

## **INFORME TÉCNICO Nº 5**

### **PROYECTO**

**"IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS TRADICIONALES Y RÁPIDAS  
PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS Y LACTEOS"**

**Santiago, Diciembre de 2005.**

## INDICE

I.	Informe.....	3
A.	Descripción de la situación previa .....	3
B.- 1	Enumeración de las actividades .....	4
B.- 2	Detalle de las actividades realizadas .....	5
	Etapas IV: Desarrollo analítico .....	5
	<i>Actividad 18R: "Caracterización Técnica Listeria monocytogenes mediante PCR".....</i>	<i>5</i>
	<i>Actividad 24: "Caracterización Técnica Salmonella spp. mediante PCR" .....</i>	<i>6</i>
	<i>Actividad 15: "Implementación Técnica E. coli O157:H7 mediante PCR" .....</i>	<i>8</i>
	<i>Actividad 27: "Estandarización Técnica E. coli O157:H7 mediante PCR".....</i>	<i>9</i>
	<i>Actividad 28: "Caracterización Técnica E. coli O157 mediante PCR" .....</i>	<i>12</i>
	<i>Actividad 29: "Validación muestreo con esponja en carnes" .....</i>	<i>14</i>
	<i>Actividad 30: "Validación muestreo con enjuague en aves".....</i>	<i>16</i>
	<i>Actividad 32: "Análisis estadístico de los resultados" .....</i>	<i>18</i>
	<i>Actividad 34: "Manual de procedimientos técnicos" .....</i>	<i>26</i>
C.-	Estado de indicadores .....	27
D.-	Barreras encontradas .....	29
E.-	Logros alcanzados .....	29
F.-	Observaciones .....	30
G.-	Actualizaciones o modificaciones al diseño original.....	30
H. -	Referencias .....	30

## I. Informe

### A. Descripción de la situación previa

En este quinto informe se detallan las actividades realizadas en el marco del proyecto: "Implementación y validación de técnicas tradicionales y rápidas para la detección de patógenos en productos cárnicos y lácteos".

Como se ha señalado en los informes anteriores, los atrasos en la carta Gantt inicial y la consecuente reprogramación de gran parte de las actividades relacionadas con la técnica rápida de PCR, se debieron a la sugerencia del revisor quién solicitó apegarse más estrictamente a la normativa AFNOR. Esto significó enfrentar una serie de dificultades derivadas principalmente del número de cepas que se debía incluir en los ensayos, lo que a su vez produjo un desfase de los análisis entre la metodología tradicional y la metodología rápida. Las muestras debieron ser conservadas a -20°C durante aproximadamente 1 mes, lo que incidió en los resultados obtenidos por la metodología rápida, posiblemente por degradación del material genómico del patógeno, como se vio reflejado en los resultados informados anteriormente.

Tal como se acordó en la respuesta al informe de supervisión técnica nº 4 se realizaron nuevamente las muestras de *Salmonella spp.* que presentaron falsos negativos, las que se analizaron tanto por metodología tradicional como rápida. Estos resultados se incluyen en el presente informe, lo que permite discutir en relación a los falsos positivos y negativos que arroja la técnica rápida. Se incluye además los resultados de las actividades pendientes de la metodología de PCR para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, todas las actividades de la metodología PCR para *E. coli* O157:H7 y el análisis estadístico de los resultados de las 3 técnicas rápidas de PCR y de las 2 técnicas rápidas Lumiprobe.

En relación a *E. coli* O157:H7, lamentablemente y tal como se señaló en el informe técnico nº 4 y en la respuesta al informe de supervisión técnica nº 4, pese a las gestiones realizadas con los diferentes centros de microbiología (Laboratorios Microbiológicos de Universidades, Instituto de salud Pública) no fue posible conseguir el número de cepas de *E. coli* O157:H7 positivas sugerido por la normativa AFNOR, debiendo realizar el estudio con un número menor de cepas.

Con estas actividades se concluye con los objetivos planteados al inicio del proyecto.

## **B.- 1 Enumeración de las actividades**

Nº    ACTIVIDAD

### **Etapa IV: Desarrollo analítico:**

Actividad 18R: "Caracterización Técnica *Listeria monocytogenes* mediante PCR"

Actividad 24: "Caracterización Técnica *Salmonella spp.* mediante PCR"

Actividad 15: "Implementación Técnica *E. coli* O157:H7 mediante PCR"

Actividad 27: "Estandarización Técnica *E. coli* O157:H7 mediante PCR"

Actividad 28: "Caracterización Técnica *E. coli* O157:H7 mediante PCR"

Actividad 29: "Validación muestreo con esponja en carnes"

Actividad 30: "Validación muestreo con enjuague en aves"

Actividad 32: "Análisis estadístico de los resultados"

Actividad 34: "Manual de procedimientos técnicos"

## B.- 2 Detalle de las actividades realizadas

### Etapa IV: Desarrollo analítico

#### **Actividad 18R: "Caracterización Técnica *Listeria monocytogenes* mediante PCR"**

A continuación se muestra el total de muestras utilizadas para la caracterización de la técnica rápida para *Listeria monocytogenes* y se incluye los resultados obtenidos por la metodología tradicional (positivo o negativo) y su procedencia (artificial o naturalmente contaminada).

<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>		<b>Positivas</b>			<b>Negativas</b>		
<b>Categoría</b>		<b>naturales</b>	<b>artificiales</b>	<b>total</b>	<b>naturales</b>	<b>artificiales</b>	<b>total</b>
<b>Meat products</b>	carne bovino	0	19	19	15	28	43
	carne ovino	0	14	14	0	4	4
	carne porcino	0	9	9	0	4	4
	<b>Total</b>			<b>42</b>			<b>51</b>
<b>poultry</b>	carne pollo	3	35	38	12	25	37
	<b>Total</b>			<b>38</b>			<b>37</b>

Los resultados de los análisis de estas muestras tanto por la técnica de PCR como por la metodología tradicional se muestran en la tabla n° 1 del anexo. Tal como se señaló en el informe anterior, se repitieron los análisis de aquellas muestras donde no hubo correspondencia entre la metodología tradicional y la rápida, cuyos resultados se incorporaron en dicha tabla.

Con el propósito de facilitar el análisis de estos resultados se muestra en las siguientes tablas la correspondencia entre ambas metodologías agrupados por categoría del alimento analizado (meat y poultry), como lo solicita la Normativa AFNOR

<b>Resultado Categoría "meat"</b>		<b>N° de muestras</b>
<b>Referencia Tradicional</b>	<b>Alternativo PCR</b>	
Positivo	Positivo	41
Positivo	Negativo	2
Negativo	Negativo	41
Negativo	Positivo	10

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	36
Positivo	Negativo	5
Negativo	Negativo	32
Negativo	Positivo	1

La discusión de estos resultados se realiza junto al análisis estadístico el que se describe en la actividad 32 "Análisis estadístico de resultados" de este informe.

Con estos resultados se concluye la actividad 18 "Caracterización de Técnica PCR para *Listeria monocytogenes*".

#### **Actividad 24: "Caracterización Técnica Salmonella spp. mediante PCR"**

Al analizar los resultados obtenidos con la técnica de PCR para *Salmonella spp.*, tal como se comentó en la respuesta al informe de supervisión técnica, se observó que las muestras que arrojan "falsos negativos" corresponden a los grupos de muestras que fueron congeladas por un largo periodo de tiempo (1, 2 o 3 meses), en cambio no se observaron casos de "falsos negativos" en las muestras que fueron analizadas en un plazo corto (menos de 1 mes). Es por esto, que las muestras que estuvieron congeladas por más de 1 mes fueron desechadas y reemplazadas por nuevas, las que se analizaron en paralelo tanto por metodología rápida como por metodología tradicional.

A continuación se muestra el total de muestras utilizadas (incluyendo las nuevas muestras) para la caracterización de la técnica rápida para *Salmonella spp.*, se incluye los resultados obtenidos por la metodología tradicional (positivo o negativo) y su procedencia (artificial o naturalmente contaminada).

<b>Salmonella spp.</b>		<b>Positivas</b>			<b>Negativas</b>		
Categoría		naturales	artificiales	total	naturales	artificiales	total
Meat products	carne bovino	0	16	16	23	14	37
	carne ovino	0	8	8	0	4	4
	carne porcino	0	8	8	1	3	4
	<b>Total</b>			<b>32</b>			<b>45</b>
poultry	carne pollo	1	30	31	44	19	53
	<b>Total</b>			<b>31</b>			<b>63</b>

Los resultados de los análisis de estas muestras (incluyendo las muestras nuevas) tanto por la técnica de PCR como por la metodología tradicional se muestran en la tabla nº 2 del anexo.

Con el propósito de facilitar el análisis de estos resultados se muestra en las siguientes tablas la correspondencia entre ambas metodologías agrupados por categoría del alimento analizado (meat y poultry), como lo solicita la Normativa AFNOR

<b>Resultado Categoría "meat"</b>		
<b>Referencia Tradicional</b>	<b>Alternativo PCR</b>	<b>Nº de muestras</b>
Positivo	Positivo	32
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	45
Negativo	Positivo	0

<b>Resultado Categoría "poultry"</b>		
<b>Referencia Tradicional</b>	<b>Alternativo PCR</b>	<b>Nº de muestras</b>
Positivo	Positivo	30
Positivo	Negativo	1
Negativo	Negativo	63
Negativo	Positivo	0

La discusión de estos resultados se realiza junto al análisis estadístico el que se describe en la actividad 32 "Análisis estadístico de resultados" de este informe.

Con estos resultados se concluye la actividad 24 "Caracterización de Técnica PCR para *Salmonella spp*".

### **Actividad 15: "Implementación Técnica E. coli O157:H7 mediante PCR"**

Para llevar a cabo esta actividad se implementó 3 ensayos de PCR, 2 ensayos de PCR simple para la detección del serogrupo O157 y del serotipo H7 y 1 ensayo de PCR múltiple para la detección de los factores de virulencia y toxinas.

La implementación de los 2 primeros ensayos se describió en el informe anterior y a continuación se describe la implementación del ensayo de PCR múltiple.

#### Implementación del ensayo de PCR múltiple para detectar toxinas y factores de virulencia de E. coli O157:H7 :

Se implementó el protocolo de PCR descrito por Cagney y Crowley (3) sin embargo, ya que el costo de este ensayo es elevado debido a la gran concentración de partidores se implementó el protocolo descrito por Paton y Paton (1). Los resultados obtenidos utilizando ambos protocolos fueron similares, como se muestra en la figura 1 de anexos.

#### Implementación de métodos de extracción:

Con el propósito de establecer el protocolo de extracción mas apropiado se ensayó 3 métodos de extracción del material genético a partir del cultivo primario en caldo triptona de soya modificado con novobiocina, para las matrices de ave, bovino, ovino y porcino:

1. Método Roche, utilizado previamente para los análisis de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*
2. Método de extracción descrito por Gannon y cols (4).
3. Método de extracción de Gannon y cols. modificado, se diferencia del protocolo descrito en la literatura porque no se utiliza acetato de sodio.

Los mejores resultados se obtuvieron al realizar la extracción con el método de Roche y con el método de Gannon modificado. En la figura 2 de anexos se muestran los resultados de las amplificaciones, donde se ve que los productos de amplificación corresponden a los tamaños esperados de 534 pb, 384 pb y 255 pb correspondientes a los genes que codifican para los factores hemolisina, intimina y la toxina 2, respectivamente.

Se decidió utilizar el protocolo de Gannon modificado, ya que es más simple que el protocolo de Roche y por consiguiente requiere menos manipulación de las muestras, minimizando los problemas de contaminación entre éstas. Básicamente este protocolo consiste en centrifugar 1 ml del cultivo en caldo triptona de soya modificado con novobiocina con el objeto de precipitar los restos de alimento presentes en la muestra, el sobrenadante se traspara a otro tubo eppendorf y se lava con buffer Tris EDTA. La muestra se resuspende en el mismo buffer, se agrega lisozima y se incuba a 37°C. Posteriormente se agrega proteinasa K, Sarcosyl, se incuba a 65°C y se hierve por 10 minutos. Finalmente se deja enfriar, se agrega 1 ml de etanol absoluto frío y se deja precipitando a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugan las muestras, se lava el pellet con etanol 70%, se deja secar y se resuspende en agua.

Con estos experimentos se completa la implementación de la técnica de PCR en *E. coli* O157:H7.



### **Actividad 27: "Estandarización Técnica *E. coli* O157:H7 mediante PCR"**

**Especificidad:** Se logró conseguir sólo 8 cepas de *E. coli* O157:H7 positivas, las que fueron adquiridas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Chile y una cepa no toxigénica, adquirida en el ISP. Estas 9 cepas, incluidas en la tabla nº 3 del anexo, fueron analizadas mediante los 3 ensayos de PCR implementados. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura nº 3 del anexo correspondiente. Tal como se puede apreciar se observó los productos de amplificación esperados en 7 de las 8 cepas, en cambio en una de ellas se observó sólo el producto correspondiente a la verotoxina 2. Con el propósito de verificar nuestro resultado se solicitó el análisis de esta cepa al laboratorio de microbiología del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA), a cargo del Dr. Guillermo Figueroa, quien posee amplia experiencia en éste y otros patógenos. Los resultados informados por este laboratorio coincidieron con los resultados del PCR, por lo que la cepa en cuestión fue descartada como *E. coli* O157:H7.

Se realizaron los 3 ensayos de PCR a 30 cepas de bacterias distintas a *Escherichia coli* O157 (la lista de las cepas analizadas se incluye en la tabla nº 4 del anexo). Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura nº 4, no observándose en ninguno de los casos productos de amplificación.

**Sensibilidad:** Tal como se reportó en el informe anterior, quedaba pendiente realizar la curva de calibración, cultivo e inoculación de las muestras de carne y ave con 2 cepas de *E. coli* O157:H7. Esta actividad se desarrolló del mismo modo indicado en el informe anterior, es decir, se utilizó un cultivo líquido de 24 horas, según el protocolo descrito por AFNOR. Se realizó una curva de calibración con 2 cepas de *E. coli* O157:H7, a fin de asegurar el nivel de contaminación requerido. Para esto se cultivó la cepa en medio de cultivo por 24 horas, luego se realizaron diluciones en duplicado para determinar el rango lineal de la absorbancia a 600 nm y de las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante plaqueo. Los valores obtenidos fueron relacionados algebraicamente con las diluciones efectuadas y finalmente entre ellos, obteniéndose una ecuación general para la relación entre las unidades formadoras de colonias presentes en medio líquido, y la absorbancia medida, dentro del rango lineal. Los resultados se pueden observar en los gráficos nº 1 y 2, y en la tabla nº 5 del anexo.

Con esta información se procedió a realizar la inoculación de las matrices: ovino, bovino, ave y porcino utilizando las cepas 17 y 19 de *Escherichia coli* O157:H7 con un nivel de contaminación de entre 10 y 100 UFC. La inoculación de las matrices se realizó según lo que indica el Manual de AFNOR, agregando 0.4 ml del cultivo de 24 h por 25 g de muestra, diluido en el medio de cultivo hasta alcanzar la cantidad teórica de 125 UFC/ml. Además se plaqueó 1 ml de cultivo diluido, con el objeto de corroborar este rango de bacterias.

Las muestras fueron confirmadas según la metodología tradicional ISO descrita en el informe técnico nº 3.

Los cultivos obtenidos fueron homogenizados por congelamiento y ruptura, utilizando nitrógeno líquido, posteriormente se procedió a realizar diluciones de estos cultivos, a fin de obtener los distintos niveles de bacterias requeridos por AFNOR (0, 1 a 10, 2 a 20, 5 a 50 y 10 a 100). Se realizó, en duplicado, la extracción del ADN y

amplificación por PCR según las condiciones descritas en la actividad nº 15. Los geles que ilustran los resultados se observan en las figuras 5 A - F del anexo.

La sensibilidad del método desarrollado para cada ensayo se describe en las siguientes tablas:

Sensibilidad para la detección del ensayo 2: O157

Mínimo de UFC detectadas	Ave	Bovino	Porcino	Ovino
E. coli 17	1 - 10	1 - 10	1 - 10	2 - 20
E. coli 13	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 16	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 19	1 - 10	1 - 10	1 - 10	2 - 20

Sensibilidad para la detección del ensayo 3: H7

Mínimo de UFC detectadas	Ave	Bovino	Porcino	Ovino
E. coli 17	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 13	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 16	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 19	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10

Sensibilidad para la detección del ensayo 1: Factor Hemolisina

Mínimo de UFC detectadas	Ave	Bovino	Porcino	Ovino
E. coli 17	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 13	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 16	1 - 10	1 - 10	1 - 10	5 - 50
E. coli 19	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10

Sensibilidad para la detección del ensayo 1: Factor Intimina

Mínimo de UFC detectadas	Ave	Bovino	Porcino	Ovino
E. coli 17	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 13	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 16	1 - 10	1 - 10	1 - 10	5 - 50
E. coli 19	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10

Sensibilidad para la detección del ensayo 1: Verotoxina 2

Mínimo de UFC detectadas	Ave	Bovino	Porcino	Ovino
E. coli 17	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 13	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10
E. coli 16	1 - 10	1 - 10	1 - 10	5 - 50
E. coli 19	1 - 10	1 - 10	1 - 10	1 - 10

Se obtuvo distintos niveles de sensibilidad para los diferentes ensayos de PCR realizados, mostrando variaciones según la matriz:

- En el ensayo de PCR para detectar el serotipo H7 se obtuvo la máxima sensibilidad para todas las matrices y cepas analizadas.
- En el ensayo de PCR para detectar el serogrupo O157 el nivel de detección resultó ser de 1 a 10 UFC/25gr para las matrices de ave, bovino y porcino, en cambio para la matriz de ovino se obtuvo un grado menor de sensibilidad (2 a 20 UFC/25gr) para 2 de las 4 cepas analizadas.
- Los resultados obtenidos para el ensayo múltiple de los factores de virulencia (hemolisina e intimina) y la veroxina 2, fueron los siguientes: Para las matrices de ave, bovino y porcino se obtuvo máxima sensibilidad en todos los casos, la matriz de ovino presentó un nivel de detección de 5 a 50 UFC/25 gr para los 3 productos de PCR en una de las cepas.

En resumen, con los ensayos de PCR implementados es posible detectar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 con un nivel de sensibilidad de 1 a 10 UFC/25 gr, excepto para la matriz de ovino, que posee un nivel de 2 a 20 UFC/25 gr en el ensayo para detectar el serogrupo O157.

Reproducibilidad: Se analizó la reproducibilidad del ensayo. Para esto se analizaron por triplicado, 5 muestras de cultivos de alimentos artificialmente contaminados. Estas muestras fueron sometidas a homogenización con nitrógeno líquido, extracción del ADN y PCR según las condiciones descritas en el informe.

Se observó reproducibilidad en los resultados acorde con los niveles de sensibilidad descritos en el punto anterior, excepto para el ensayo 2 en la matriz Ave. El detalle de los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 6 A – F del anexo, y se resumen en la siguiente tabla:

matriz	cepa	nivel	E1			E2	E3
			534 pb	384 pb	255 pb		
Porcino	E. coli 19	5 - 50	+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+
Ave	E. coli 16	5 - 50	+	+	+	-	+
			+	+	+	-	+
			+	+	+	+	+
Ovino	E. coli 17	5 - 50	-	-	-	+	+
			+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+
Porcino	E. coli 16	5 - 50	+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+
Ovino	E. coli 16	2 - 20	-	-	-	+	+
			-	-	-	-	+
			-	-	-	-	+

Con estos resultados concluye la actividad 27: "Estandarización Técnica *E. coli* O157:H7 mediante PCR".

**Actividad 28: "Caracterización Técnica E. coli O157 mediante PCR"**

La normativa AFNOR para la validación de métodos alternativos, contempla el análisis simple de al menos 30 muestras positivas y 30 muestras negativas por categoría de alimento. Al igual que para *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, las categorías a validar en este trabajo son: 1) *meat products*, que incluye las carnes de porcino, ovino y bovino, y 2) *poultry*, correspondiente a carne de ave.

Debido a que la metodología tradicional sólo es capaz de detectar el serogrupo O157, no es posible caracterizar la técnica de PCR para el serotipo H7, los factores de virulencia y toxinas.

Se realizó el análisis de las muestras a partir del medio de cultivo caldo triptona de soya modificado con novobiocina. El material genético presente en las muestras fue extraído utilizando el protocolo descrito en la actividad nº 15, y posteriormente amplificado mediante el ensayo 2 de PCR (serogrupo O157) implementado y estandarizada según se describió anteriormente.

A continuación se muestra el total de muestras utilizadas para la caracterización de la técnica rápida para *E. coli* O157, se incluye los resultados obtenidos por la metodología tradicional (positivo o negativo) y su procedencia (artificial o naturalmente contaminada).

