. Borczyk, A. A., H. Lior, and B. Ciebin. 1987. False positive identifications of *Escherichia coli* O157 in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 4:347-349.
14. Bubert, A., I. Hein, M. Rauch, A. Lehner, B. Goebel, and M. Wagner. 1999. Detection and differentiation of *Listeria spp* by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* 65:4688-4692.
15. Burtscher, C., P. A. Fall, P. A. Wilderer, and S. Wuertz. 1999. Detection of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 65:2235-2237.
16. Campbell, G. R., J. Prosser, A. Glover, and K. Killham. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *J Appl Microbiol* 91:1004-10.
17. Carrera Vara, J., A. Caballero Torres, and M. E. Longomin Fernández. 1998. Vigilancia de *Sthaphylococcus* y *Salmonella* en alimentos, p. 16-19, *Rev.Cubana Nutr*, vol. 12.
18. Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33:248-50.
19. Chapman, P. A., M. Ellin, R. Ashton, and W. Shafique. 2001. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol* 15:11-20.
20. Chapman, P. A., C. A. Siddons, P. M. Zadik, and L. Jewes. 1991. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.* 35:107-10.

21. Chart, H., O. A. Okubadejo, and B. Rowe. 1991. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 108:77-85.
22. Chen, S., R. Xu, A. Yee, K. Y. Wu, C. N. Wang, S. Read, and S. A. De Grandis. 1998. An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl Environ Microbiol* 64:4210-6.
23. Chiu, C. H., and J. T. Ou. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol.* 34:2619-22.
24. Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi. 2000. A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. *Int J Hyg Environ Health* 203:159-64.
25. Cocolin, L., M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi. 1998. Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *J Appl Microbiol.* 85:673-7.
26. Cohen, H., S. M. Mechanda, and W. Lin. 1996. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella spp.* *Appl Environ Microbiol* 62:4303-4308.
27. Collazo, C. M., and J. E. Galan. 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*--a review. *Gene* 192:51-9.
28. D'Aoust, J. Y., P. Stotland, and A. Boville. 1982. Sampling methods for detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. *J. Food Sci.* 47:1643-1644.
29. De Boer, E., and A. E. Heuvelink. 2000. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Review. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* (29):133S-143S.
30. Desmarchelier, P. M., S. S. Bilge, N. Fegan, L. Mills, J. C. J. Vary, and P. I. Tarr. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 36:1801-4.
31. Duarte, G., M. Vaz-Velho, C. Capell, and P. Gibbs. 1999. Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing chains. *Int J Food Microbiol.* Nov 15 52:163-8.
32. Duffy, G., O. M. Cloak, J. J. Sheridan, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 1999. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction

- technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. *Int J Food Microbiol* 49:151-159.
33. Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19:1349.
 34. Ellingson, J. L., J. L. Anderson, S. A. Carlson, and V. K. Sharma. 2004. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol Cell Probes*. 18:51-7.
 35. Engles, B. 1992. *Amplify, for Analyzing PCR Experiments*, V1.2B ed. University of Wisconsin, Madison, WI 53706.
 36. Fach, P., F. Dilasser, J. Grout, and J. Tache. 1999. Evaluation of a polymerase chain reaction-based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples: Probabilia *Salmonella* spp. *J Food Prot.* 62:1387-93.
 37. Fagan, P. K., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, and S. P. Djordjevic. 1999. Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 65:868-72.
 38. Fagerberg, D. J., and J. S. Avens. 1976. Recovery of 61 *Salmonella* serotypes from artificially contaminated turkey skin. *Avian Dis.* 20:195-8.
 39. Farber, J. M., and P. I. Peterkins. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55:476-511.
 40. Feng, P., R. C. Sandlin, C. H. Park, R. A. Wilson, and M. Nishibuchi. 1998. Identification of a rough strain of *Escherichia coli* O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. *J Clin Microbiol* 36:2339-41.
 41. Feng, P., S. D. Weagant, and M. A. Grant. 1998. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition.
 42. Feng, P., S. D. Weagant, and S. R. Monday. 2001. Genetic Analysis for Virulence Factors in *Escherichia coli* O104:H21 That Was Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Colitis. *J Clin Microbiol* 39:24–28.
 43. Ferretti, R., I. Mannazzu, L. Cocolin, G. Comi, and F. Clementi. 2001. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl Environ Microbiol* 67:977-8.
 44. Fields, P. L., K. Blom, H. J. Hughes, L. O. Helsen, P. Feng, and B. Swaminathan. 1997. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-Restriction fragment length polymorphism test