<b>Escherichia coli O157:H7</b>		Positivas			Negativas		
Categoría		Naturales	Artificiales	Total	Naturales	Artificiales	Total
Meat products	carne bovino	0	14	14	15	10	25
	carne ovino	0	14	14	0	8	8
	carne porcino	0	16	16	0	6	6
	<b>Total</b>			<b>44</b>			<b>39</b>
poultry	carne ave	0	36	36	15	19	34
	<b>Total</b>			<b>36</b>			<b>34</b>

Los resultados obtenidos para la etapa de caracterización de la técnica *Escherichia coli* O157 mediante PCR están detallados en la tabla nº 6 del anexo correspondiente.

Con el propósito de facilitar el análisis de estos resultados se muestra en las siguientes tablas la correspondencia entre ambas metodologías agrupados por categoría del alimento analizado (meat y poultry), como lo solicita la Normativa AFNOR

<b>Resultado Categoría "meat"</b>		
<b>Referencia Tradicional</b>	<b>Alternativo PCR</b>	<b>Nº de muestras</b>
Positivo	Positivo	44
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	38
Negativo	Positivo	1

<b>Resultado Categoría "poultry"</b>		
<b>Referencia Tradicional</b>	<b>Alternativo PCR</b>	<b>Nº de muestras</b>
Positivo	Positivo	36
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	31
Negativo	Positivo	3

La discusión de estos resultados se realiza junto al análisis estadístico, el que se describe en la actividad 32 "Análisis estadístico de resultados" de este informe.

Con estos resultados se concluye la actividad 28 "Caracterización de Técnica PCR para *E. coli* O157". El análisis estadístico de estos resultados se encuentra descrito en la actividad 32 "Análisis estadístico de los resultados" de este informe.

**Actividad 29: "Validación muestreo con esponja en carnes"**

Se analizaron 5 muestras en triplicado de muestreo por esponja en carnes, mediante la técnica de PCR e ISO, para detectar la presencia de *E. coli* O157. Los resultados obtenidos con la técnica tradicional y PCR son los siguientes:

	Tradicional	PCR
Muestra 1	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 2	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 3	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 4	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 5	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa

Ya que resultaba interesante evaluar la posible presencia de productos de amplificación para los fragmentos de los genes asociados al serotipo H7, verotoxinas y factores de virulencia, se realizaron todos los ensayos de PCR implementados en este proyecto sobre el DNA proveniente del muestreo mediante esponja en bovino. En la siguiente tabla se describen los resultados obtenidos en cada ensayo de PCR.

	O157	H7	Intimina	Hemolisina	verotoxina 2
Muestra 1	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
Muestra 2	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
Muestra 3	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Muestra 4	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
Muestra 5	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Se observa la presencia de productos de amplificación correspondiente a los genes asociados al serotipo H7 y al factor de virulencia intimina.

Estos resultados se pueden explicar por la presencia de otras bacterias en la muestra que pueden presentar alta homología con estos genes. Para comprobar esto se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank, donde se encuentra almacenada la información de más de 100 giga bases de organismos secuenciados. Mediante el algoritmo de búsqueda BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) se buscaron genes cuyas secuencias alinean con los partidores utilizados en estos ensayos de PCR de esta forma se obtendría un producto de amplificación del tamaño esperado para *Escherichia coli* O157:H7. A continuación se detalla el resultado de este análisis:

- En el caso de los partidores utilizados para detectar el serotipo H7 se obtienen alineamientos para otras cepas de *Escherichia coli*, como por ejemplo, A64, D-M3291/54, U5-41, A1107, A62, A57. La lista completa de alineamientos para los partidores asociados al serotipo H7 se encuentra en la tabla nº 7.
- En el caso de los partidores utilizados para detectar el factor de virulencia intimina se obtienen alineamientos significativos con bacterias como: *Shigella boydii* cepas K-694, C-425, 3097-02, 3555-77, K-1; *Escherichia albertii* cepa 19982, *Escherichia coli* cepas EPEC-FV5114/1-3933/5/1, AEEC-H03/53199<sup>a</sup>, EPEC-FV5109-4113/1, EPEC-FV5113-4115/2. La lista completa de alineamientos para los partidores asociados al factor de virulencia intimina de encuentra en la tabla nº 8.
- Al realizar el mismo estudio de homología para los partidores asociados al serogrupo O157, se encontró que solo hay alineamientos de alta homología con *Escherichia coli* O157:H7, lo que muestra la especificidad del ensayo caracterizado. La lista completa de las secuencias que poseen alineamientos con los partidores asociados al serogrupo O157 se encuentra en la tabla nº 9 del anexo correspondiente.

**Actividad 30: "Validación muestreo con enjuague en aves"**

Se analizaron mediante la técnica de PCR e ISO, 5 muestras en triplicado de muestreo por enjuague en aves. Los resultados obtenidos con la técnica tradicional y PCR son los siguientes:

	<b>Tradicional</b>	<b>PCR</b>
Muestra 1	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 2	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 3	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 4	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
	Negativa	Negativa
Muestra 5	Negativa	<i>Positiva</i>
	Negativa	<i>Positiva</i>
	Negativa	<i>Positiva</i>

En este muestreo de enjuague de ave se detectó mediante PCR la presencia de *Escherichia coli* O157:H7, obteniéndose el mismo resultado en los triplicados de una de las muestras. Cabe destacar que la amplificación del fragmento de 259 pb correspondiente al serogrupo O157 fue débil, como se puede observar en la figura 7. Debido a que el PCR es un método más sensible que la metodología tradicional, no es de extrañar que la presencia de esta bacteria no fuera detectada mediante dicha metodología.

Ya que resultaba interesante evaluar la posible presencia de productos de amplificación para los fragmentos de los genes asociados al serotipo H7, verotoxinas y factores de virulencia, se realizaron todos los ensayos de PCR implementados en este proyecto sobre el DNA proveniente del muestreo mediante enjuague en ave.



En la siguiente tabla se describen los resultados obtenidos en cada ensayo de PCR.

	<b>O157</b>	<b>H7</b>	<b>Intimina</b>	<b>Hemolisina</b>	<b>verotoxina 2</b>
Muestra 1	Negativa	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa
Muestra 2	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa
Muestra 3	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa
Muestra 4	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	Negativa	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
Muestra 5	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa
	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa
	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>	Negativa	Negativa	Negativa

Se observa la presencia de productos de amplificación correspondiente a los genes asociados al serotipo H7, al factor de virulencia intimina y hemolisina. Al igual a lo comentado en la actividad anterior, estos resultados se pueden explicar por la presencia de otras bacterias en la muestra que presentan dichos genes, cuyas secuencias tienen una alta homología.

– En este muestreo en aves se encontraron además productos de amplificación correspondiente a los genes asociados al factor de virulencia hemolisina. Al realizar el mismo estudio de homología para los partidores asociados a este factor de virulencia se encontró homología con secuencias de algunas cepas de *Escherichia coli*, como por ejemplo: EH41, H7 (EDL 933), EHEC. La lista completa de las secuencias que poseen alineamientos con los partidores asociados al factor de virulencia hemolisina se encuentra en la tabla nº 10 del anexo correspondiente.

### **Actividad 32: “Análisis estadístico de los resultados”**

La normativa AFNOR establece que los resultados de la etapa de caracterización se expresen en términos de acuerdos, falsos positivos y falsos negativos.

Sin embargo, para tener una mejor apreciación del método alternativo, se pueden calcular los siguientes estadísticos contemplados en la normativa ISO (6).

- **Exactitud relativa (AC):** Es el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida con el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo, sobre muestras idénticas. Se calcula de la siguiente forma:

$$AC = \frac{(AP + AN)}{N} \cdot 100 \% ^1$$

- **Sensibilidad relativa (SE):** Es la habilidad del método alternativo para detectar al analito, cuando este es detectado por el método de referencia. Se calcula de la siguiente forma:

$$SE = \frac{AP}{N+} \cdot 100 \% ^1$$

- **Especificidad relativa (SP):** Es la habilidad del método alternativo para no detectar al analito, cuando este no es detectado por el método de referencia. Se calcula de la siguiente forma:

$$SP = \frac{AN}{N-} \cdot 100 \% ^1$$

---

<sup>1</sup> Donde: **AP** es el número de acuerdo positivos, **AN** es el número de acuerdos negativos, **FP** es el número de falsos positivos y **FN** es el número de falsos negativos, **N** es el número total de muestras ( $AN + FP + FN + AP$ ), **N-** es el número total de resultados negativos con el método de referencia ( $AN + FP$ ) y **N+** es el número total de resultados positivos con el método de referencia ( $AP + FN$ )

Análisis estadístico de la metodología PCR para *Listeria monocytogenes* comparada con metodología tradicional:

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla n° 1 del anexo, y se resumen en la siguiente tabla:

Resultado Categoría "meat"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	41
Positivo	Negativo	2
Negativo	Negativo	41
Negativo	Positivo	10

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	36
Positivo	Negativo	1
Negativo	Negativo	32
Negativo	Positivo	5

La normativa AFNOR solicita que los resultados se expresen de la siguiente forma:

**Categoría "meat products"**

- Número de concordancias (AP + AN): 82
- Número de Falsos Positivos (FP): 10
- Número de Falsos Negativos (FN): 2

**Categoría "poultry"**

- Número de concordancias (AP + AN): 68
- Número de Falsos Positivos (FP): 5
- Número de Falsos Negativos (FN): 1

Los estadísticos ISO (6) que describen la metodología alternativa PCR para *Listeria monocytogenes* son los siguientes:

**Categoría "Meat products"**

- Exactitud relativa (AC): 87,2%
- Sensibilidad relativa (SE): 95,3%
- Especificidad relativa (SP): 80,4%

**Categoría "Poultry"**

- Exactitud relativa (AC): 91,1%
- Sensibilidad relativa (SE): 97,3%
- Especificidad relativa (SP): 86,5%

Análisis estadístico de la metodología PCR para *Salmonella spp.* comparada con metodología tradicional:

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla n° 2 del anexo, y se resumen en la siguiente tabla:

Resultado Categoría "meat"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	32
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	45
Negativo	Positivo	0

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	30
Positivo	Negativo	1
Negativo	Negativo	63
Negativo	Positivo	0

La normativa AFNOR solicita que los resultados se expresen de la siguiente forma:

**Categoría "meat products"**

- Número de concordancias (AP + AN): 77
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 0

**Categoría "poultry"**

- Número de concordancias (AP + AN): 93
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 1

Los estadísticos ISO (6) que describen la metodología alternativa PCR para *Salmonella spp.* son los siguientes:

**Categoría "Meat products"**

- Exactitud relativa (AC): 100%
- Sensibilidad relativa (SE): 100%
- Especificidad relativa (SP): 100%

**Categoría "Poultry"**

- Exactitud relativa (AC): 98,9%
- Sensibilidad relativa (SE): 96,8%
- Especificidad relativa (SP): 100 %

Análisis estadístico de la metodología PCR para *Escherichia coli* O157 comparada con metodología tradicional:

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla nº 6 del anexo, y se resumen en la siguiente tabla:

Resultado Categoría "meat"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	44
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	38
Negativo	Positivo	1

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	36
Positivo	Negativo	0
Negativo	Negativo	31
Negativo	Positivo	3

La normativa AFNOR solicita que los resultados se expresen de la siguiente forma:

**Categoría "meat products"**

- Número de concordancias (AP + AN): 82
- Número de Falsos Positivos (FP): 1
- Número de Falsos Negativos (FN): 0

**Categoría "poultry"**

- Número de concordancias (AP + AN): 67
- Número de Falsos Positivos (FP): 1
- Número de Falsos Negativos (FN): 0

Los estadísticos ISO (6) que describen la metodología alternativa PCR para *Escherichia coli* O157 son los siguientes:

**Categoría "Meat products"**

- Exactitud relativa (AC): 98,8 %
- Sensibilidad relativa (SE): 100 %
- Especificidad relativa (SP): 97,4 %

**Categoría "Poultry"**

- Exactitud relativa (AC): 95,7 %
- Sensibilidad relativa (SE): 100 %
- Especificidad relativa (SP): 91,2 %

Análisis estadístico de la metodología LUMIPROBE para *Listeria monocytogenes* comparada con metodología tradicional:

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla nº 3 los anexos del informe técnico nº 4, y se resumen en la siguiente tabla:

Resultado Categoría "meat"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	31
Positivo	Negativo	8
Negativo	Negativo	34
Negativo	Positivo	0

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	31
Positivo	Negativo	5
Negativo	Negativo	30
Negativo	Positivo	0

Con lo que se obtuvieron:

**Categoría "meat products"**

- Número de concordancias (AP + AN): 65
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 8

**Categoría "poultry"**

- Número de concordancias (AP + AN): 61
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 5

Los estadísticos ISO (6) que describen la metodología alternativa LUMIPROBE para *Listeria monocytogenes*. son los siguientes:

**Categoría "Meat products"**

- Exactitud relativa (AC): 89,0%
- Sensibilidad relativa (SE): 79,5%
- Especificidad relativa (SP): 100%

**Categoría "Poultry"**

- Exactitud relativa (AC): 92,4%
- Sensibilidad relativa (SE): 86,1%
- Especificidad relativa (SP): 100 %

Análisis estadístico de la metodología LUMIPROBE para *Salmonella spp.* comparada con metodología tradicional:

Los resultados obtenidos están detallados en la tabla nº 4 los anexos del informe técnico nº 4, y se resumen en la siguiente tabla:

Resultado Categoría "meat"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	15
Positivo	Negativo	23
Negativo	Negativo	20
Negativo	Positivo	0

Resultado Categoría "poultry"		
Referencia Tradicional	Alternativo PCR	Nº de muestras
Positivo	Positivo	24
Positivo	Negativo	12
Negativo	Negativo	37
Negativo	Positivo	0

Con lo que se obtuvieron:

**Categoría "meat products"**

- Número de concordancias (AP + AN): 35
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 23

**Categoría "poultry"**

- Número de concordancias (AP + AN): 61
- Número de Falsos Positivos (FP): 0
- Número de Falsos Negativos (FN): 12

Los estadísticos ISO (6) que describen la metodología alternativa LUMIPROBE para *Salmonella spp.* son los siguientes:

**Categoría "Meat products"**

- Exactitud relativa (AC): 60,3%
- Sensibilidad relativa (SE): 39,5%
- Especificidad relativa (SP): 100%

**Categoría "Poultry"**

- Exactitud relativa (AC): 83,6%
- Sensibilidad relativa (SE): 66,7%
- Especificidad relativa (SP): 100 %

Comparación de métodos alternativos:

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los valores de los estadísticos que representan los resultados obtenidos por ambas metodologías alternativas:

	<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Salmonella spp.</i>			
	Categoría "Meat"		Categoría "Poultry"		Categoría "Meat"		Categoría "Poultry"	
	PCR	Lumiprobe	PCR	Lumiprobe	PCR	Lumiprobe	PCR	Lumiprobe
Falsos Positivos (%)	12	0	7	0	0	0	0	0
Falsos Negativos (%)	2	12	1	8	0	65	1	19
Exactitud relativa (%)	87	89	91	92	100	60	98	83
Sensibilidad relativa (%)	95	79	97	86	100	39	96	66
Especificidad relativa (%)	80	100	86	100	100	100	100	100

Se observa que para el caso de *Listeria monocytogenes* las exactitudes relativas de ambos métodos son similares, sin embargo, hay una gran diferencia en el caso de *Salmonella spp.* obteniéndose mejores resultados con la técnica de PCR.

En el caso de los falsos positivos, estos solo se observaron en los análisis por PCR para el caso de la bacteria *Listeria monocytogenes*, en ambas categorías. Ya que como se ha explicado anteriormente las muestras se conservaron refrigeradas por algún período de tiempo, no se puede descartar que este resultado se deba a la proliferación del patógeno durante el tiempo transcurrido entre el análisis tradicional y el análisis por PCR, ya que la bacteria *Listeria monocytogenes* es capaz de proliferar aún en esas condiciones.

En cambio, en el caso de los falsos negativos, el análisis mediante PCR arrojó un bajo o nulo porcentaje de falsos negativos en todos los casos, sin embargo, el análisis por LUMIPROBE obtuvo siempre tasas de error por sobre el 12%, llegando incluso a un 65,7% de falsos negativos para *Salmonella spp.* en la categoría "meat".

Al comparar ambas técnicas rápidas, se puede concluir que la metodología desarrollada mediante PCR muestra mejores resultados que la técnica LUMINIPROBE. Para *Salmonella spp.* el PCR resulta superior tanto en términos de exactitud, sensibilidad y especificidad. En el caso de *Listeria monocytogenes* presenta mayor sensibilidad que la metodología alternativa LUMIPROBE, la misma exactitud, aún cuando tiende a detectar falsos positivos con mayor frecuencia (lo que podría deberse a lo explicado anteriormente).



Resumen de resultados estadísticos de los métodos alternativos mediante PCR:

	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella spp.</i>		<i>E. coli O157:H7</i>	
	Categoría "Meat"	Categoría "Poultry"	Categoría "Meat"	Categoría "Poultry"	Categoría "Meat"	Categoría "Poultry"
Falsos Positivos (%)	12,2	7,4	0	0	1,2	1,5
Falsos Negativos (%)	2,4	1,5	0	1,1	0	0
Exactitud relativa (%)	87,2	91,9	100	98,9	98,8	95,7
Sensibilidad relativa (%)	95,3	97,3	100	96,8	100	100
Especificidad relativa (%)	80,4	86,5	100	100	97,4	91,2

En este resumen de los valores estadísticos obtenidos para las 3 técnicas implementadas y validadas, se puede observar que los resultados obtenidos son altamente satisfactorios, pues se logró obtener metodologías alternativas con un gran nivel de exactitud relativa a la metodología tradicional, especialmente para la detección de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 para todas las matrices cárnicas, donde se obtuvieron niveles de exactitud por sobre el 95%.

Cabe destacar que la sensibilidad relativa de los métodos, es decir, la habilidad del método alternativo para detectar al patógeno, cuando este es detectado por el método de referencia, es sobre el 95% para todos los patógenos. En el caso de *Salmonella spp* se eliminaron del estudio todas las muestras que permanecieron congeladas por más de un mes entre la detección por metodología tradicional y por PCR, y se analizaron muestras nuevas obteniendo así resultados mas fidedignos a los entregados en el informe técnico anterior.

Los valores obtenidos para la especificidad relativa de los métodos por PCR, es decir, la habilidad del método alternativo para no detectar al patógeno cuando este no es detectado por el método de referencia, concuerdan con el hecho que el diagnóstico por PCR es capaz de identificar patógenos que no son detectados por la metodología tradicional. Este mismo fenómeno se observó para *Escherichia coli* O157:H7, mediante PCR se logró detectar la presencia del patógeno en los triplicados de una de las muestras de enjuague de ave.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, a pesar de que en la metodología tradicional se utilizan medios de cultivo específicos, el patógeno se puede perder en las etapas de cultivo debido a la competencia con otras bacterias presentes en la muestra, obteniendo un resultado negativo al final del proceso a pesar de que la bacteria se encontraba presente en la muestra inicial. Debido a que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo capaz de sobrevivir a la congelación, e incluso proliferar a 4°C, puede multiplicarse en alimentos aun cuando estos sean transportados en cadenas de frío y ser detectados en el destino final. La técnica de PCR puede ser muy útil en estos casos pues puede entregar resultados sensibles en 2 días.

**Actividad 34: “Manual de procedimientos técnicos”**

Se elaboraron los manuales de procedimientos para la técnica de PCR en *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7 según la técnica de PCR. Estos se encuentran adjuntos en el anexo.

### C.- Estado de indicadores

ETAPA	ACTIVIDAD	INDICADOR DE ÉXITO	PERIODO DE OCURRENCIA	RESULTADO
Etapa IV	<b>Actividad 18 R:</b> <i>Caracterización Técnica Listeria monocytogenes mediante PCR</i>	Caracterización de la técnica de diagnostico molecular implementada y estandarizada.	Meses 19 y 20	Se repitieron muestras para lograr caracterizar la técnica, determinando correspondencia, % de falsos positivos y falsos negativos.
Etapa IV	<b>Actividad 24:</b> <i>Caracterización Técnica Salmonella spp. mediante PCR</i>	Caracterización de la técnica de diagnostico molecular implementada y estandarizada.	Meses 19 y 20	Se repitieron muestras para lograr caracterizar la técnica, determinando correspondencia, % de falsos positivos y falsos negativos.
Etapa IV	<b>Actividad 15</b> <i>Implementación Técnica E. coli O157:H7 PCR.</i>	Implementación de la técnica PCR para identificar <i>E. coli</i> O157:H7.	Meses 20 y 21	Se logró implementar una serie de 3 ensayos de PCR para detectar <i>E. coli</i> O157:H7.
Etapa IV	<b>Actividad 27</b> <i>Estandarización Técnica E. coli O157:H7mediante PCR</i>	Estandarización de las técnicas de diagnostico molecular por metodología AFNOR	Meses 21 y 22	Se determino la especificidad, sensibilidad y repetibilidad de la técnica de diagnóstico molecular para las matrices ave, bovino, ovino y porcino
Etapa IV	<b>Actividad 28:</b> <i>Caracterización Técnica E. coli O157:H7 mediante PCR</i>	Caracterización de la técnica de diagnostico molecular implementada y estandarizada.	Meses 22 y 23	Se caracterizó la técnica, determinando correspondencia, % de falsos positivos y falsos negativos.
Etapa IV	<b>Actividad29</b> <i>Validación muestreo con esponja en carnes</i>	Análisis por PCR de muestras tomadas según la técnica de muestreo del Manual del SAG utilizando referencia norma	Mes 26	Se determinó la presencia o ausencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en carnes muestreadas mediante esponja.