- for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J. Clin. Microbiol.* 35:1066-70.
45. Fitter, S., M. Heveenroeder, and C. Thomas. 1992. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 73:53-59.
 46. Fluit, A. C., R. Toesma, M. J. Visser, C. J. Aarsman, M. J. Poppelier, B. H. Keller, K. P. Klapwijk, and J. Verhoef. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* 59:1289-1293.
 47. Fluit, A. C., M. N. Widjoatmodjo, A. T. Box, R. Toesma, and J. Verhoef. 1993. Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* 59:1342-1346.
 48. Franck, S. M., B. T. Bosworth, and H. W. Moon. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol.* 36:1795-7.
 49. Fratamico, P. M., L. K. Bagi, and T. Pepe. 2000. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J Food Prot* 63:1032-1037.
 50. Fratamico, P. M., R. L. Buchanan, and P. H. Cooke. 1993. Virulence of an *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol-positive mutant. *Appl Environ Microbiol* 59:4245-52.
 51. Fratamico, P. M., S. K. Sackitey, M. Wiedmann, and M. Y. Deng. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33:2188-91.
 52. Fratamico, P. M., and T. P. Strobaugh. 1998. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay, direct immunofluorescent filter technique, and multiplex polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* O157:H7 seeded in beef carcass wash water. *J Food Prot* 61:934-8.
 53. Fujisawa, T., S. Sata, K. Aikawa, T. Takahashi, S. Yamai, and T. Shimada. 2000. Modification of sorbitol MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Appl Environ Microbiol.* 66:3117-8.
 54. Gabis, D. A., and J. H. Silliker. 1974. International Commission on Microbiological Standards for Foods methods studies. II. Comparison of analytical schemes for detection of *Salmonella* in high-moisture foods. *Can.J.Microbiol.* 20:663.

55. Gado, I., P. Major, M. Kiraly, and M. G. Plaveczy. 2000. Rapid combined assay for *Salmonella* detection in food samples. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 47:445-56.
56. Galland, J. C., D. R. Hyatt, S. S. Crupper, and D. W. Acheson. 2001. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl Environ Microbiol* 67:1619-1627.
57. Gannon, V. P., M. Rashed, R. K. King, and E. J. Thomas. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:1268-74.
58. Gannon, V. P. J., S. D'Souza, T. Graham, R. K. King, K. Rahn, and S. Read. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin Microbiol* 35:656-662.
59. Giovannacci, I., C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J. L. Vendeuvre, V. Carlier, and G. Ermel. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int J Food Microbiol* 53:127-140.
60. Gooding, C. M., and P. V. Choudary. 1999. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 13:341-7.
61. Gray, M. L., H. J. Stafseth, F. Thorp, and W. F. Riley. 1948. A new technique for isolation of Listerellae from bovine brain. *J. Bact.* 55:471-476.
62. Gunzer, F., H. Bohm, H. Russmann, M. Bitzan, S. Aleksic, and H. Karch. 1992. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 30:1807-10.
63. Guo, X., J. Chen, R. E. Brackett, and L. R. Beuchat. 2001. Survival of *Salmonellae* on and in Tomato Plants from the Time of Inoculation at Flowering and Early Stages of Fruit Development through Fruit Ripening. *Appl. Environ. Microbiol* 67:4760-4764.
64. Gutiérrez-Cogco, L., L. Montiel-Vázquez, P. Aguilera-Perez., and M. C. González-Andrade. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Salud Pública de México* 42:490-495.
65. Hayes, P. S., K. Blom, P. Feng, J. Lewis, N. A. Strockbine, and B. Swaminathan. 1995. Isolation and characterization of a beta-D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. *J Clin Microbiol.* 33:3347-8.