		ISO 17604		
<b>Etapa IV</b>	<b>Actividad 30</b> Validación de muestreo con enjuague en aves	Análisis por PCR de muestras tomadas según la técnica de muestreo del Manual del SAG utilizando referencia norma ISO 17604	Mes 26	Se determinó la presencia o ausencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en aves muestreadas mediante enjuague.
<b>Etapa IV</b>	<b>Actividad 32</b> Análisis estadístico de los resultados	Obtención de parámetros estadísticos para caracterizar la técnica.	Meses 20 y 26	Se determinó el nivel de concordancia, falsos positivos, falsos negativos, exactitud relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de las 3 técnicas de PCR.
<b>Etapa IV</b>	<b>Actividad 34</b> Manual de procedimientos técnicos	Elaboración de un manual con los procedimientos desarrollados	Meses 19 y 21	Se elaboraron manuales con los procedimientos desarrollados mediante PCR para los 3 patógenos.

**Nota:** En este punto se incluyen sólo las actividades realizadas hasta la fecha.

#### **D.- Barreras encontradas**

Nuevamente una de las barreras más determinantes encontradas fue la dificultad para adquirir muestras de *E. coli* O157:H7. A pesar de los esfuerzos realizados fue imposible acceder al cepario del Instituto de Salud Pública.

Además, los atrasos en la realización de las actividades relacionadas con la técnica PCR significó congelar las muestras de medio de cultivo de la técnica tradicional, debido a esto fue necesario repetir algunas muestras de la etapa de caracterización de *Salmonella spp.* que arrojaron resultados discordes a la técnica de referencia, posiblemente debido a la degradación del material genético.

Finalmente, debido a que solo se dispone de metodología de referencia para detectar *Escherichia coli* O157, y no para el serotipo H7 o los factores de virulencia y verotoxinas, solo se puede realizar la caracterización del método para ese serogrupo.

#### **E.- Logros alcanzados**

A pesar de los retrasos acumulados a lo largo del proyecto, fue posible concluir todas las actividades propuestas al inicio de este. Se logró identificar el motivo por el cual se obtuvo un nivel elevado de falsos negativos en la técnica PCR para *Salmonella spp.* y se resolvió dicha situación repitiendo análisis para finalmente obtener un resultado más real.

Se logró implementar y estandarizar una serie de ensayos de PCR que permiten detectar la presencia de los genes ligados a los serogrupos O157, serotipo H7, factores de virulencia intimina, hemolisina y la verotoxina 2. Esta serie de ensayos permiten analizar de mejor manera los alimentos, pues permiten apreciar de mejor manera la toxicidad de la bacteria.

Cabe destacar que con el método desarrollado para *Escherichia coli* O157:H7 fue posible determinar que una de las cepas adquiridas no correspondía a este tipo de bacteria, sino que solo presentaba el gen asociado a la verotoxina 2. Este resultado fue confirmado en el laboratorio de microbiología a cargo del Dr. Guillermo Figueroa, del INTA, con amplia experiencia en estos y otros patógenos.

Se logró obtener 2 ensayos que permiten detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 con un nivel de sensibilidad de 1 a 10 UFC/25 gr, en las matrices analizadas, excepto para la matriz de ovino, que posee un nivel de sensibilidad de 2 a 20 UFC/25 gr en el ensayo para detectar el serogrupo O157.

Se obtuvo un ensayo múltiple para detectar la presencia de los genes que codifican para la verotoxina 2 y los factores de virulencia intimina y hemolisina, con niveles variables de sensibilidad, que van de 1 a 10 UFC/25 gr hasta 5 a 50 UFC/25gr, dependiendo de la matriz y del fragmento del gen a detectar. Este ensayo se considera un aporte al proyecto original.

Se determinó estadísticamente que el ensayo de PCR para *Listeria monocytogenes* posee mejor sensibilidad relativa que la técnica de Lumiprobe. El ensayo de PCR para *Salmonella spp.* posee mejor sensibilidad y exactitud relativa que la técnica de Lumiprobe.

Finalmente se caracterizó cada una de las técnicas, obteniendo sensibilidad relativas mayores al 95% para todos los patógenos, en todas las matrices cárnicas. Además se observó que el caso de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 los métodos desarrollados son capaces de detectar dichos patógenos con mayor frecuencia que la metodología tradicional

#### **F.- Observaciones**

#### **G.- Actualizaciones o modificaciones al diseño original**

#### **H. - Referencias**

1. Paton, A. y Paton, J. "Detection and characterization of shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, *rfb*<sub>O157</sub>". Journal of clinical microbiology, 1998, 36, 598 – 602.
2. Fratamico, P.M., Bagi, L.K., Tiziana, P. "A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feaces" J. food prot., 2000, 63, 1032 – 1037.
3. Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J., O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D., Blair, I. y Bishop, R. "Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland". Food microbiology, 2004, 21, 203 – 212.
4. Gannon, V., King, R., Kim, J. and Golsteyn, E. "Rapid and sensitive method for detection of shiga – like toxin – producing *Escherichia coli* in ground beef using the Polymerase Chain Reaction" Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58, 12, 3809 – 3815.
5. AFNOR validation of alternative analysis methods, rev 7. 2002. Microbiology Technical Board
6. ISO 16140, 1ª edición 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.

## Anexos

Tabla n°1: Lista de resultados totales del análisis de *Listeria monocytogenes* en etapa de caracterización, incluyendo muestras que fueron repetidas.

	Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados
1	Ave	+	+	=
2	Ave	+	+	=
3	Ave	+	+	=
4	Ave	+	+	=
5	Ave	+	+	=
6	Ave	+	+	=
7	Ave	+	+	=
8	Ave	+	+	=
9	Ave	+	+	=
10	Ave	+	+	=
11	Ave	+	+	=
12	Ave	+	+	=
13	Ave	+	+	=
14	Ave	+	+	=
15	Ave	+	+	=
16	Ave	+	+	=
17	Ave	+	+	=
18	Ave	+	+	=
19	Ave	+	+	=
20	Ave	+	+	=
21	Ave	+	+	=
22	Ave	+	+	=
23	Ave	+	+	=
24	Ave	+	+	=
25	Ave	+	+	=
26	Ave	+	+	=
27	Ave	+	+	=
28	Ave	+	+	=
29	Ave	+	+	=
30	Ave	+	+	=
31	Ave	+	+	=
32	Ave	+	+	=
33	Ave	+	+	=
34	Ave	+	+	=
35	Ave	+	+	=
36	Ave	+	+	=
37	Ave	+	+	=
38	Bovino	+	+	=
39	Bovino	+	+	=
40	Bovino	+	+	=
41	Bovino	+	+	=
42	Bovino	+	+	=
43	Bovino	+	+	=
44	Bovino	+	+	=
45	Bovino	+	+	=
46	Bovino	+	+	=
47	Bovino	+	+	=
48	Bovino	+	+	=
49	Bovino	+	+	=
50	Bovino	+	+	=
51	Bovino	+	+	=
52	Bovino	+	+	=
53	Bovino	+	+	=
54	Bovino	+	+	=
55	Bovino	+	+	=
56	Porcino	+	+	=
57	Porcino	+	+	=
58	Porcino	+	+	=
59	Porcino	+	+	=
60	Porcino	+	+	=
61	Porcino	+	+	=
62	Porcino	+	+	=
63	Porcino	+	+	=
64	Porcino	+	+	=
65	Ovino	+	+	=
66	Ovino	+	+	=
67	Ovino	+	+	=
68	Ovino	+	+	=
69	Ovino	+	+	=
70	Ovino	+	+	=
71	Ovino	+	+	=
72	Ovino	+	+	=
73	Ovino	+	+	=
74	Ovino	+	+	=
75	Ovino	+	+	=
76	Ovino	+	+	=
77	Ovino	+	+	=
78	Ave	-	-	=
79	Ave	-	-	=
80	Ave	-	-	=

Tabla nº1 continuación: Lista de resultados totales del análisis de *Listeria monocytogenes* en etapa de caracterización, incluyendo muestras que fueron repetidas.

	Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados		Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados
81	Ave	-	-	=	125	Bovino	-	-	=
82	Ave	-	-	=	126	Bovino	-	-	=
83	Ave	-	-	=	127	Bovino	-	-	=
84	Ave	-	-	=	128	Bovino	-	-	=
85	Ave	-	-	=	129	Bovino	-	-	=
86	Ave	-	-	=	130	Bovino	-	-	=
87	Ave	-	-	=	131	Bovino	-	-	=
88	Ave	-	-	=	132	Bovino	-	-	=
89	Ave	-	-	=	133	Bovino	-	-	=
90	Ave	-	-	=	134	Bovino	-	-	=
91	Ave	-	-	=	135	Bovino	-	-	=
92	Ave	-	-	=	136	Bovino	-	-	=
93	Ave	-	-	=	137	Bovino	-	-	=
94	Ave	-	-	=	138	Bovino	-	-	=
95	Ave	-	-	=	139	Bovino	-	-	=
96	Ave	-	-	=	140	Bovino	-	-	=
97	Ave	-	-	=	141	Bovino	-	-	=
98	Ave	-	-	=	142	Bovino	-	-	=
99	Ave	-	-	=	143	Bovino	-	-	=
100	Ave	-	-	=	144	Porcino	-	-	=
101	Ave	-	-	=	145	Porcino	-	-	=
102	Ave	-	-	=	146	Porcino	-	-	=
103	Ave	-	-	=	147	Porcino	-	-	=
104	Ave	-	-	=	148	Ovino	-	-	=
105	Ave	-	-	=	149	Ovino	-	-	=
106	Ave	-	-	=	150	Ovino	-	-	=
107	Ave	-	-	=	151	Ovino	-	-	=
108	Ave	-	-	=	152	Ave	+	-	FP
109	Ave	-	-	=	153	Ave	+	-	FP
110	Bovino	-	-	=	154	Ave	+	-	FP
111	Bovino	-	-	=	155	Ave	+	-	FP
112	Bovino	-	-	=	156	Ave	+	-	FP
113	Bovino	-	-	=	157	Bovino	+	-	FP
114	Bovino	-	-	=	158	Bovino	+	-	FP
115	Bovino	-	-	=	159	Bovino	+	-	FP
116	Bovino	-	-	=	160	Bovino	+	-	FP
117	Bovino	-	-	=	161	Bovino	+	-	FP
118	Bovino	-	-	=	162	Bovino	+	-	FP
119	Bovino	-	-	=	163	Bovino	+	-	FP
120	Bovino	-	-	=	164	Bovino	+	-	FP
121	Bovino	-	-	=	165	Bovino	+	-	FP
122	Bovino	-	-	=	166	Ave	-	+	FN
123	Bovino	-	-	=	167	Bovino	-	+	FN
124	Bovino	-	-	=	168	Ovino	-	+	FN

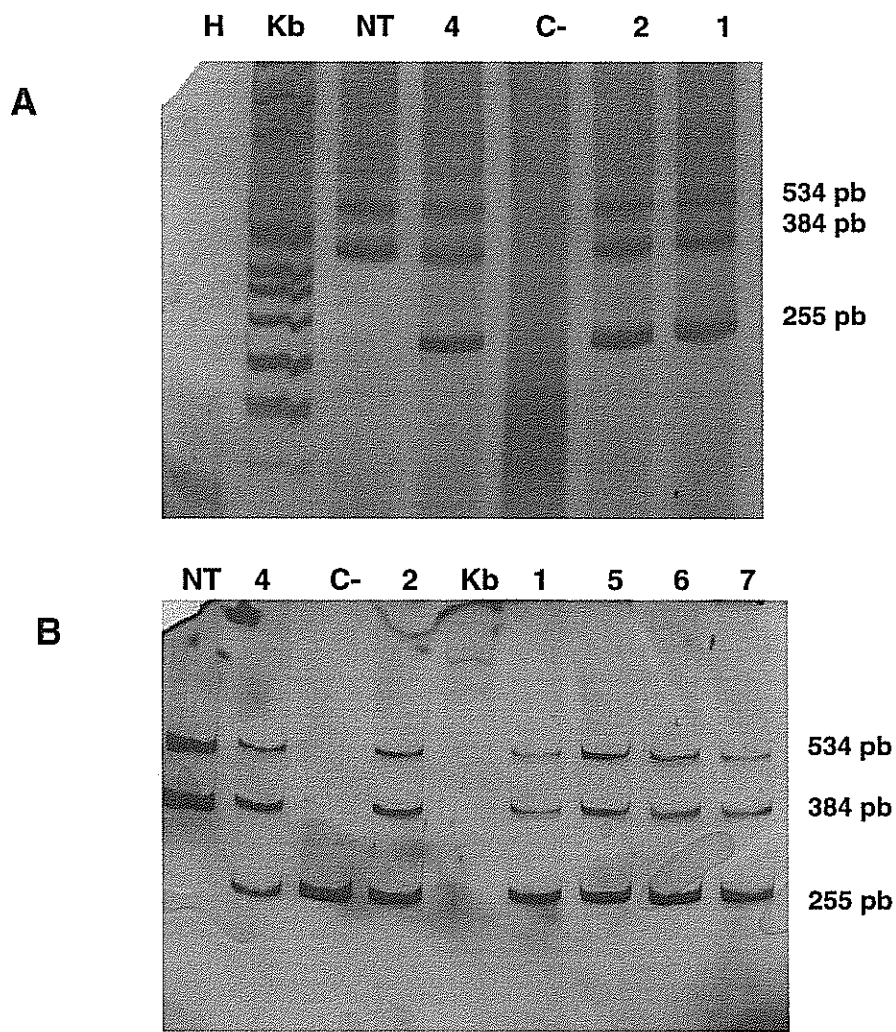


Tabla n°2: Lista de resultados totales del análisis de *Salmonella spp.* en etapa de caracterización, incluyendo muestras que fueron reemplazadas.

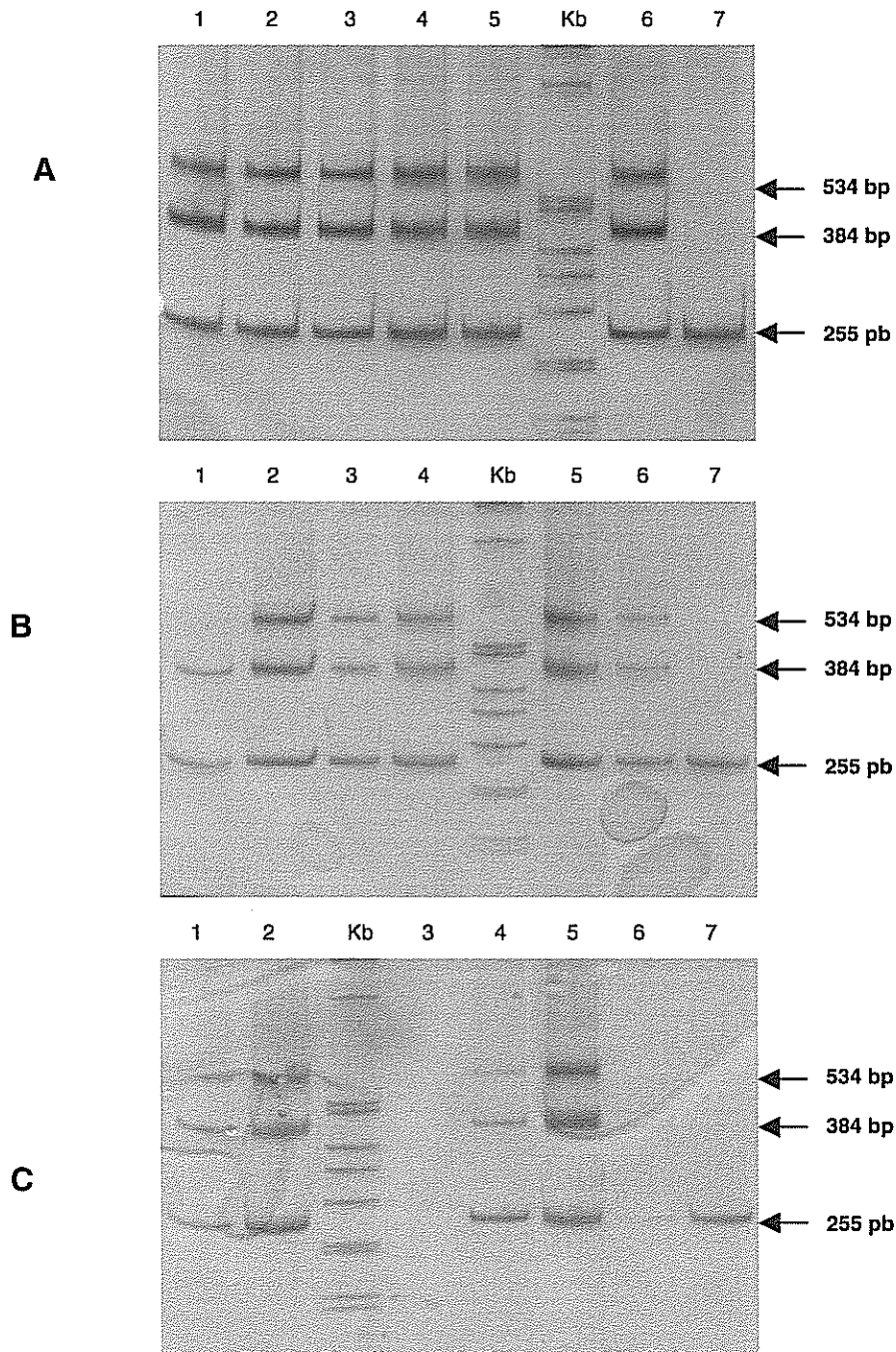
	Matriz	Método detección	Método referencia	Comparación de
		PCR	Tradicional	Resultados
1	Ave	+	+	=
2	Ave	+	+	=
3	Ave	+	+	=
4	Ave	+	+	=
5	Ave	+	+	=
6	Ave	+	+	=
7	Ave	+	+	=
8	Ave	+	+	=
9	Ave	+	+	=
10	Ave	+	+	=
11	pollo	+	+	=
12	Ave	+	+	=
13	Ave	+	+	=
14	Ave	+	+	=
15	Ave	+	+	=
16	Ave	+	+	=
17	Ave	+	+	=
18	Ave	+	+	=
19	Ave	+	+	=
20	Ave	+	+	=
21	Ave	+	+	=
22	Ave	+	+	=
23	Ave	+	+	=
24	Ave	+	+	=
25	Ave	+	+	=
26	Ave	+	+	=
27	Ave	+	+	=
28	Ave	+	+	=
29	Ave	+	+	=
30	Ave	+	+	=
31	Bovino	+	+	=
32	Bovino	+	+	=
33	Bovino	+	+	=
34	Bovino	+	+	=
35	Bovino	+	+	=
36	Bovino	+	+	=
37	Bovino	+	+	=
38	Bovino	+	+	=
39	Bovino	+	+	=
40	Bovino	+	+	=
41	Bovino	+	+	=
42	Bovino	+	+	=
43	Bovino	+	+	=
44	Bovino	+	+	=
45	Bovino	+	+	=
46	Bovino	+	+	=
47	Ovino	+	+	=
48	Ovino	+	+	=
49	Ovino	+	+	=
50	Ovino	+	+	=
51	Ovino	+	+	=
52	Ovino	+	+	=
53	Ovino	+	+	=
54	Ovino	+	+	=
55	Porcino	+	+	=
56	Porcino	+	+	=
57	Porcino	+	+	=
58	Porcino	+	+	=
59	Porcino	+	+	=
60	Porcino	+	+	=
61	Porcino	+	+	=
62	Porcino	+	+	=
63	Ave	-	-	=
64	Ave	-	-	=
65	Ave	-	-	=
66	Ave	-	-	=
67	Ave	-	-	=
68	Ave	-	-	=
69	Ave	-	-	=
70	Ave	-	-	=
71	Ave	-	-	=
72	Ave	-	-	=
73	Ave	-	-	=
74	Ave	-	-	=
75	Ave	-	-	=
76	Ave	-	-	=
77	Ave	-	-	=
78	Ave	-	-	=
79	Ave	-	-	=
80	Ave	-	-	=
81	Ave	-	-	=
82	pavo	-	-	=
83	pavo	-	-	=
84	pollo	-	-	=
85	pollo	-	-	=
86	pollo	-	-	=

Tabla n°2 continuación: Lista de resultados totales del análisis de *Salmonella spp.* en etapa de caracterización, incluyendo muestras que fueron reemplazadas.