66. Hayest, P. R. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos, Zaragoza, España.
67. Holland, J. L., L. Louie, A. E. Simor, and M. Louie. 2000. PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Directly from Stools: Evaluation of Commercial Extraction Methods for Purifying Fecal DNA. *J. Clin. Microbiol* 38:4108-4113.
68. Hudson, J. A., R. J. Lake, M. G. Savill, P. Scholes, and R. E. McCormick. 2001. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 2001 90:614-621.
69. Ibekwe, A. M., P. M. Watt, C. M. Grieve, V. K. Sharma, and S. R. Lyons. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl Environ Microbiol* 68:4853-62.
70. Johansson, T. 1998. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *Int J Food Microbiol.* 40:7-85.
71. Johnson, J. L., C. L. Brooke, and S. J. Fritschel. 1998. Comparison of the BAX for screening/*E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Appl Environ Microbiol* 64:4390-5.
72. Kantama, L., and P. Jayanetra. 1996. *Salmonella* enteritidis outbreak in Thailand: study by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27.
73. Karch, H., H. Bohm, H. Schmidt, F. Gunzer, S. Aleksic, and J. Heesemann. 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 31:1200-5.
74. Karch, H., T. Meyer, H. Rüssmann, and J. Heesemann. 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 60:3464-3467.
75. Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2:15-38.
76. Kawasaki, S., B. Kimura, and T. Fujii. 2001. Comparison of TaqMan *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of salmonella in meat samples. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42:33-39.
77. Landers, E., M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. 1998. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. *Int J Food Microbiol* 18:81-90.

78. Lang, A. L., T. Y.L., C. L. Mayer, K. C. Patton, and C. J. Palmer. 1994. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *Appl Environ Microbiol* 60:3145-9.
79. Li, W., and M. A. Drake. 2001. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 cells. *Appl Environ Microbiol* 67:3291-4.
80. Li, X., N. Boudjellab, and X. Zhao. 2000. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 56:167-177.
81. Lin, J. S., and H. Y. Tsen. 1999. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. *J Food Prot.* 62:1103-10.
82. Maciorowski, K. G., S. D. Pillai, and S. C. Ricke. 2000. Efficacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds. *J Appl Microbiol.* 89:710-8.
83. Makino, S., H. Kurazono, M. Chongsanguam, H. Hayashi, H. Cheun, S. Suzuki, and T. Shirahata. 1999. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp and its application for the inspection of food and fecal samples. *J Vet Med Sci* 61:1245-7.
84. Makino, S., Y. Okada, and T. Maruyama. 1995. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Appl Environ Microbiol* 61:3745-3747.
85. Malorny, B., J. Hoorfar, M. Hugas, A. Heuvelink, P. Fach, L. Ellerbroek, C. Bunge, C. Dorn, and R. Helmuth. 2003. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *Int J Food Microbiol.* 89:241-9.
86. Margall, N., A. Dominguez, G. Prats, and L. Salleras. 1997. Gastro-hemorrhagic *Escherichia coli*. *Rev Esp Salud Publica.* 71:437-43.
87. Margall, N., C. Frias, L. Gaztelurrutia, and G. Prats. 1995. Hemolytic-uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7. Detection in direct sample of verotoxin-coding genes. *Med Clin (Barc).* 104:344-8.
88. Maurer, J. J., Schmidt. D, P. Petrosko, S. Sanchez, L. Bolton, and M. D. Lee. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol* 65:2954-60.