		Método	Método	Comparación
	Matriz	detección	referencia	de
		PCR	Tradicional	resultados
87	pollo	-	-	=
88	pollo	-	-	=
89	pollo	-	-	=
90	pollo	-	-	=
91	pavo	-	-	=
92	pollo	-	-	=
93	pollo	-	-	=
94	pollo	-	-	=
95	pollo	-	-	=
96	pollo	-	-	=
97	pavo	-	-	=
98	pavo	-	-	=
99	pollo	-	-	=
100	pollo	-	-	=
101	pavo	-	-	=
102	pavo	-	-	=
103	pavo	-	-	=
104	pavo	-	-	=
105	pavo	-	-	=
106	pollo	-	-	=
107	pollo	-	-	=
108	pollo	-	-	=
109	pollo	-	-	=
110	pollo	-	-	=
111	Ave	-	-	=
112	Ave	-	-	=
113	Ave	-	-	=
114	Ave	-	-	=
115	Ave	-	-	=
116	Ave	-	-	=
117	Ave	-	-	=
118	Ave	-	-	=
119	Ave	-	-	=
120	Ave	-	-	=
121	Ave	-	-	=
122	Ave	-	-	=
123	Ave	-	-	=
124	Ave	-	-	=
125	Ave	-	-	=
126	Bovino	-	-	=
127	Carne	-	-	=
128	Carne	-	-	=
129	Carne	-	-	=
130	Carne	-	-	=
131	Carne	-	-	=
132	malaya	-	-	=
133	Carne	-	-	=
134	Carne	-	-	=
135	Bovino	-	-	=
136	Bovino	-	-	=
137	Bovino	-	-	=
138	Bovino	-	-	=
139	Bovino	-	-	=
140	Bovino	-	-	=
141	Bovino	-	-	=
142	Bovino	-	-	=
143	Bovino	-	-	=
144	Bovino	-	-	=
145	Bovino	-	-	=
146	Bovino	-	-	=
147	Bovino	-	-	=
148	Bovino	-	-	=
149	Bovino	-	-	=
150	Bovino	-	-	=
151	Bovino	-	-	=
152	Bovino	-	-	=
153	Bovino	-	-	=
154	Carne	-	-	=
155	Carne	-	-	=
156	Carne	-	-	=
157	Carne	-	-	=
158	Carne	-	-	=
159	Carne	-	-	=
160	Carne	-	-	=
161	Carne	-	-	=
162	Carne	-	-	=
163	Ovino	-	-	=
164	Ovino	-	-	=
165	Ovino	-	-	=
166	Ovino	-	-	=
167	Porcino	-	-	=
168	Porcino	-	-	=
169	Porcino	-	-	=
170	Porcino	-	-	=
171	Ave	-	+	FN

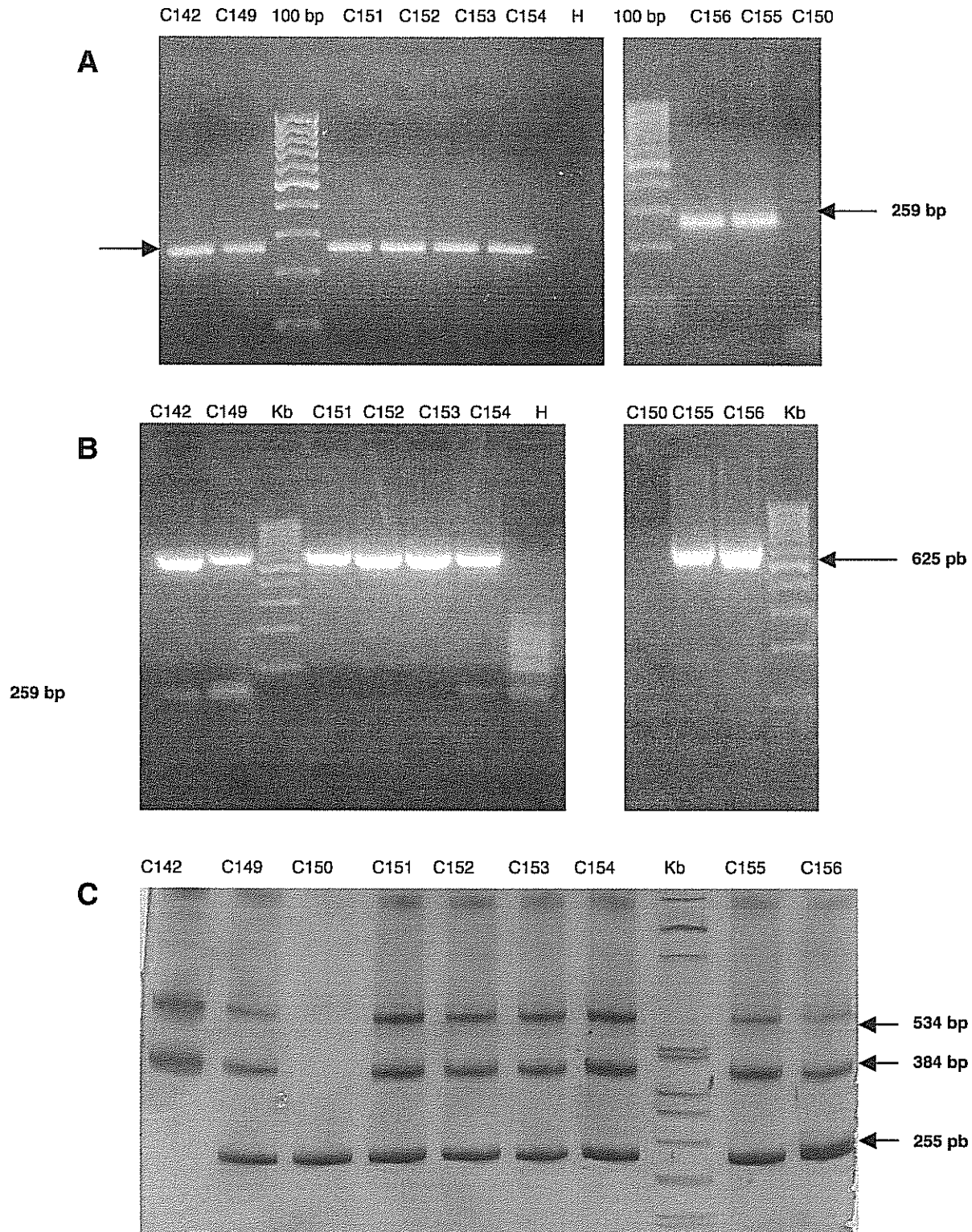


**Figura 1: Análisis electroforético de los productos de PCR múltiple, para detectar las toxinas y los factores de toxicidad en una sola reacción.** Se sometió a PAGE los productos de amplificación obtenidos mediante diferentes protocolos de PCR múltiple. En A protocolo de *Cagney and Crowley* y en B. *Paton and Paton* . Se observan los fragmentos de 534 pb aprox del gen *hlyA*, el fragmento de 384 pb del gen *eaeA* y el fragmento de 255 pb del gen de la verotoxina 2, para ambos protocolos. NT corresponde a la cepa no toxigénica.



**Figura 2: Análisis electroforético de los productos de PCR múltiple, utilizando distintos métodos de extracción .** Se sometió a PAGE los productos de amplificación obtenidos mediante el ensayo de PCR múltiple (*Paton and Paton* ) a partir de muestras extraídas por distintos métodos: Roche (A), *Gannon et al.* Modificado (B) y *Gannon et al.* (C). Las muestras corresponden a: (1) Ave con *coli* cepa 16, (2) Ovino con *coli* cepa 16, (3) Porcino con *coli* cepa 16, (4) Bovino con *coli* cepa 17, (5) bovino con *coli* cepa 13, (6) bovino con *coli* cepa 16 y (7) Bovino con cepa 14, que corresponde a una bacteria productora de toxina, pero no es

*Escherichia coli* O157:H7. **Kb**: marcador de peso molecular Invitrogen. Las flechas indican los productos de amplificación esperados.

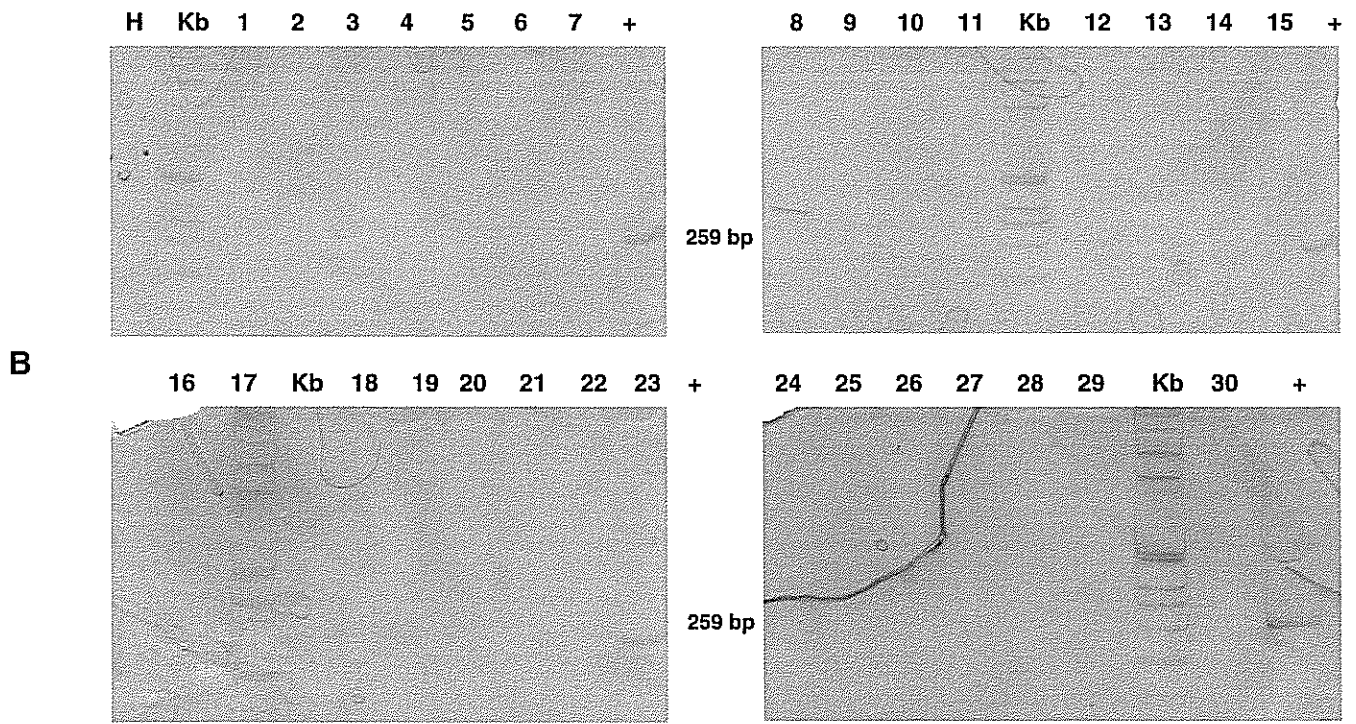
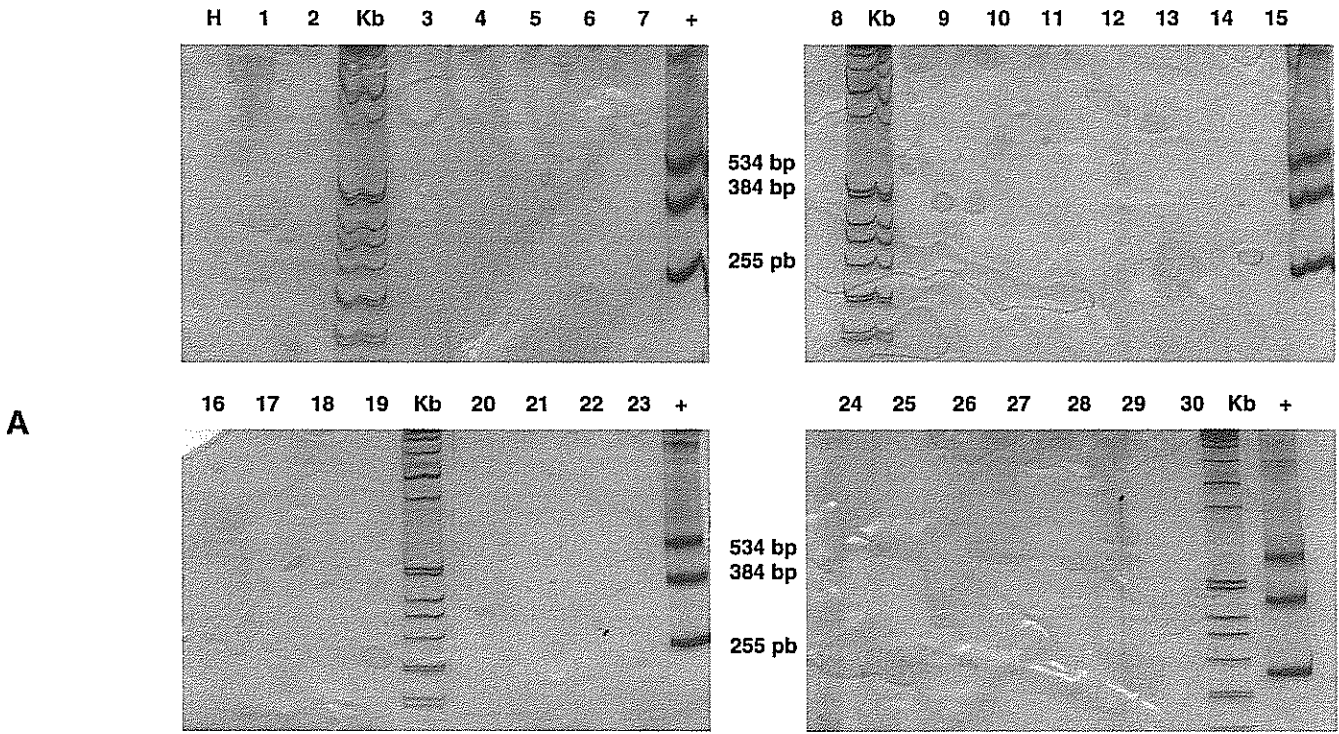


**Figuras 3 A-C. Evaluación de la especificidad de los ensayos de PCR para la detección de *Escherichia coli* O157:H7.** Se sometió a PAGE productos de amplificación obtenidos mediante ensayos de PCR utilizando 9 cepas de *Escherichia coli* O157:H7, cuyas características se incluyen en la Tabla 3. **A.** Serogrupo O157, serotipo H7 (**B**) y las toxinas y factores de virulencia (**C**). El carril H: control negativo de PCR. 100 bp y Kb: marcador de peso molecular Invitrogen.

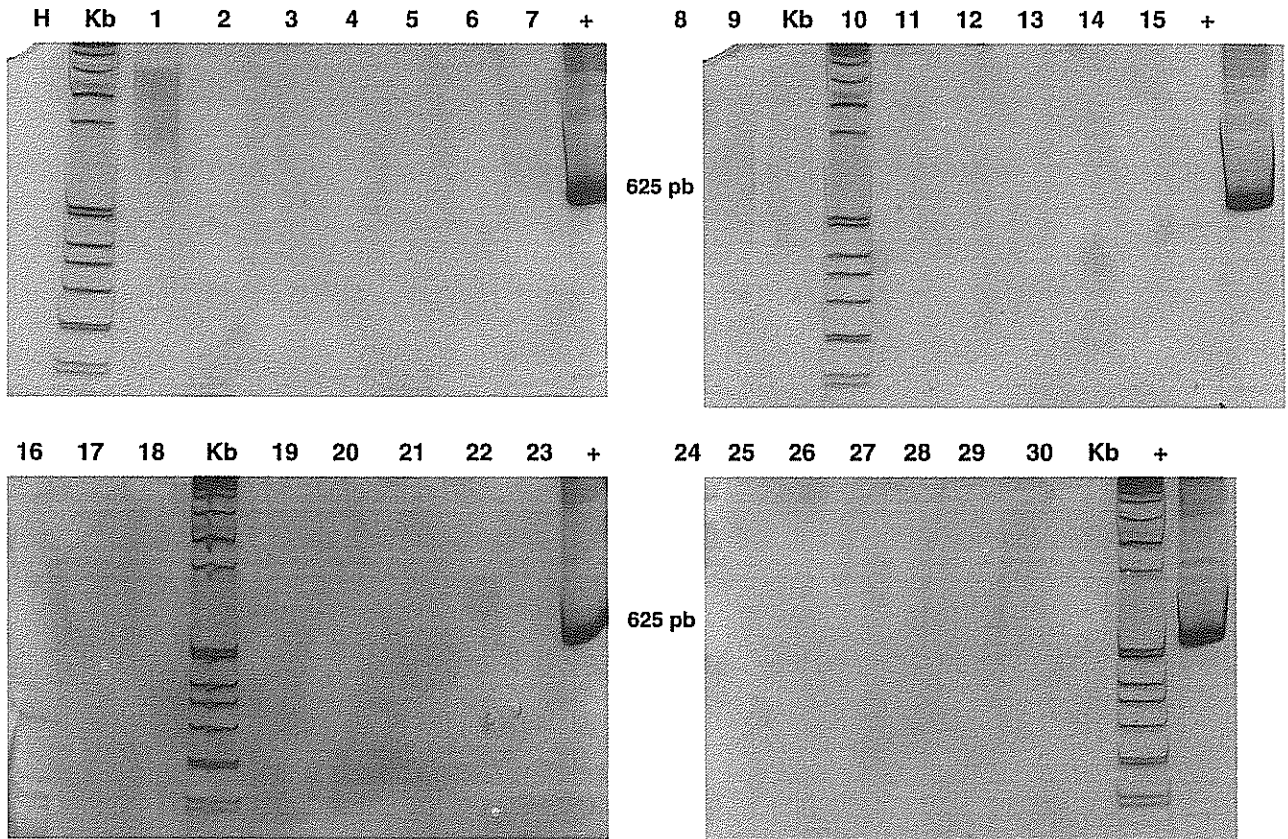
Tabla nº3: Cepas analizadas para el análisis de especificidad en los 3 ensayos de PCR para *Escherichia coli* O157:H7.

<b>Cod.</b>	<b>Cepa</b>	<b>Procedencia</b>
C142	E coli O157:H7	Cepa No toxigénica ISP
C149	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 13
C150	No determinada	Cepa Medicina U. Chile nº 14
C151	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 15
C152	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 16
C153	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 17
C154	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 18
C155	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 19
C156	E coli O157:H7	Cepa Medicina U. Chile nº 20









C

Figuras 4 A-C. Evaluación de la especificidad negativa del ensayo de PCR implementado para detectar el serogrupo O157 (A), serotipo H7 (B) y las toxinas y factores de virulencia (C) para *Escherichia coli* O157:H7. Se sometió a PAGE productos de amplificación obtenidos mediante ensayos de PCR utilizando 30 cepas de bacterias distintas a *Escherichia coli* O157:H7, cuyas características se incluyen en la Tabla 4. El carril H: control negativo de PCR Kb: marcador de peso molecular Invitrogen.

Tabla nº4: Cepas analizadas para el análisis de especificidad en los 3 ensayos de PCR para *Escherichia coli* O157:H7.