89. McIngvale, S. C., D. Elhanafi, and M. A. Drake. 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 68:799-806.
90. McKillip, J. L., L. A. Jaykus, and M. A. Drake. 2000. A comparasion of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *J Appl Microbiol.* 89:49-55.
91. Nagano, H., T. Okui, O. Fujiwara, Y. Uchiyama, N. Tamate, H. Kumada, Y. Morimoto, and S. Yano. 2002. Clonal structure of Shiga toxin (Stx)-producing and β -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan. *J. Med. Microbiol.* 51:405-416.
92. Nastasi, A., C. Mammina, and R. Mioni. 1999. Detection of *Salmonella* spp. in food by a rapid PCR-hybridization procedure. *New Microbiol.* 22:195-202.
93. Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, and D. Lillehaug. 2000. Application of 5' nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol* 66:4266-4271.
94. NOM-114-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana para la determinaci3n de *Salmonella* en alimentos, Diario Oficial de la federaci3n, M3xico D. F.
95. NOM-143-SSA1-1996. 1996. Determinaci3n de *Listeria monocytogenes* en alimentos, Diario Oficial de la Federaci3n, M3xico D.F.
96. Norton, D. M., and C. A. Batt. 1999. Detection of viable *L. monocytogenes* with 5' nuclease PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 65:2122-2127.
97. Norton, D. M., M. McCamey, K. J. Boor, and M. Wiedmann. 2000. Application of the BAX for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. *J Food Prot.* 63:343-6.
98. Novicki, T. J., J. A. Daly, S. L. Mottice, and K. C. Carroll. 2000. Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 38:547-51.
99. O'Connor, L., J. Joy, M. Kane, T. Smith, and M. Maher. 2000. Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J.Food Prot.* 63:337-342.
100. Oberst, R. D., M. P. Hays, L. K. Bohra, R. K. Phebus, C. T. Yamashiro, C. Paszko-Kolva, S. J. Flood, J. M. Sargeant, and J. R. Gillespie. 1998. PCR-based

- DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol* 64:3389-96.
101. Olsvik, O., Y. Wasteson, A. Lund, and E. Hornes. 1991. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *Int J Food Microbiol* 12:103-13.
 102. Pass, M. A., R. Odedra, and R. M. Batt. 2000. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* (5):2001-4.
 103. Paton, A. W., and J. C. Paton. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* 36:598-602.
 104. Paton, A. W., and J. C. Paton. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J Clin Microbiol* 40:271-4.
 105. Paton, A. W., and J. C. Paton. 1999. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 37:3362-3365.
 106. Paton, A. W., M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, and J. C. Paton. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 37:3357-61.
 107. Paziak-Domanska, B., E. Boguslawska, M. Wieckowska-Szakiel, R. Kotlowski R, B., M. Chmiela, J. Kur, W. Dabrowski, and W. Rudnicka. 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiol Lett* 171:209-214.
 108. Peng, H., and L. A. Shelef. 2001. Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and salmonellae in foods. *Int J Food Microbiol* 63:225-233.
 109. Peng, H., and L. A. Shelef. 2000. Rapid detection of low levels of *Listeria* in foods and next-day confirmation of *L. monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 41:113-120.
 110. Peplow, M. O., M. Correa-Prisant, M. E. Stebbins, F. Jones, and P. Davies. 1999. Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Appl Environ Microbiol* 65:1055-60.
 111. Pierard, D. 1992. Infections with verotoxin-producing *Escherichia coli*. Review. *Acta Clin Belg.* 47:387-96.

112. Prats, G., C. Frias, N. Margall, T. Llovet, L. Gaztelurrutia, R. Elcuaz, A. Canut, R. M. Bartolome, L. Torroba, I. Dorronsoro, P. Coll, and B. Mirellis. 1996. Hemorrhagic colitis caused by verotoxigenic *Escherichia coli*. Presentation of 9 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 14:7-15.
113. Pritchard, T. J., and C. W. Donnelly. 1999. Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. *J Food Prot.* 62:532-5.
114. Quin, C., J. Ward, M. Griffin, D. Yearsley, and J. Egan. 1995. A comparison of conventional culture and three rapid methods for the detection of *Salmonella* in poultry feeds and environmental samples. *Lett Appl Microbiol* 20:89-91.
115. Radu, S., S. Abdul Mutalib, G. Rusul, Z. Ahmad, T. Morigaki, N. Asai, Y. B. Kim, J. Okuda, and M. Nishibuchi. 1998. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. *Appl Environ Microbiol.* 64:1153-6.
116. Radu, S., O. W. Ling, G. Rusul, M. I. Karim, and M. Nishibuchi. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol Methods* 46:131-139.
117. Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galán, C. Ginochio, R. Curtiss III, and G. L. Gyles. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes.* 6:271-279.
118. Ratnam, S., S. B. March, R. Ahmed, G. S. Bezanson, and S. Kasatiya. 1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol* 26:2006-12.
119. Rice, E. W., E. W. Sowers, C. H. Johnson, M. E. Dunnigan, N. A. Strockbine, and S. C. Edberg. 1992. Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol* 30:1315-6.
120. Rijpens, N., L. Herman, F. Vereecken, G. Jannes, J. De Smedt, and L. De Zutter. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *Int J Food Microbiol.* 46:37-44.
121. Rocelle, M., S. Clavero, and L. R. Beuchat. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl Environ Microbiol.* 61:3268-73.
122. Rychlik, I., L. van Kesteren, L. Cardova, A. Svestkova, R. Martinkova, and F. Sisak. 1999. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 29:269-72.

123. Sanderson, M. W., G. J.M., D. D. Hancock, C. C. Gay, L. K. Fox, and T. E. Besser. 1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J Clin Microbiol* 33:2616-9.
124. Santos, L. R., V. P. do Nascimento, S. D. de Oliveira, M. L. Flores, A. P. Pontes, A. R. Ribeiro, C. T. P. Salle, and R. F. F. Lopes. 2001. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Rev. Inst. Med trop S.Paulo* 43:247-250.
125. Scheu, P., A. Gasch, and K. Berghof. 1999. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. *Lett Appl Microbiol* 29:416-420.
126. Sharma, V. K., and S. A. Carlson. 2000. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *E. coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. *Appl Environ Microbiol.* 66:5472-5476.
127. Shearer, A. E., C. M. Strapp, and R. D. Joerger. 2001. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. *J Food Prot* 64:788-795.
128. Siang Hoong, D. T., A. L. Hui Ling, W. W. Heng Wai, and S. Phang. 2001. The application of molecular methods for the accurate detection, identification and characterization of *Salmonella* strains in foods. *Singapore Microbiologist. Microbiology and Biotechnology News.* March-June.
129. SSA, and L. N. d. S. Pública. 1994. Brote de intoxicación bacteriana por consumo de ensalada Cesar.
130. SSA, and Vigilancia Epidemiológica. 2000. Serotipos de *Salmonella* spp en alimentos aislados con mayor frecuencia 1990 - 1997. Secretaría de Salubridad y Asistencia.
131. Stefanovicová, A., H. Rehakova, A. Skarkova, N. Rijpens, and T. Kuchta. 1998. Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies by the polymerase chain reaction. *J Food Prot.* 61:1381-3.
132. Szych, J., J. Paciorek, A. Cieslik, and S. Kaluzewski. 1998. Characteristics of *E.coli* O157 strains isolated in Poland from clinical material and food samples. *Med Dosw Mikrobiol.* 50:179-96.
133. Trkov, M., I. Majerikova, B. Jerasek, A. Stefanovicova, N. Rijpens, and T. Kuchta. 1999. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiol* 16:393 - 399.