	<b>Cepa</b>	<b>Procedencia</b>
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	INTA - Camarones
2	<i>S. aureus</i>	INTA - Crema pastelera
3	<i>S. aureus</i>	INTA - Crema pastelera
4	<i>S. aureus</i>	INTA - Crema Chantilly
5	<i>S. aureus</i>	INTA - Crema Chantilly
6	<i>S. aureus</i>	INTA - Cecinas cocidas
7	<i>E. coli</i>	INTA - Harina
8	<i>E. coli</i> (0127)	INTA - pollos
9	<i>E. coli</i>	INTA - Harina
10	<i>E. coli</i>	INTA - Salmón
11	<i>Bacillus</i>	INTA - Condimento gazpacho
12	<i>Bacillus</i>	INTA - Condimento gazpacho
13	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
14	<i>Proteis mirabilis</i>	ATCC 25933
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
17	<i>Staphylococcus epidermis</i>	ATCC 12228
18	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 7064
19	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
21	<i>Salmonella hadar</i>	Alimento
22	<i>Salmonella enteritidis</i>	Alimento
23	<i>Salmonella Tennessee</i>	Alimento para animales
24	<i>Salmonella sandiego</i>	Humana
25	<i>Salmonella mbandaka</i>	Alimento
26	<i>Salmonella montevideo</i>	Humana
27	<i>Salmonella enteritidis</i>	Alimento /atípica según INTA
28	<i>Salmonella typhimurium</i>	Alimento
29	<i>Salmonella hadar</i>	Humana
30	<i>Listeria monocytogenes</i>	Verduras

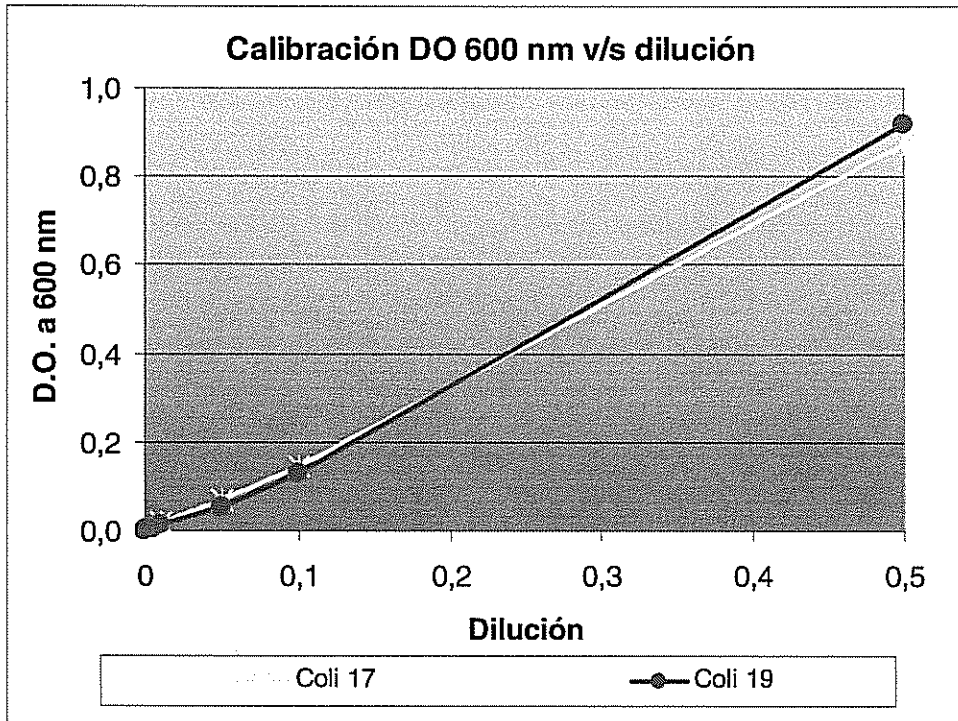


Gráfico 1: Calibración de la diferencia de absorbancia a 600 nm, versus la dilución del cultivo de 2 cepas de *E. coli* O157:H7.

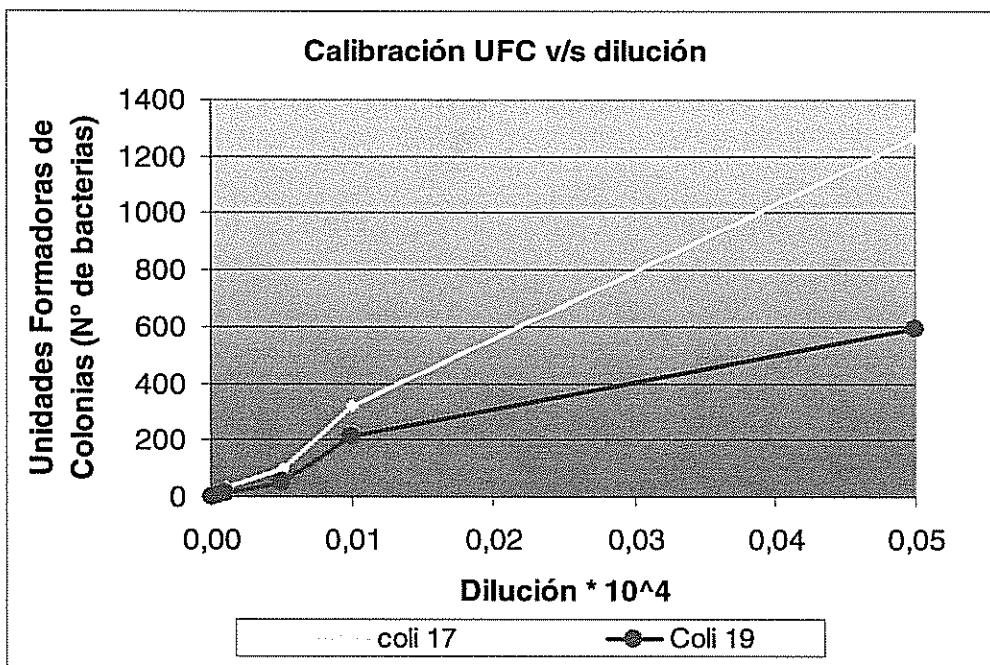


Gráfico 2: Calibración de las unidades formadoras de colonias (UFC), versus la dilución del cultivo de 2 cepas de *E. coli* O157:H7.

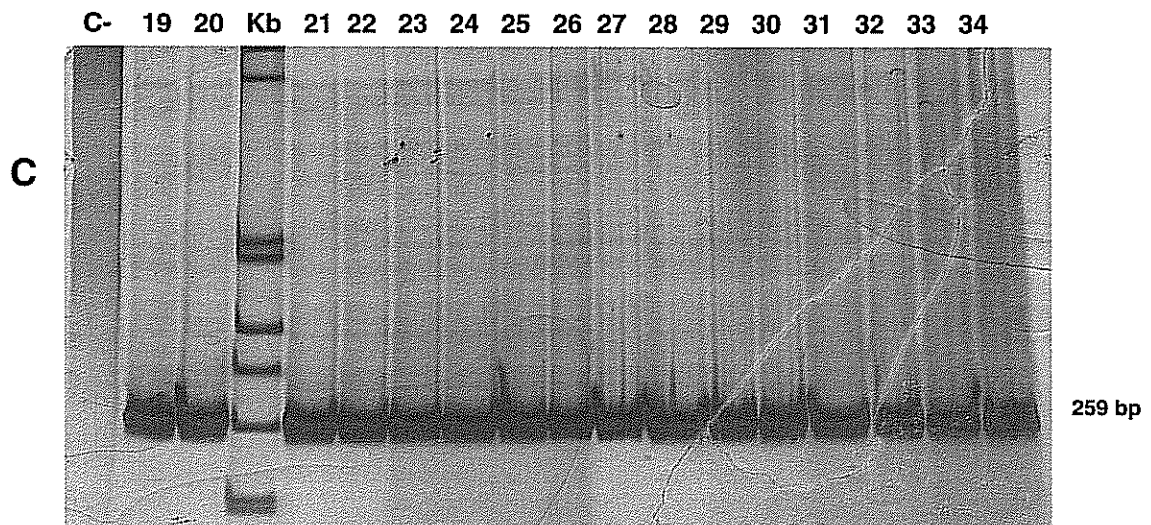
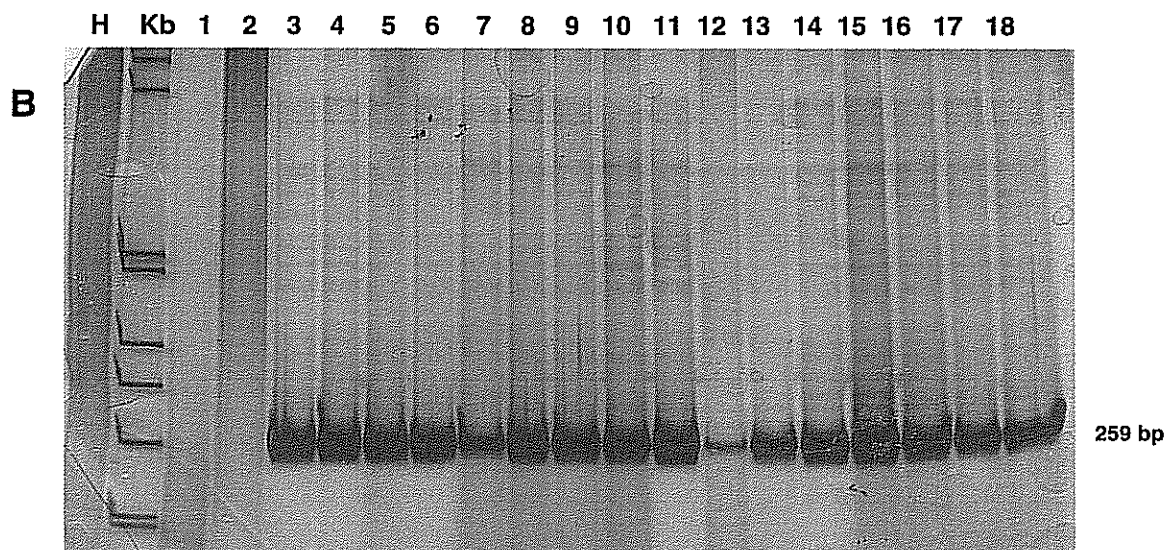
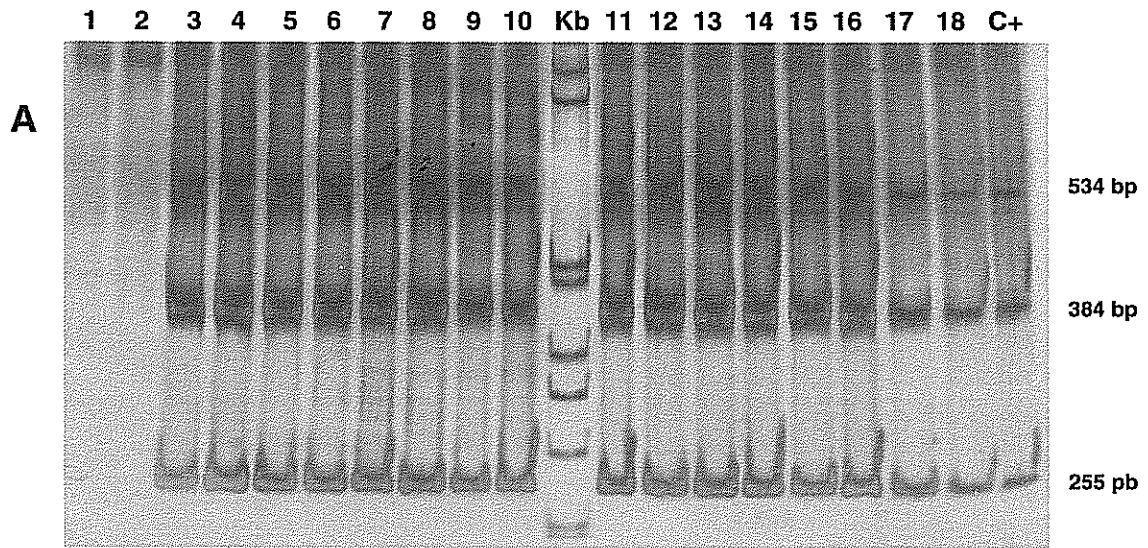
**Tabla 5: Ecuaciones\* para calibración entre UFC<sup>a</sup> de 2 cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y la D.O.<sup>b</sup> del cultivo a 600 nm.**

Coli 17	UFC =	14.679,48	* 10 <sup>4</sup> * D.O.
Coli 19	UFC =	6.690,92	* 10 <sup>4</sup> * D.O.

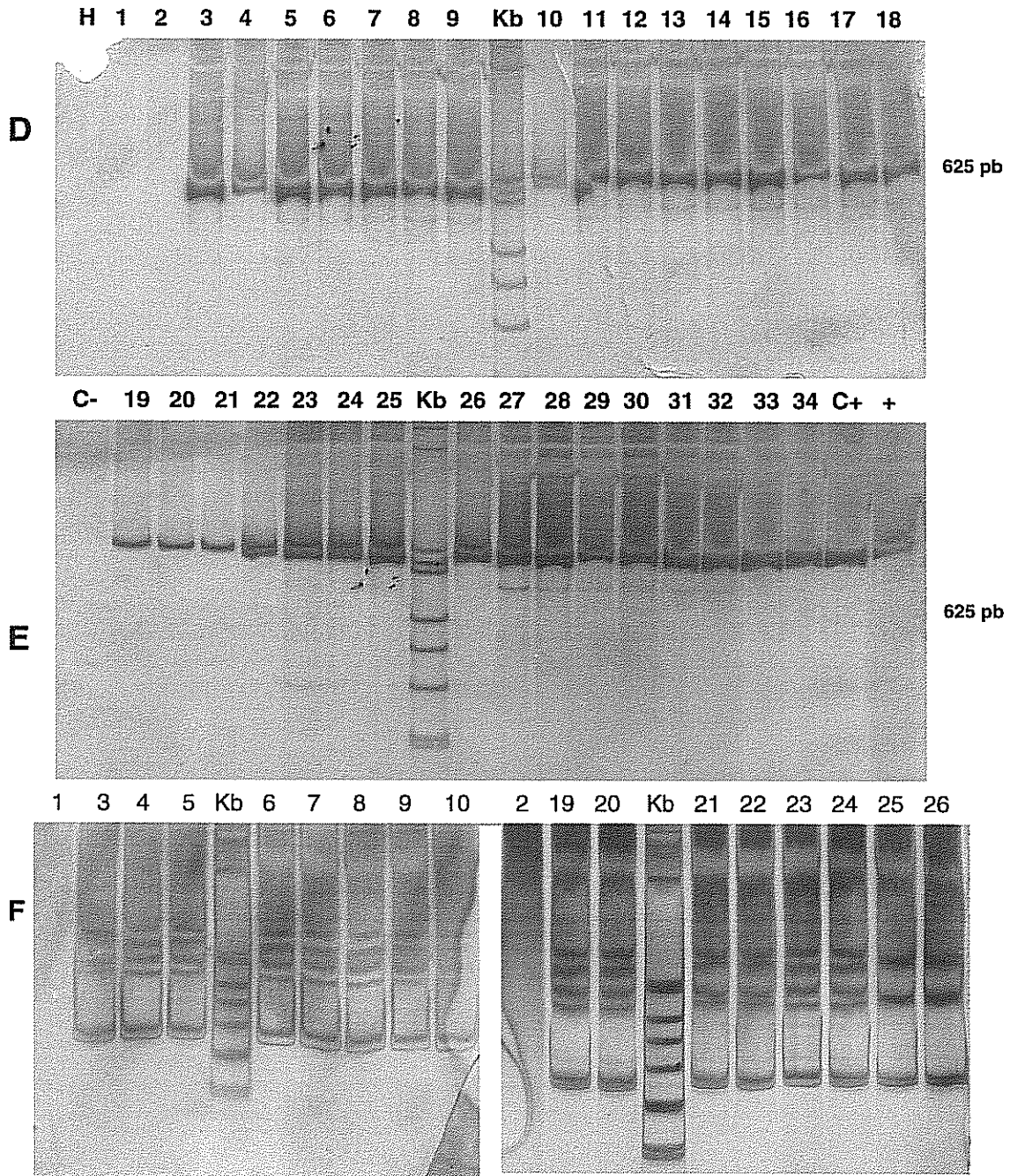
\* Con estas ecuaciones se determinaron las cantidades necesarias para inocular las muestras de la etapa de sensibilidad

**UFC<sup>a</sup>** unidades formadoras de colonias

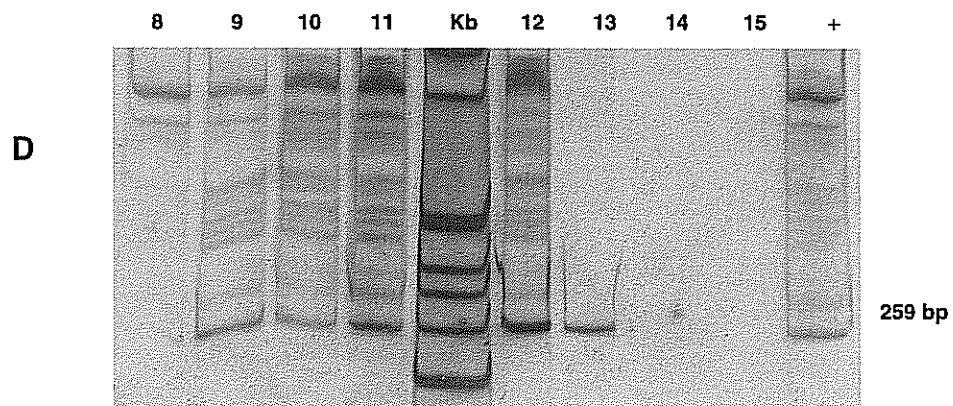
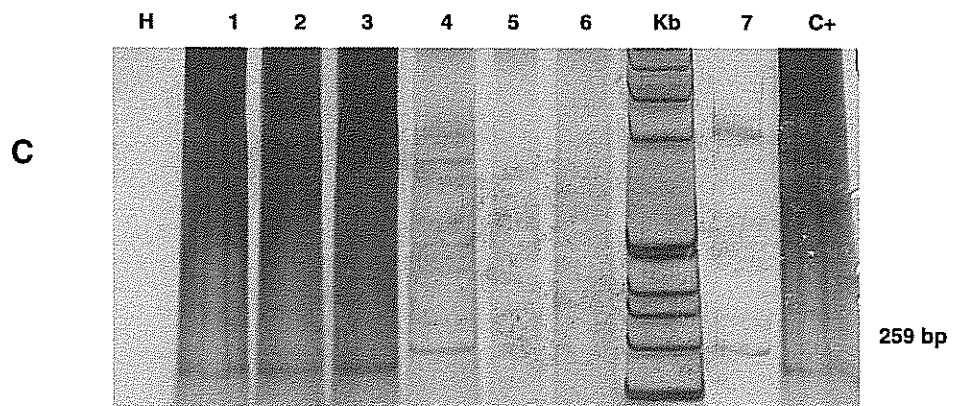
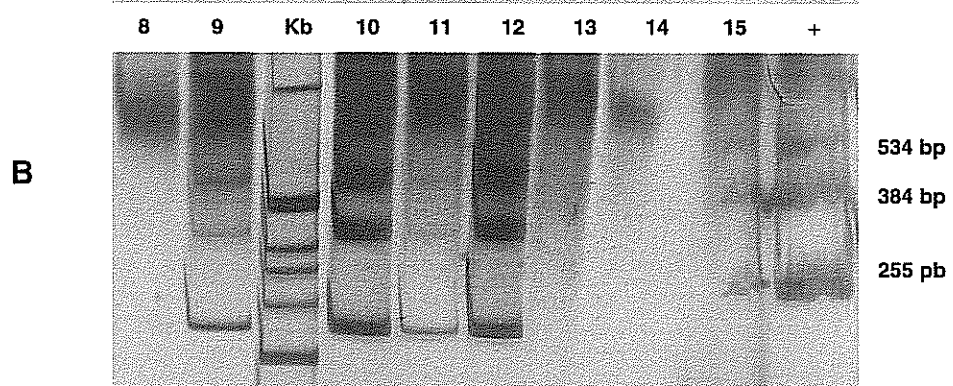
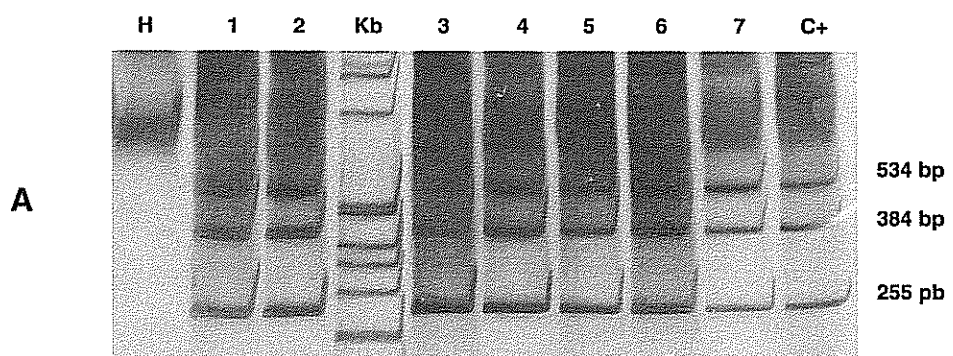
**D.O.<sup>b</sup>** densidad óptica

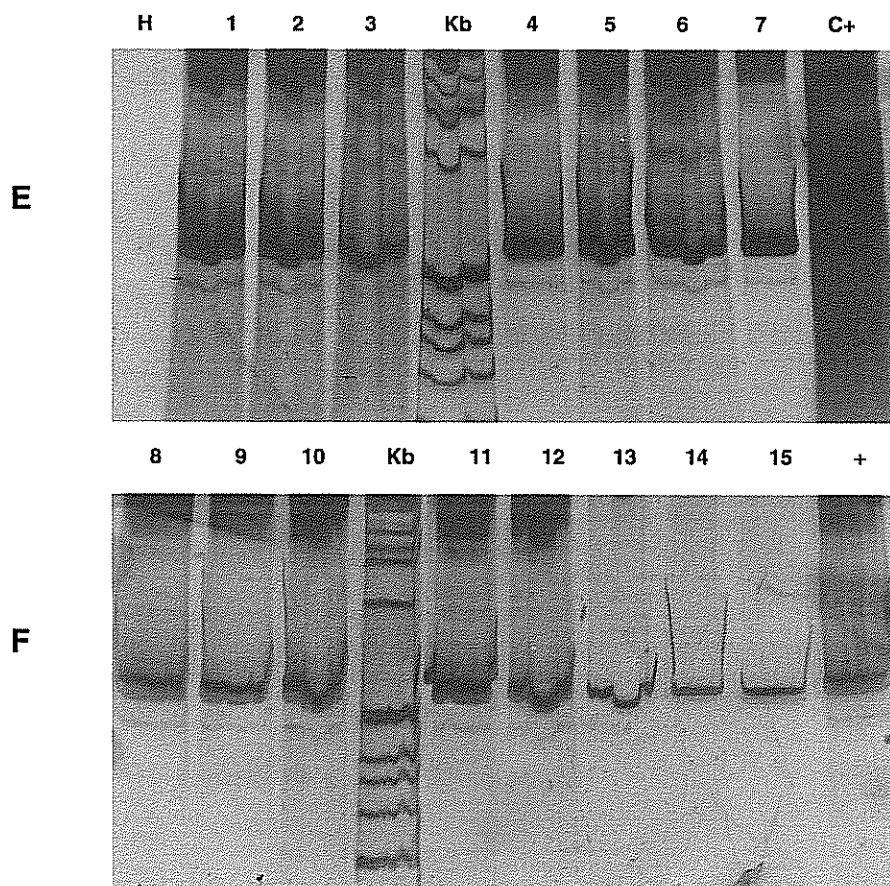






**Figura 5 A - F. Evaluación de la sensibilidad de los ensayos de PCR para *Escherichia coli* O157:H7 en Ave, Bovino, Porcino y Ovino.** Se sometió a PAGE productos de amplificación obtenidos mediante los 3 ensayos de PCR de 5 niveles de bacterias cultivadas sobre la matriz Bovino (gel A, Ensayo 1), la matriz Ave (geles B y C, Ensayo 2), la matriz ovino (geles D y E, Ensayo 3) y la matriz Porcino (geles F, ensayo 1). Los carriles corresponden a los siguientes niveles de contaminación: **1 y 2:** Muestra sin contaminar, **3 y 4:** 1 a 10 ufc de coli 17, **5 y 6:** 2 a 20 ufc de coli 17, **7 y 8:** 5 a 50 ufc de coli 17, **9 y 10:** 10 a 100 ufc de coli 17, **11 y 12:** 1 a 10 ufc de coli 13, **13 y 14:** 2 a 20 ufc de coli 13, **15 y 16:** 5 a 50 ufc de coli 13, **17 y 18:** 10 a 100 ufc de coli 13, **19 y 20:** 1 a 10 ufc de coli 16, **21 y 22:** 2 a 20 ufc de coli 16, **23 y 24:** 5 a 50 ufc de coli 16, **25 y 26:** 10 a 100 ufc de coli 16, **27 y 28:** 1 a 10 ufc de coli 19, **29 y 30:** 2 a 20 ufc de coli 19, **31 y 32:** 5 a 50 ufc de coli 19, **33 y 34:** 10 a 100 ufc de coli 19, **C-:** Control negativo de extracción, **C+:** Control positivo de extracción, **H:** Control negativo de PCR, **+:** Control positivo de PCR y **Kb:** Marcador de peso molecular invitrogen.





**Figura 6 A - F: Estudio de la reproducibilidad del método de PCR de *Escherichia coli* O157:H7:**

Figuras A y B: Ensayo 1; Figuras C y D: Ensayo 2 (genogrupo O157); Figuras E y F: Ensayo 3 (Genotipo H7) Las muestras corresponden a: **Carriles 1 a 3:** Porcino contaminada con 5 a 50 UFC de coli 19, **Carriles 4 a 6:** Ave contaminada con 5 a 50 UFC de coli 16, **Carriles 7 a 9:** Ovino contaminado con 5 a 50 UFC de coli 17, **Carriles 10 a 12:** Porcino contaminado con 5 a 50 UFC de coli 16, **Carriles 13 a 15:** Ovino contaminado con 2 a 20 UFC de coli 16. **H** corresponde al control negativo de PCR. **C+** corresponde al control positivo de extracción y **+** corresponde al control positivo de PCR .



Tabla nº 6: Lista de resultados totales del análisis de *Escherichia coli* O157 en etapa de caracterización.

	Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados		Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados
1	Ave	+	+	=	41	Ave	-	-	=
2	Ave	+	+	=	42	Ave	-	-	=
3	Ave	+	+	=	43	Ave	-	-	=
4	Ave	+	+	=	44	Ave	-	-	=
5	Ave	+	+	=	45	Ave	-	-	=
6	Ave	+	+	=	46	Ave	-	-	=
7	Ave	+	+	=	47	Ave	-	-	=
8	Ave	+	+	=	48	Ave	-	-	=
9	Ave	+	+	=	49	Ave	-	-	=
10	Ave	+	+	=	50	Ave	-	-	=
11	Ave	+	+	=	51	Ave	-	-	=
12	Ave	+	+	=	52	Ave	-	-	=
13	Ave	+	+	=	53	Ave	-	-	=
14	Ave	+	+	=	54	Ave	-	-	=
15	Ave	+	+	=	55	Ave	-	-	=
16	Ave	+	+	=	56	Ave	-	-	=
17	Ave	+	+	=	57	Ave	-	-	=
18	Ave	+	+	=	58	Ave	-	-	=
19	Ave	+	+	=	59	Ave	-	-	=
20	Ave	+	+	=	60	Ave	-	-	=
21	Ave	+	+	=	61	Ave	-	-	=
22	Ave	+	+	=	62	Ave	-	-	=
23	Ave	+	+	=	63	Ave	-	-	=
24	Ave	+	+	=	64	Ave	-	-	=
25	Ave	+	+	=	65	Ave	-	-	=
26	Ave	+	+	=	66	Ave	-	-	=
27	Ave	+	+	=	67	Ave	-	-	=
28	Ave	+	+	=	68	Ave	+	-	FP
29	Ave	+	+	=	69	Ave	+	-	FP
30	Ave	+	+	=	70	Ave	+	-	FP
31	Ave	+	+	=	71	Bovino	+	+	=
32	Ave	+	+	=	72	Bovino	+	+	=
33	Ave	+	+	=	73	Bovino	+	+	=
34	Ave	+	+	=	74	Bovino	+	+	=
35	Ave	+	+	=	75	Bovino	+	+	=
36	Ave	+	+	=	76	Bovino	+	+	=
37	Ave	-	-	=	77	Bovino	+	+	=
38	Ave	-	-	=	78	Bovino	+	+	=
39	Ave	-	-	=	79	Bovino	+	+	=
40	Ave	-	-	=	80	Bovino	+	+	=

Tabla nº 6 continuación: Lista de resultados totales del análisis de *Escherichia coli* O157 en etapa de caracterización.

	Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados
81	Bovino	+	+	=
82	Bovino	+	+	=
83	Bovino	+	+	=
84	Bovino	+	+	=
85	Bovino	-	-	=
86	Bovino	-	-	=
87	Bovino	-	-	=
88	Bovino	-	-	=
89	Bovino	-	-	=
90	Bovino	-	-	=
91	Bovino	-	-	=
92	Bovino	-	-	=
93	Bovino	-	-	=
94	Bovino	-	-	=
95	Bovino	-	-	=
96	Bovino	-	-	=
97	Bovino	-	-	=
98	Bovino	-	-	=
99	Bovino	-	-	=
100	Bovino	-	-	=
101	Bovino	-	-	=
102	Bovino	-	-	=
103	Bovino	-	-	=
104	Bovino	-	-	=
105	Bovino	-	-	=
106	Bovino	-	-	=
107	Bovino	-	-	=
108	Bovino	-	-	=
109	Bovino	+	-	FP
110	Porcino	+	+	=
111	Porcino	+	+	=
112	Porcino	+	+	=
113	Porcino	+	+	=
114	Porcino	+	+	=
115	Porcino	+	+	=
116	Porcino	+	+	=
117	Porcino	+	+	=

	Matriz	Método detección PCR	Método referencia Tradicional	Comparación de resultados
118	Porcino	+	+	=
119	Porcino	+	+	=
120	Porcino	+	+	=
121	Porcino	+	+	=
122	Porcino	+	+	=
123	Porcino	+	+	=
124	Porcino	+	+	=
125	Porcino	+	+	=
126	Porcino	+	+	=
127	Porcino	+	+	=
128	Porcino	+	+	=
129	Porcino	+	+	=
130	Porcino	+	+	=
131	Porcino	+	+	=
132	Ovino	+	+	=
133	Ovino	+	+	=
134	Ovino	-	-	=
135	Ovino	-	-	=
136	Ovino	-	-	=
137	Ovino	-	-	=
138	Ovino	-	-	=
139	Ovino	-	-	=
140	Ovino	-	-	=
141	Ovino	-	-	=
142	Ovino	-	-	=
143	Ovino	-	-	=
144	Ovino	-	-	=
145	Ovino	-	-	=
146	Ovino	-	-	=
147	Ovino	-	-	=
148	Ovino	-	-	=
149	Ovino	-	-	=
150	Ovino	-	-	=
151	Ovino	-	-	=
152	Ovino	-	-	=
153	Ovino	-	-	=

Tabla nº 7: Secuencias de genes presentes en la base de datos de GenBank que poseen alineamientos significativos con los partidores fra7h forward y reverse para la detección del genotipo H7.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
<a href="#">gi 30059855 gb AY249992.1 </a> Escherichia coli strain U5-41 fliC ge	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 8071787 gb AF228494.1 AF228494</a> Escherichia coli strain A64 fl	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 8071785 gb AF228493.1 AF228493</a> Escherichia coli strain D-M...	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 8071783 gb AF228492.1 AF228492</a> Escherichia coli strain A11...	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 8071781 gb AF228491.1 AF228491</a> Escherichia coli strain A62 fl	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 8071779 gb AF228490.1 AF228490</a> Escherichia coli strain A57 fl	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 6009836 dbj AB028474.1 </a> Escherichia coli fliC gene for fla...	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 290438 gb L07388.1 ECOFLICB</a> Escherichia coli (clone pWQ707...	<u>54.0</u>	2e-05
<a href="#">gi 33590228 gb AY337468.1 </a> Escherichia coli strain 51 flagellin	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 47118301 dbj BA000007.2 </a> Escherichia coli O157:H7 DNA, comple	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 8071791 gb AF228496.1 AF228496</a> Escherichia coli strain 140...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 8071789 gb AF228495.1 AF228495</a> Escherichia coli strain F81...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 8071777 gb AF228489.1 AF228489</a> Escherichia coli strain TB1...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 8071775 gb AF228488.1 AF228488</a> Escherichia coli strain EH7 fl	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 8071773 gb AF228487.1 AF228487</a> Escherichia coli strain C66...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 5107856 gb AF128958.2 AF128958</a> Escherichia coli strain ECO...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 5107848 gb AF128953.2 AF128953</a> Escherichia coli strain CL8 fl	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 5107844 gb AF128951.2 AF128951</a> Escherichia coli strain DEC...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 5107842 gb AF128950.2 AF128950</a> Escherichia coli strain DEC...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 5107836 gb AF128947.2 AF128947</a> Escherichia coli strain DEC...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 4731617 gb AF128957.1 AF128957</a> Escherichia coli strain DEC...	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 56384585 gb AE005174.2 </a> Escherichia coli O157:H7 EDL933, comp	<u>46.1</u>	0.006
<a href="#">gi 1655806 gb U47614.1 ECU47614</a> Escherichia coli flagellin (fliC	<u>46.1</u>	0.006

Tabla nº 8: Secuencias de genes presentes en la base de datos de GenBank que poseen alineamientos significativos con los partidores int forward y reverse para la detección del factor de virulencia intimina.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
<a href="#">gi 52854803 gb AY696843.1 </a> Shigella boydii strain K-694 intimin	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 52854801 gb AY696842.1 </a> Shigella boydii strain C-425 intimin	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 52854799 gb AY696841.1 </a> Shigella boydii strain 3097-02 intimi	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 52854797 gb AY696840.1 </a> Shigella boydii strain 3555-77 intimi	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 52854795 gb AY696839.1 </a> Shigella boydii strain K-1 intimin (e	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 52854793 gb AY696838.1 </a> Escherichia albertii strain 19982 ...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 59668647 emb AJ879900.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 59668645 emb AJ879899.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 59668643 emb AJ879898.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57996963 emb AJ876652.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 41333 emb Z11541.1 ECEHECEAE</a> E.coli eae gene for EHEC attachi	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 42155 emb X60439.1 ECOEHCEAE</a> E.coli attaching and effacing ge	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57996967 emb AJ876654.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57996965 emb AJ876653.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57996961 emb AJ876651.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57996959 emb AJ876650.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 57753594 emb AJ875027.1 </a> Escherichia coli eae gene for intimi	<u>40.1</u>	0.27
<a href="#">gi 48143988 emb AJ744865.1 </a> Escherichia coli eae gene for int...	<u>40.1</u>	0.27

<a href="#">gi 47824777 emb AJ715408.1</a>	Escherichia coli eae gene for int...	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 47824775 emb AJ715407.1</a>	Escherichia coli eae gene for intimi	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 15384863 emb AJ308552.1</a>	<a href="#">ECO308552</a> Escherichia coli eae-kappa	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 15384861 emb AJ308551.1</a>	<a href="#">ECO308551</a> Escherichia coli eae-jota g	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 18958224 emb AJ308550.1</a>	<a href="#">ECO308550</a> Escherichia coli eae gene f	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 54311592 emb AJ633129.1</a>	Escherichia coli locus of enteroc...	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 22653338 gb AF530557.1</a>	Escherichia coli intimin lambda gene,	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 22653336 gb AF530556.1</a>	Escherichia coli intimin beta 2 gene,	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 22653334 gb AF530555.1</a>	Escherichia coli intimin alpha 2 gene	<a href="#">40.1</a>	0.27
<a href="#">gi 22653332 gb AF530554.1</a>	Escherichia coli intimin epsilon 2 ge	<a href="#">40.1</a>	0.27

Tabla nº 9: Secuencias de genes presentes en la base de datos de GenBank que poseen alineamientos significativos con los partidores pat157 forward y reverse para la detección del genotipo O157.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
<a href="#">gi 1911762 gb S83460.1</a> rfbE(EcO157:H7)=perosamine synthetase...	<a href="#">42.1</a>	0.069
<a href="#">gi 47118301 dbj BA000007.2</a> Escherichia coli O157:H7 DNA, comple	<a href="#">42.1</a>	0.069
<a href="#">gi 3435170 gb AF061251.1</a> <a href="#">AF061251</a> Escherichia coli serotype O157:	<a href="#">42.1</a>	0.069
<a href="#">gi 56384585 gb AE005174.2</a> Escherichia coli O157:H7 EDL933, comp	<a href="#">42.1</a>	0.069
<a href="#">gi 4867913 dbj AB008676.1</a> Escherichia coli O157 DNA, map pos...	<a href="#">42.1</a>	0.069

Tabla nº 10: Secuencias de genes presentes en la base de datos de GenBank que poseen alineamientos significativos con los partidores hemo forward y reverse para la detección del factor de virulencia hemolisina.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
<a href="#">gi 3822114 gb AF074613.1</a> Escherichia coli O157:H7 plasmid pO157	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 73476817 gb AY258503.2</a> Escherichia coli strain EH41 plasmid	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 1247757 emb X86087.1</a> <a href="#">ECPDNAEHO</a> E.coli plasmid-DNA for EHEC-he	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 30721633 gb AY278115.1</a> Escherichia coli O157:H7 hemolysin (h	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 860924 emb X79839.1</a> <a href="#">ECHLYG</a> E.coli O157 H7 (EDL 933) plasmid D	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 1524026 emb X94129.1</a> <a href="#">ECHLYA</a> E.coli EHEC-hlyA gene	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 3253293 gb AF043471.1</a> <a href="#">AF043471</a> Escherichia coli hemolysin (eh	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 7416114 dbj AB032930.1</a> Escherichia coli EHEC-hlyC, A, B, ...	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 4589740 dbj AB011549.2</a> Escherichia coli plasmid pO157 DNA, c	<a href="#">44.1</a>	0.019
<a href="#">gi 57281839 emb AJ243564.1</a> <a href="#">ECO243564</a> Escherichia coli plasmid...	<a href="#">42.1</a>	0.076

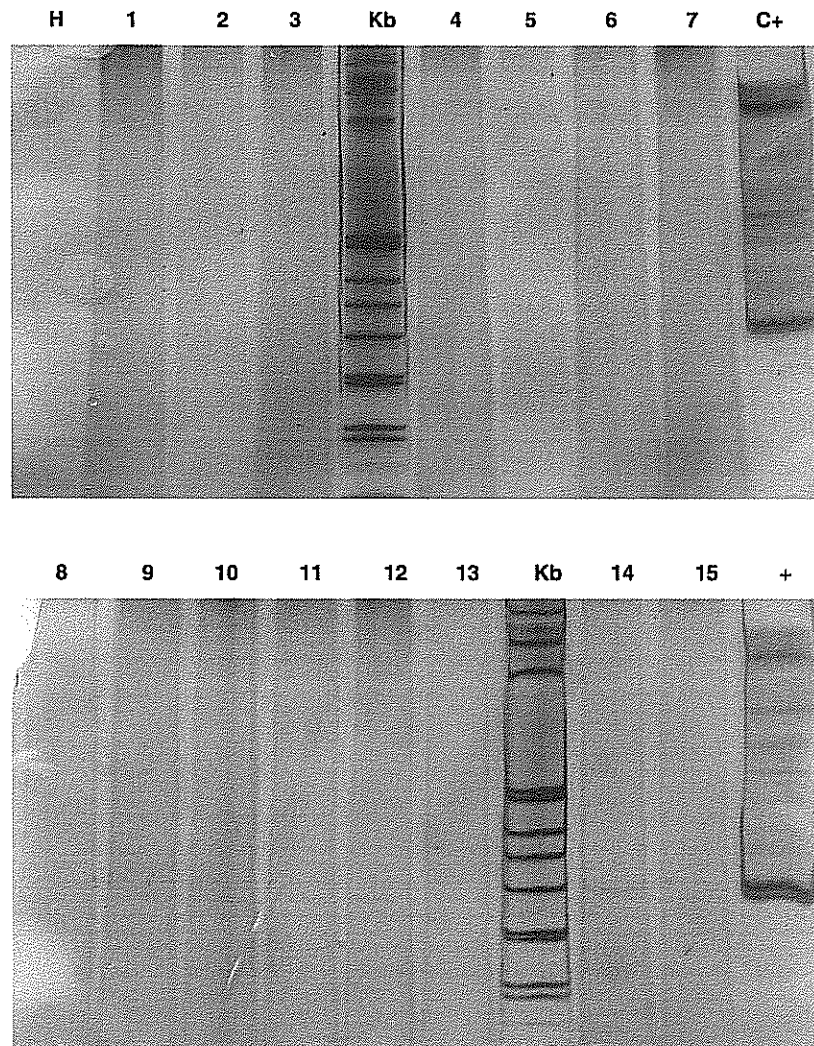


Figura7: Resultados de ensayo para detectar el serogrupo O157 de Escherichia coli O157:H7 en muestreo de aver por enjuague. Se sometió a PAGE productos de amplificación obtenidos mediante el ensayo 1 de PCR. 1 a 15 Muestras obtenidas por enjuague de ave según lo siguiente: 1 a 3, triplicados de muestra 1; 4 a 6, triplicados de muestra 2; 7 a 9, triplicados de muestra 3; 10 a 12, triplicados de muestra 4; 13 a 15, triplicados de muestra ; + control positivo de PCR, H control negativo de PCR, C+ Control positivo de extracción, C- control negativo de extracción y Kb marcador de peso molecular

Anexo 8: Manuales de procedimientos para la detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 mediante PCR.

1

**Manual de procedimientos**  
**Identificación de *Escherichia coli* O157:H7**  
**mediante PCR**

Diciembre, 2005

DIAGNOTEC S.A.  
Fundación Chile.