134. USDA, and F. S. a. I. Service. 2005. Isolation And Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples MLG 8.04, Microbiology Laboratory Guidebook, 4 ed, vol. 8.
135. Uyttendaele, M., C. Grangette, F. Rogerie, S. Pasteau, J. Debevere, and M. Lange. 1998. Influence of cold stress on the preliminary enrichment time needed for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 64:1640-3.
136. van Schothors, M., and F. M. van Leusden. 1975. Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products. *Can J. microbiol.* 21:1041-5.
137. Vantarakis, A., G. Komninou, D. Venieri, and M. Papapetropoulou. 2000. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp and *Shigella* spp in mussels. *Lett Appl Microbiol.* 31:105-9.
138. Vassiliadis, P., V. Kalapothaki, and D. Trichopoulos. 1991. Isolation of *Salmonella* from fluid milk with the use of Rappaport-Vassiliadis medium. *J.Food Prot.* 54:421.
139. Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi, and H. Nakanishi. 1997. A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 63:4127-4131.
140. Vertiev, I., M. E. Liaiman, G. A. Ugriumova, and T. I. Sergeeva. 2000. Detection of toxin-producing pathogenic bacterial strains by polymerase chain reaction. *Klin Lab Diagn* (8):46-50.
141. Vila, J., M. Vargas, J. Ruiz, F. Gallardo, M. T. Jimenez de Anta, and J. Gascon. 1997. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* O-rough:K1:H7 from two patients with traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol.* 35:2279-82.
142. Vuddhakul, V., N. Patararungrong, P. Pungrasamee, S. Jitsurong, T. Morigaki, N. Asai, and M. Nishibuchi. 2000. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 from retail beef and bovine feces in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 182:343-347.
143. Waage, A. S., T. Vardund, V. Lund, and G. Kapperud. 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J Appl Microbiol.* 87:418-28.
144. Wan, J., K. King, H. Craven, C. McAuley, S. E. Tan, and M. Coventry, J. 2000. Probeliatrade mark PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. *Lett Appl Microbiol.* 30:267-71.
145. Wang, G., C. G. Clark, and F. G. Rodgers. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7

- serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:3613-9.
146. Weagant, S. D., J. L. Bryant, and K. G. Jinneman. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *J. Food Prot* 58:7-12.
 147. Whittam, T. S., M. L. Wolfe, I. K. Wachsmuth, F. Orskov, I. Orskov, and R. A. Wilson. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* 61:1619–1629.
 148. WHO, and F. S. Programme. 2000. Food Safety. An essential Public Health Issue for the New Millenium. Department of Protection of the Human Environment. Cluster of Sustainable Development and Healthy Environments. World Health Organization, WHO/SDE/PHE/FOS/99.4.
 149. Wieckowska, M., R. Kotlowski, J. Kur, and W. Rudnicka. 1998. Use of PCR methods for identification of *Listeria monocytogenes* in milk. *Med Dosw Mikrobiol* 50:251-257.
 150. Wiedmann, M., F. Barany, and C. A. Batt. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nonisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* 59:2743-5.
 151. Winters, D. K., T. P. Maloney, and M. G. Johnson. 1999. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by a PCR assay specific for an aminopeptidase. *Mol Cell Probes* 13:127-131.
 152. Zadik, P. M., P. A. Chapman, and C. A. Siddons. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol.* 39:155-8.

RESUMEN CURRICULAR

Viviana Leticia Mata Tijerina

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: IMPLEMENTACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS
PATÓGENAS EN CARNE DE BÓVINO

Campo de Estudio: Microbiología de Alimentos

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México el 29 de Septiembre de
1978, hija de Eliodoro Mata Garza y Ma. Leticia Tijerina Cepeda.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2001.

Experiencia Profesional: Responsable de Laboratorio (Microbiología de Alimentos),
Laboratorios CIDEST, S.A. en el período de Noviembre 2000 a Mayo de 2001;
Jefe del Área de Microbiología de Alimentos en el Laboratorio Central Regional
de Monterrey, CFPPNL desde Febrero de 2004 a Diciembre de 2005
posteriormente Analista de Biología Molecular de la misma institución hasta la
fecha; consultor de México Calidad Suprema de Abril de 2006 a la fecha.