## Contenido

Introducción.....	3
<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	3
Detección de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 mediante PCR.....	3
Alcance y campo de aplicación.....	5
Sensibilidad y especificidad.....	5
Materiales y equipos.....	6
Reactivos:.....	6
Materiales:.....	6
Equipos:.....	6
Procedimientos.....	7
Precauciones para prevenir contaminaciones:.....	7
Controles:.....	7
Protocolo:.....	8
Enriquecimiento en medio de cultivo:.....	8
Extracción del material genético:.....	8
Amplificación del material genético:.....	9
Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida:.....	9
Análisis de resultados.....	10
Análisis de controles de extracción.....	10
Análisis de controles de PCR.....	11
Referencias:.....	12



## **Introducción**

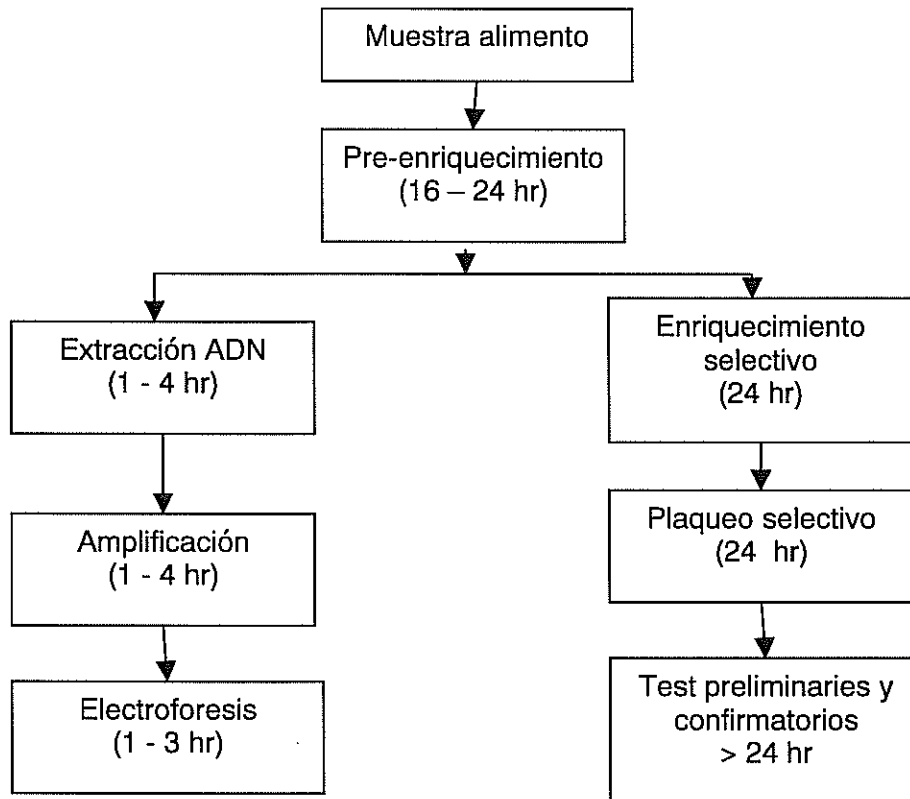
### ***Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* O157:H7 es una de las cientos de cepas existentes de la bacteria *Escherichia coli*. Aunque la mayoría de estas cepas son inofensivas y viven en los intestinos de humanos y animales sanos, *Escherichia coli* O157:H7 es un bacilo Gram – negativa, no formador de esporas y que produce grandes cantidades de una o más potentes toxinas y factores de virulencia que pueden causar severos daños en al pared del intestino.

### ***Detección de Escherichia coli* O157:H7 mediante PCR**

El método descrito en este manual utiliza la reacción de polimerización en cadena (PCR) para detectar el ADN de *Escherichia coli* O157:H7 Este método de detección se puede acoplar al primer paso de la metodología tradicional y permite obtener resultados confiables en un menor tiempo.

En el siguiente esquema se compara las etapas y tiempo de éstas para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 mediante PCR y la metodología tradicional. Se observa la ventaja en tiempo requerido para la detección mediante PCR.



**Figura 1:** Etapas y tiempo de éstas para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 mediante PCR y la metodología tradicional.

En el método de PCR se utiliza un par de oligonucleotidos, moléculas de ADN denominados partidores, las que se unen específicamente a distintas zonas del ADN de *Escherichia coli* O157:H7 por homología entre sus secuencias. Mediante la reacción de polimerización en cadena, el fragmento de ADN de la bacteria comprendido entre dichas secuencias es amplificado permitiendo su visualización en un gel de agarosa o poliacrilamida.

Se utilizan 3 ensayos de PCR, 2 ensayos de PCR simple para la detección del serogrupo O157 y del serotipo H7 y 1 ensayo de PCR múltiple para la detección de los factores de virulencia y toxinas. Los tamaños de los fragmentos amplificados son los siguientes:

- **Ensayo 1:** Serogrupo O157: 259 pb
- **Ensayo 2:** Serotipo H7: 625 pb
- **Ensayo 3:** Factor intimina: 384 pb
- **Ensayo 3:** Factor hemolisina: 534 pb
- **Ensayo 3:** Verotoxina 1: 180 pb
- **Ensayo 3:** Verotoxina 2: 255 pb

## ***Alcance y campo de aplicación***

Esta metodología es aplicable a carnes rojas y blancas para consumo.

## ***Sensibilidad y especificidad***

La especificidad de este método se probó sobre 7 aislados de *Escherichia coli* O157:H7 provenientes de distintas fuentes, obteniéndose resultado positivo en el 100% de los casos. Además se analizaron 30 cepas de bacterias distintas a *Escherichia coli* O157:H7, las que dieron resultados negativos en todos los casos.

La sensibilidad del método se estudió según lo establece la norma internacional AFNOR para la validación de métodos alternativos, se logró determinar que el límite de sensibilidad para detectar *Escherichia coli* O157:H7 en 25 gr de carnes de ave, bovino y porcino es de 1 a 10 ufc. Para carnes de ovino el límite de detección es de 2 a 20 ufc.

## Materiales y equipos

### **Reactivos:**

Los reactivos necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>Reactivo</b>	<b>Almacenamiento</b>
Taq polimerasa	- 20 °C
dNTPs	- 20 °C
Lisozima	- 20 °C
Kit "high pure PCR template purification kit" de Roche	Temp. amb.
Buffer Tris EDTA 10 mM	4 °C
Reactivos PCR según lo descrito en las referencias 3 y 5.	

### **Materiales:**

Los materiales necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>mATERIAL</b>
Tubos eppendorf para 2, 1.5 y 0.2 ml.
Micropipetas y jeringas.
Puntas con filtro para micropipeta.
Gel de agarosa o poliacrilamida

### **Equipos:**

Los equipos necesarios para desarrollar el método son los siguientes:

<b>Equipos</b>
Vortex
Microcentrífuga de mesa
Incubador de temperatura para tubos
Termociclador
Cámara de geles o poliacrilamida.
Fuente de poder.

## Procedimientos

### ***Precauciones para prevenir contaminaciones:***

Debido a que *Escherichia coli O157:H7* es un microorganismo capaz de provocar enfermedades en el ser humano, debe observar las prácticas de bioseguridad de nivel 2 para maximizar la seguridad en el laboratorio y evitar la contaminación ambiental y del personal con muestras y controles positivos.

Además, debe tener en cuenta que la reacción de polimerización en cadena es una técnica sensible capaz de amplificar pequeñas muestras del ADN objetivo, por lo tanto es necesario implementar prácticas especiales en el laboratorio para evitar la contaminación con controles positivos o muestras anteriores. Las siguientes precauciones se deben adoptar para evitar la contaminación cruzada durante el proceso:

- ❖ Mantener áreas separadas y equipos exclusivos para la preparación de muestras, preparación de mix de PCR, amplificación y análisis de los resultados.
- ❖ Utilizar delantales exclusivos por área y guantes.
- ❖ Cambiar los guantes cada vez que se sospeche de contaminación.
- ❖ Utilice micropipetas de desplazamiento positivo o de desplazamiento de aire y puntas con filtro. Cambie las puntas cada vez.
- ❖ Alicuote los reactivos, manténgalos cerrados siempre que sea posible.

### ***Controles:***

Para asegurar la interpretación correcta de los resultados se deben utilizar controles positivos y negativos en las etapas de extracción y amplificación.

Para la etapa de extracción se debe utilizar como control positivo una muestra obtenida de la metodología tradicional inoculada con 1 ml de medio de cultivo *Escherichia coli O157:H7*. Como control negativo se utiliza agua estéril.

Para la etapa de amplificación se debe utilizar como control positivo 5 µl de una solución de *Escherichia coli O157:H7* resuspendida en agua estéril, calentada por 10 minutos a 100°C. Como control negativo se utiliza agua estéril.

## ***Protocolo:***

### **Enriquecimiento en medio de cultivo:**

Incube 25 gr del material de muestra en 225 ml de un medio de enriquecimiento apropiado, según la metodología tradicional a utilizar, durante 18 a 24 hrs a 37°C.

### **Extracción del material genético:**

Realice la extracción del material genético según el siguiente protocolo:

1. Traspasar 1 ml de cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 ml, centrifugar a 1.000 rpm durante 1 minuto para sedimentar los trozos de alimento presentes en la muestras y traspasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml.
2. Lavar de la siguiente forma: Centrifugar a 6.000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de buffer Tris HCl 100 mM EDTA 10 mM, utilizando vortex por 3 minutos. Centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 200  $\mu$ l de buffer Tris HCl 100 mM EDTA 10 mM.
4. Agregar 25  $\mu$ l de lisozima 10 mg/ml. Mezclar e incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Agregar 20  $\mu$ l de proteinasa K 20 mg/ml y 25  $\mu$ l de Sarcosyl 125 mg/ml. Mezclar e incubar a 65 °C por 15 minutos.
6. Hervir las muestras por 10 minutos.
7. Enfriar en hielo por 5 minutos.
8. Agregar 1 ml de etanol absoluto frío.
9. Dejar precipitando a -20°C durante toda la noche.
10. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos, a 4°C.
11. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%.
12. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos, a 4°C.
13. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
14. Resuspender el pellet en 50  $\mu$ l de agua sin nucleasas estéril.

## **Amplificación del material genético:**

1. Siguiendo las indicaciones del punto "Precauciones para prevenir contaminaciones", descongele los reactivos de PCR (excepto la *taq* polimerasa) y prepare las mezclas de reacción según lo descrito en las siguientes referencias:
  - **Ensayo 1:** Serogrupo O157 Referencia 5.
  - **Ensayo 2:** Serotipo H7 Referencia 3.
  - **Ensayo 3:** Factores y toxinas Referencia 5.
2. Por cada muestra a analizar colocar en un tubo de 0,2 ml 45  $\mu$ l de la mezcla, agregar 5  $\mu$ l del DNA extraído y disponer el tubo en el termociclador con el programa de amplificación descrito en la referencia correspondiente. Conservar a 4°C.

## **Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida:**

La detección de los productos de amplificación se realiza mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Prepare las muestras a analizar mezclando 10  $\mu$ l del respectivo tubo de reacción de PCR con un volumen equivalente de buffer de carga, incorpore los controles y un marcador de peso molecular de 1 Kb. Efectué la electroforesis a 150 Volt y finalmente visualice la presencia del producto amplificado mediante tinción con nitrato de plata.

## Análisis de resultados

- Si se observa una banda de:
  - **259 pb** en el gel correspondiente al ensayo 1,
  - **625 pb** en el gel correspondiente al ensayo 2,
  - **384 pb, 534 pb, 180 pb y/o 255** en el gel correspondiente al ensayo 3,

El resultado obtenido es **Positivo**, la muestra contiene DNA de *Escherichia coli O157:H7*, según los tamaños descritos en la página 4.

- No se observa banda de:
  - **259 pb** en el gel correspondiente al ensayo 1,
  - **625 pb** en el gel correspondiente al ensayo 2,
  - **384 pb, 534 pb, 180 pb y/o 255** en el gel correspondiente al ensayo 3,

El resultado obtenido es **Negativo**, la muestra no contiene DNA de *Escherichia coli O157:H7*.

En ambos casos es indispensable analizar los resultados obtenidos en los controles.

## Análisis de controles de extracción

- El control negativo de extracción no presenta bandas de los tamaños esperados.
- No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la extracción.
- El control positivo de extracción presenta una banda de los tamaños esperados según el ensayo aplicado.

La extracción se realizó de forma exitosa.



**Si obtiene estos resultados en los controles de extracción, debe continuar corroborando los resultados de los controles de amplificación. En caso de obtener cualquiera de los perfiles descritos a continuación los resultados obtenidos quedan invalidados.**

- El control negativo de extracción presenta banda de los tamaños esperados.

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control positivo de extracción no presenta una banda de los tamaños esperados según el ensayo aplicado.

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues la extracción no se realizó de forma exitosa.

### **Análisis de controles de PCR**

- El control negativo de PCR no presenta banda de los tamaños esperados.

No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la amplificación.

- El control positivo de PCR presenta una banda de los tamaños esperados según el ensayo aplicado.

La amplificación se realizó de forma exitosa.

**Si obtiene estos resultados en los controles de amplificación puede interpretar de forma correcta los resultados de sus muestras. En caso de obtener cualquiera de los perfiles descritos a continuación los resultados obtenidos quedan invalidados.**

- El control negativo de PCR presenta banda de los tamaños esperados.

Los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control negativo de PCR presenta una banda de los tamaños esperados según el ensayo aplicado.

Se invalidan los resultados obtenidos, pues la amplificación no se realizó de forma exitosa.

## Referencias:

1. AFNOR validation of alternative analysis methods, rev 7. 2002. Microbiology Technical Board
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson J. "Molecular biology of the cell". 3ra Edición, Garland Publishing, 1994.
3. Fratamico, P.M., Bagi, L.K., Tiziana, P. "A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feaces" J. food prot., 2000, 63, 1032 – 1037.
4. ISO 16140, 1ª edición 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.
5. Paton, A. y Paton, J. "Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, *rfb*<sub>O157</sub>". Journal of clinical microbiology, 1998, 36, 598 – 602.

**Manual de procedimientos**  
**Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR**

Diciembre, 2005

DIAGNOTEC S.A.  
Fundación Chile.

## Contenido

Introducción .....	3
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR.....	3
Alcance y campo de aplicación.....	4
Sensibilidad y especificidad .....	5
Materiales y equipos.....	6
Reactivos: .....	6
Materiales: .....	6
Equipos:.....	6
Procedimientos.....	7
Precauciones para prevenir contaminaciones: .....	7
Controles:.....	7
Protocolo:.....	8
Enriquecimiento en medio de cultivo:.....	8
Extracción del material genético:.....	8
Amplificación del material genético: .....	8
Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida: .....	9
Análisis de resultados.....	10
Análisis de controles de extracción .....	10
Análisis de controles de PCR.....	11
Referencias: .....	12

## **Introducción**

### ***Listeria monocytogenes***

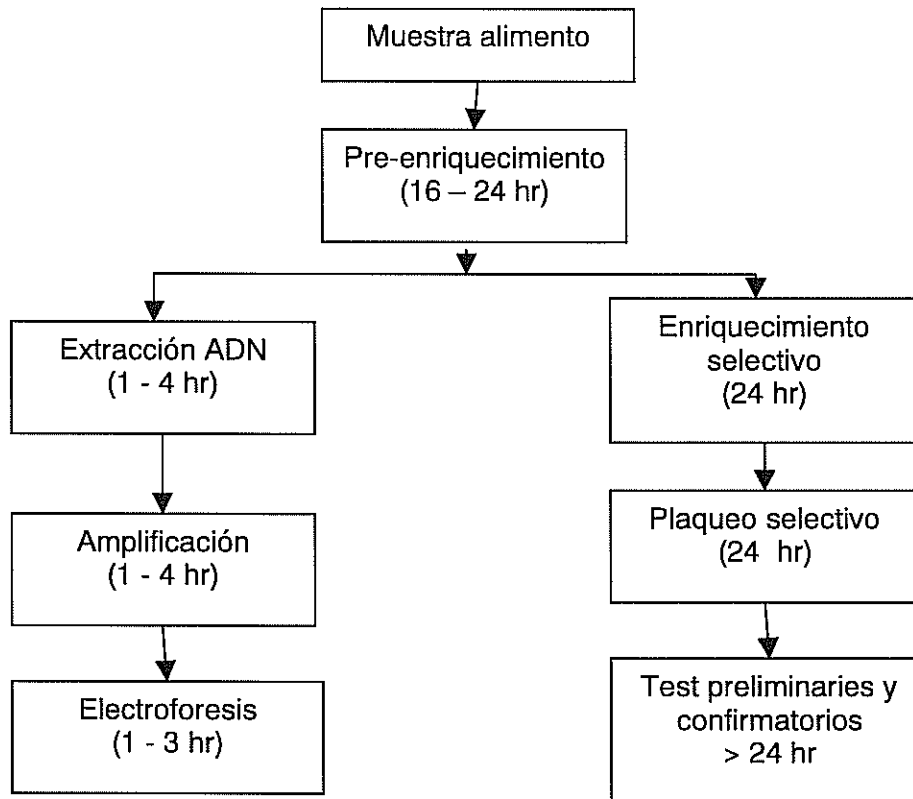
*Listeria monocytogenes* es un Bacilo Gram (+), no esporulado y móvil. Crece en un amplio rango de temperatura (2°C - 35°C), debido a su capacidad de proliferar a 4°C este patógeno tiene una alta incidencia en alimentos no procesados térmicamente y conservados por refrigeración. Además, las bacterias de la especie *Listeria* se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente del ser humano y se pueden transmitir a través la comida, especialmente alimentos derivados de la leche, carnes y productos crudos.

Las variedades hemolíticas de *Listeria monocytogenes* son responsables de un numero significativo de infecciones clínicas en mujeres embarazadas, recién nacidos e individuos inmunodeprimidos. Las manifestaciones de listeriosis incluyen meningoencefalitis, septicemia y aborto. La tasa de morbilidad es del 33%. Por esta razón, la detección temprana y certera de esta bacteria en los alimentos es de gran importancia.

### ***Detección de Listeria monoytogenes mediante PCR***

El método descrito en este manual utiliza la reacción de polimerización en cadena (PCR) para detectar el ADN de *Listeria monocytogenes*. Este método de detección se puede acoplar al primer paso de la metodología tradicional y permite obtener resultados confiables en un menor tiempo.

En el siguiente esquema se compara las etapas y tiempo de éstas involucradas en la detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR y la metodología tradicional. Se observa la ventaja en tiempo requerido para la detección mediante PCR.



**Figura 1:** Etapas y tiempo de éstas involucradas en la detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR y la metodología tradicional.

En el método de PCR se utiliza un par de oligonucleotidos, moléculas de ADN denominados partidores, los que se unen específicamente al ADN de *Listeria monocytogenes*, por homología entre sus secuencias. Mediante la reacción de polimerización en cadena, el fragmento de ADN de la bacteria comprendido entre dichas secuencias es amplificado permitiendo su visualización en un gel de agarosa o poliacrilamida.

### ***Alcance y campo de aplicación***

Esta metodología es aplicable a carnes rojas y blancas para consumo.

## ***Sensibilidad y especificidad***

La especificidad de este método se probó sobre 50 aislados de *Listeria monocytogenes* provenientes de distintas fuentes, obteniéndose resultado positivo en el 100% de los casos. Además se analizaron 30 cepas de bacterias distintas a *Listeria monocytogenes*, las que dieron resultados negativos en todos los casos.

La sensibilidad del método se estudió según lo establece la norma internacional AFNOR para la validación de métodos alternativos, se logró determinar que el límite de sensibilidad para detectar *Listeria monocytogenes* en 25 gr de carnes rojas y blancas es de 1 a 10 ufc.

## Materiales y equipos

### **Reactivos:**

Los reactivos necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>Reactivo</b>	<b>Almacenamiento</b>
Taq polimerasa	- 20 °C
dNTPs	- 20 °C
Lisozima	- 20 °C
Kit "high pure PCR template purification kit" de Roche	Temp. ambiente
Buffer Tris EDTA 10 mM	4 °C
Reactivos de PCR según lo descrito en la referencia 3	

### **Materiales:**

Los materiales necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>mATERIAL</b>
Tubos eppendorf para 2, 1.5 y 0.2 ml.
Micropipetas y jeringas.
Puntas con filtro para micropipeta.
Gel de agarosa o poliacrilamida

### **Equipos:**

Los equipos necesarios para desarrollar el método son los siguientes:

<b>Equipos</b>
Vortex
Centrífuga de mesa para tubos eppendorf
Incubador de temperatura para tubos
Termociclador
Cámara de geles o poliacrilamida.
Fuente de poder.



## Procedimientos

### ***Precauciones para prevenir contaminaciones:***

Debido a que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo capaz de provocar enfermedades en el ser humano, debe observar las prácticas de bioseguridad de nivel 2 para maximizar la seguridad en el laboratorio y evitar la contaminación ambiental y del personal con muestras y controles positivos.

Además, debe tener en cuenta que la reacción de polimerización en cadena es una técnica sensible capaz de amplificar pequeñas muestras del ADN objetivo, por lo tanto es necesario implementar prácticas especiales en el laboratorio para evitar la contaminación con controles positivos o muestras anteriores. Las siguientes precauciones se deben adoptar para evitar la contaminación cruzada durante el proceso:

- ❖ Mantener áreas separadas y equipos exclusivos para la preparación de muestras, preparación de mix de PCR, amplificación y análisis de los resultados.
- ❖ Utilizar delantales exclusivos por área y guantes.
- ❖ Cambiar los guantes cada vez que se sospeche de contaminación.
- ❖ Utilice micropipetas de desplazamiento positivo o de desplazamiento de aire y puntas con filtro. Cambie las puntas cada vez.
- ❖ Alicuote los reactivos, manténgalos cerrados siempre que sea posible.

### ***Controles:***

Para asegurar la interpretación correcta de los resultados se deben utilizar controles positivos y negativos en las etapas de extracción y amplificación.

Para la etapa de extracción se debe utilizar como control positivo una muestra obtenida de la metodología tradicional inoculada con 1 ml de medio de cultivo *Listeria monocytogenes*. Como control negativo se utiliza agua estéril.

Para la etapa de amplificación se debe utilizar como control positivo 5  $\mu$ l de una solución de *Listeria monocytogenes* resuspendida en agua estéril, calentada por 10 minutos a 100°C. Como control negativo se utiliza agua estéril.

## **Protocolo:**

### **Enriquecimiento en medio de cultivo:**

Incube 25 gr del material de muestra en 225 ml de un medio de enriquecimiento apropiado, según la metodología tradicional a utilizar, durante 18 a 24 hrs. a 37°C.

### **Extracción del material genético:**

Realice la extracción del material genético según el siguiente protocolo:

1. Traspase 2 ml de cultivo a un tubo eppendorf de 2 ml, centrifugue a 1.000 rpm durante 1 minuto para sedimentar los trozos de alimento presentes en la muestras y traspase el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml.
2. Lave la muestra dos veces de la siguiente forma: Centrifugue a 6.000 rpm durante 5 minutos, elimine el sobrenadante y resuspenda el pellet en 2 ml de buffer Tris HCl 10 mM EDTA 10 mM, utilizando vortex por 3 minutos. Centrifugue nuevamente y elimine el sobrenadante.
3. Resuspenda el pellet en 200 µl de agua estéril, posteriormente hierva las muestras durante 10 minutos.
4. Continúe la extracción del material genético según las instrucciones del kit "High pure PCR template purification kit" de Roche.

### **Amplificación del material genético:**

1. Siguiendo las indicaciones del punto "Precauciones para prevenir contaminaciones", descongele los reactivos de PCR (excepto la *taq* polimerasa) y prepare la mezcla de reacción según lo descrito en la referencia 3.
2. Por cada muestra a analizar colocar en un tubo de 0,2 ml 45 µl de la mezcla, agregar 5 µl del DNA extraído y disponer el tubo en el termociclador con el programa de amplificación descrito en la referencia correspondiente. Conservar a 4°C.

### **Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida:**

La detección de los productos de amplificación se realiza mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Prepare las muestras a analizar mezclando 10  $\mu$ l del respectivo tubo de reacción de PCR con un volumen equivalente de buffer de carga, incorpore los controles y un marcador de peso molecular de 1 Kb. Efectué la electroforesis a 150 Volts y finalmente visualice la presencia del producto amplificado mediante tinción con nitrato de plata.

## Análisis de resultados

- Si se observa una banda de **234 pb** en el gel:

El resultado obtenido es **Positivo**, la muestra contiene DNA de *Listeria monocytogenes*.

- No se observa banda a la altura de **234 pb** en el gel:

El resultado obtenido es **Negativo**, la muestra no contiene DNA de *Listeria monocytogenes*.

En ambos casos es indispensable analizar los resultados obtenidos en los controles utilizados durante el proceso.

## Análisis de controles de extracción

- El control negativo de extracción no presenta banda a la altura de **234 pb**.  
No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la extracción.
- El control positivo de extracción presenta una banda a la altura de **234 pb**.

La extracción se realizó de forma exitosa.

**Si obtiene estos resultados en los controles de extracción, debe continuar corroborando los resultados de los controles de amplificación. En caso de obtener cualquiera de los resultados descritos a continuación en los controles, los resultados obtenidos en las muestras quedan invalidados.**

- El control negativo de extracción presenta banda a la altura de **234 pb**.

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control positivo de extracción no presenta una banda a la altura de **234 pb**.

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues la extracción no se realizó de forma exitosa.

### **Análisis de controles de PCR**

- El control negativo de PCR no presenta banda a la altura de **234 pb**.

No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la amplificación.

- El control positivo de PCR presenta una banda a la altura de **234 pb**.

La amplificación se realizó de forma exitosa.

**Si obtiene estos resultados en los controles de amplificación puede interpretar de forma correcta los resultados de sus muestras. En caso de obtener cualquiera de los resultados descritos a continuación en los controles, los resultados obtenidos en las muestras quedan invalidados.**

- El control negativo de PCR presenta banda a la altura de **234 pb**.

Los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control negativo de PCR presenta una banda a la altura de **234 pb**.

Se invalidan los resultados obtenidos, pues la amplificación no se realizó de forma exitosa.

## Referencias:

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson j. "Molecular biology of the cell". 3ra Edición, Garland Publishing, 1994.
2. AFNOR validation of alternative analysis methods, rev 7. 2002. Microbiology Technical Board
3. Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C. and Luethy, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. Journal of Applied Bacteriology, 1991, 70, 372–379
4. ISO 11290-1 1<sup>st</sup> edition 1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.
5. ISO 16140, 1<sup>a</sup> edition 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.

**Manual de procedimientos**  
**Identificación de *Salmonella spp.* mediante PCR**

Diciembre, 2005

DIAGNOTEC S.A.  
Fundación Chile.

## Contenido

Introducción .....	3
<i>Salmonella</i> spp. ....	3
Detección de <i>Salmonella</i> spp. mediante PCR .....	3
Alcance y campo de aplicación.....	4
Sensibilidad y especificidad .....	5
Materiales y equipos.....	6
Reactivos: .....	6
Materiales: .....	6
Equipos:.....	6
Procedimientos.....	7
Precauciones para prevenir contaminaciones: .....	7
Controles:.....	7
Protocolo:.....	8
Enriquecimiento en medio de cultivo:.....	8
Extracción del material genético:.....	8
Amplificación del material genético: .....	8
Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida:.....	9
Análisis de resultados.....	10
Análisis de controles de extracción .....	10
Análisis de controles de PCR.....	11
Referencias: .....	12



## Introducción

### ***Salmonella spp.***

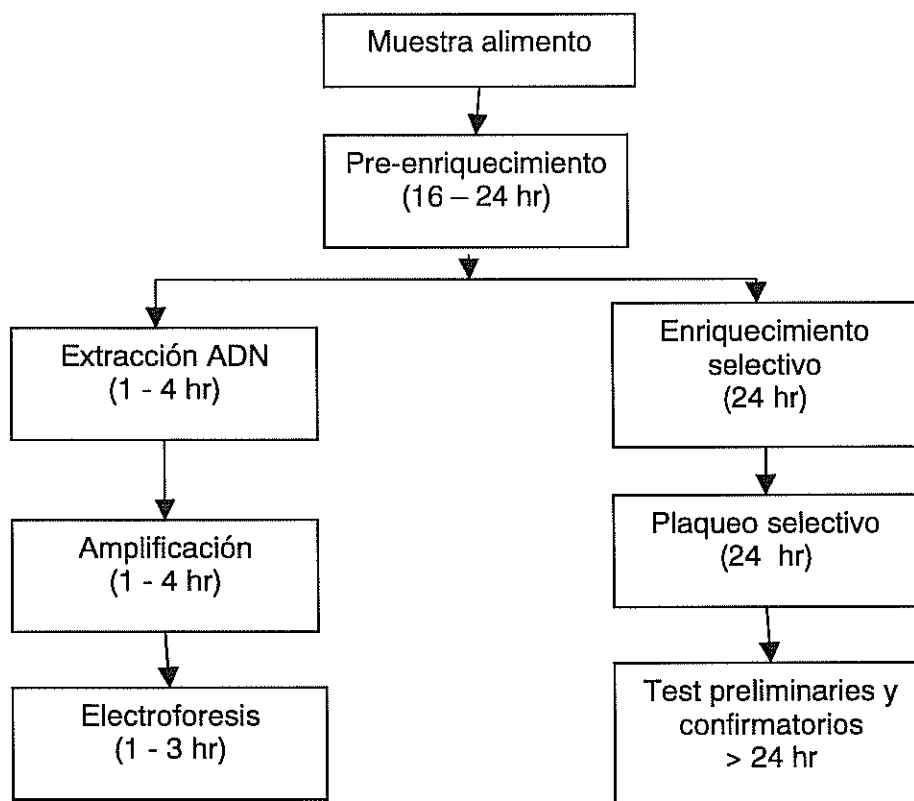
*Salmonella* es un bacilo Gram (-), no esporulado y móvil, la que con – con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, está presente en animales, especialmente en aves de corral y cerdos. Las fuentes ambientales del organismo incluyen el agua, suelo, insectos, superficies de la fábrica, superficies de la cocina, heces animales, carnes crudas, aves de corral crudas, y mariscos crudos, por nombrar solamente algunos.

Existen más de 2000 serotipos de *Salmonella* y la mayoría de ellos son patógenos humanos. La salmonelosis es la causa de aproximadamente 4 millones de infecciones en los Estados Unidos con resultado de mil muertes anuales, según estimaciones de los centros de control y prevención de enfermedades (CDC). Por esta razón, la detección temprana y certera de esta bacteria en los alimentos es de gran importancia.

### ***Detección de Salmonella spp. mediante PCR***

El método descrito en este manual utiliza la reacción de polimerización en cadena (PCR) para detectar el ADN de *Salmonella* spp. Este método de detección se puede acoplar al primer paso de la metodología tradicional y permite obtener resultados confiables en un menor tiempo.

En el siguiente esquema se compara las etapas y tiempo de éstas involucradas en la detección de *Salmonella* spp. mediante PCR y la metodología tradicional. Se observa la ventaja en tiempo requerido para la detección mediante PCR.



**Figura 1:** Etapas y tiempo de éstas involucradas en la detección de *Salmonella spp.* mediante PCR y la metodología tradicional.

En el método de PCR se utiliza un par de oligonucleotidos, moléculas de ADN denominados partidores, los que se unen específicamente al ADN de *Salmonella spp.*, por homología entre sus secuencias. Mediante la reacción de polimerización en cadena, el fragmento de ADN de la bacteria comprendido entre dichas secuencias es amplificado permitiendo su visualización en un gel de agarosa o poliacrilamida.

### ***Alcance y campo de aplicación***

Esta metodología es aplicable a carnes rojas y blancas para consumo.

## ***Sensibilidad y especificidad***

La especificidad de este método se probó sobre 50 aislados de *Salmonella spp.* provenientes de distintas fuentes, obteniéndose resultado positivo en el 100% de los casos. Además se analizaron 30 cepas de bacterias distintas a *Salmonella spp.*, las que dieron resultados negativos en todos los casos.

La sensibilidad del método se estudió según lo establece la norma internacional AFNOR para la validación de métodos alternativos, se logró determinar que el límite de sensibilidad para detectar *Salmonella spp.* en 25 gr de carnes rojas y blancas es de 1 a 10 ufc.

## Materiales y equipos

### **Reactivos:**

Los reactivos necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>Reactivo</b>	<b>Almacenamiento</b>
Taq polimerasa	- 20 °C
dNTPs	- 20 °C
Lisozima	- 20 °C
Kit "high pure PCR template purification kit" de Roche	Temp. amb.
Buffer Tris EDTA 10 mM	4 °C
Reactivos PCR según lo descrito en la referencia 1	

### **Materiales:**

Los materiales necesarios para desarrollar el método que se describe son los siguientes:

<b>mATERIAL</b>
Tubos eppendorf para 2, 1.5 y 0.2 ml.
Micropipetas y jeringas.
Puntas con filtro para micropipeta.
Gel de agarosa o poliacrilamida

### **Equipos:**

Los equipos necesarios para desarrollar el método son los siguientes:

<b>Equipos</b>
Vortex
Microcentrífuga de mesa
Incubador de temperatura para tubos
Termociclador
Cámara de geles o poliacrilamida.
Fuente de poder.

## Procedimientos

### ***Precauciones para prevenir contaminaciones:***

Debido a que *Salmonella spp.* es un microorganismo capaz de provocar enfermedades en el ser humano, debe observar las prácticas de bioseguridad de nivel 2 para maximizar la seguridad en el laboratorio y evitar la contaminación ambiental y del personal con muestras y controles positivos.

Además, debe tener en cuenta que la reacción de polimerización en cadena es una técnica sensible capaz de amplificar pequeñas muestras del ADN objetivo, por lo tanto es necesario implementar prácticas especiales en el laboratorio para evitar la contaminación con controles positivos o muestras anteriores. Las siguientes precauciones se deben adoptar para evitar la contaminación cruzada durante el proceso:

- ❖ Mantener áreas separadas y equipos exclusivos para la preparación de muestras, preparación de mix de PCR, amplificación y análisis de los resultados.
- ❖ Utilizar delantales exclusivos por área y guantes.
- ❖ Cambiar los guantes cada vez que se sospeche de contaminación.
- ❖ Utilice micropipetas de desplazamiento positivo o de desplazamiento de aire y puntas con filtro. Cambie las puntas cada vez.
- ❖ Alicuote los reactivos, manténgalos cerrados siempre que sea posible.

### ***Controles:***

Para asegurar la interpretación correcta de los resultados se deben utilizar controles positivos y negativos en las etapas de extracción y amplificación.

Para la etapa de extracción se debe utilizar como control positivo una muestra obtenida de la metodología tradicional inoculada con 1 ml de medio de cultivo *Salmonella spp.*. Como control negativo se utiliza agua estéril.

Para la etapa de amplificación se debe utilizar como control positivo 5 µl de una solución de *Salmonella spp.* resuspendida en agua estéril, calentada por 10 minutos a 100°C. Como control negativo se utiliza agua estéril.

## **Protocolo:**

### **Enriquecimiento en medio de cultivo:**

Incube 25 gr del material de muestra en 225 ml de un medio de enriquecimiento apropiado, según la metodología tradicional a utilizar, durante 18 a 24 hrs a 37°C.

### **Extracción del material genético:**

Realice la extracción del material genético según el siguiente protocolo:

1. Traspase 2 ml de cultivo a un tubo eppendorf de 2 ml, centrifugue a 1.000 rpm durante 1 minuto para sedimentar los trozos de alimento presentes en la muestras y traspase el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml.
2. Lave la muestra dos veces de la siguiente forma: Centrifugue a 6.000 rpm durante 5 minutos, elimine el sobrenadante y resuspenda el pellet en 2 ml de buffer Tris HCl 10 mM EDTA 10 mM, utilizando vortex por 3 minutos. Centrifugue nuevamente y elimine el sobrenadante.
3. Resuspenda el pellet en 200 µl de agua estéril, posteriormente hierva las muestras durante 10 minutos.
4. Continúe la extracción del material genético según las instrucciones del kit "High pure PCR template purification kit" de Roche.

### **Amplificación del material genético:**

1. Siguiendo las indicaciones del punto "Precauciones para prevenir contaminaciones", descongele los reactivos de PCR (excepto la *taq* polimerasa) y prepare la mezcla de reacción según lo descrito en la referencia 1.
2. Por cada muestra a analizar colocar en un tubo de 0,2 ml 45 µl de la mezcla, agregar 5 µl del DNA extraído y disponer el tubo en el termociclador con el programa de amplificación descrito en la referencia correspondiente. Conservar a 4°C.

### **Detección mediante electroforesis en gel de poliacrilamida:**

La detección de los productos de amplificación se realiza mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Prepare las muestras a analizar mezclando 10  $\mu$ l del respectivo tubo de reacción de PCR con un volumen equivalente de buffer de carga, incorpore los controles y un marcador de peso molecular de 1 Kb. Efectué la electroforesis a 150 Volts y finalmente visualice la presencia del producto amplificado mediante tinción con nitrato de plata.

## **Análisis de resultados**

- Si se observa una banda de **429 pb** en el gel:

El resultado obtenido es **Positivo**, la muestra contiene DNA de *Salmonella spp.*

- No se observa banda a la altura de **429 pb** en el gel:

El resultado obtenido es **Negativo**, la muestra no contiene DNA de *Salmonella spp.*

En ambos casos es indispensable analizar los resultados obtenidos en los controles.

## **Análisis de controles de extracción**

- El control negativo de extracción no presenta banda a la altura de **429 pb**.

No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la extracción.

- El control positivo de extracción presenta una banda a la altura de **429 pb**.

La extracción se realizó de forma exitosa.

**Si obtiene estos resultados en los controles de extracción, debe continuar corroborando los resultados de los controles de amplificación. En caso de obtener cualquiera de los resultados descritos a continuación en los controles, los resultados obtenidos en las muestras quedan invalidados.**



- El control negativo de extracción presenta banda a la altura de **429 pb.**

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control positivo de extracción no presenta una banda a la altura de **429 pb.**

En este caso, los resultados obtenidos quedan invalidados, pues la extracción no se realizó de forma exitosa.

### **Análisis de controles de PCR**

- El control negativo de PCR no presenta banda a la altura de **429 pb.**

No hubo contaminación cruzada entre las muestras durante la amplificación.

- El control positivo de PCR presenta una banda a la altura de **429 pb.**

La amplificación se realizó de forma exitosa.

**Si obtiene estos resultados en los controles de amplificación puede interpretar de forma correcta los resultados de sus muestras. En caso de obtener cualquiera de los resultados descritos a continuación en los controles, los resultados obtenidos en las muestras quedan invalidados.**

- El control negativo de PCR presenta banda a la altura de **429 pb.**

Los resultados obtenidos quedan invalidados, pues es posible que los resultados positivos se deban a una contaminación.

- El control negativo de PCR presenta una banda a la altura de **429 pb.**

Se invalidan los resultados obtenidos, pues la amplificación no se realizó de forma exitosa.

## Referencias:

1. Aabo, S., Rasmussen, O. F., Rossen, L., Sorensen, P. D., Olsen, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular probes*, 1993, 7, 171 – 178.
2. AFNOR validation of alternative analysis methods, rev 7. 2002. Microbiology Technical Board
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson j. "Molecular biology of the cell". 3ra Edición, Garland Publishing, 1994.
4. ISO 16140, 1ª edición 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.



# **MANUAL DE MUESTREO CARCASAS DE BOVINOS Y AVES**

**"IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE  
TÉCNICAS TRADICIONALES Y RÁPIDAS  
PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN  
PRODUCTOS CÁRNICOS Y LACTEOS"**

**Fundación Chile**

Santiago, Diciembre 2005

## MANUAL DE MUESTREO MICROBIOLÓGICO EN CARCASAS DE: BOVINOS Y AVES DE MATADERO

### 1. Objetivos

- 1.1 Cumplir con una metodología de muestreo validada, homologable y confiable, de manera que la muestra tomada sea una muestra representativa que permita un posterior análisis microbiológico confiable, ya sea para un control interno o para la certificación del producto.

### 2. Alcance y Campo de Aplicación

- 2.1 Es aplicable al muestreo de carcasas de bovino (canales, cortes, sub-productos) y muestreo de aves, para ser analizados microbiológicamente.

### 3. Responsabilidades

- 3.1 Es responsabilidad del muestreador la correcta realización de la toma de muestras para análisis microbiológico y completar el formulario de muestreo respectivo.
- 3.2 Es responsabilidad del Jefe de Laboratorio verificar la correcta aplicación de este procedimiento.

### 4. Referencias

- 4.1 ISO 17604:2003; Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis.

### 5. Principio o Fundamento

- 5.1 Realizar un muestreo estandarizado y validado permite realizar un análisis de la(s) muestra(s) confiable. El uso de técnicas asépticas, personal entrenado, medidas de bioseguridad, material de toma de muestras limpio y desinfectado además de la correcta rotulación de la(s) muestra(s) incluida toda la información anexa complementaria al muestreo (identificación de la muestra, fecha, hora, lote, responsable toma de muestras, temperatura, etc), aseguran la correcta toma de muestras.

Preparado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Fecha:	Fecha:	Fecha:
Firma:	Firma:	Firma:

Fecha de Vigencia:

## 6. Definiciones

- 6.1 **Lote:** Conjunto homogéneo de envases o unidades primarias, de peso, tipo y clase similares procesados bajo condiciones semejantes, en una jornada de trabajo, las que se identifican con una clave de producción.
- 6.2 **Muestra:** Unidades representativas de un lote obtenidas mediante una aplicación de un plan de muestreo con el fin de realizar pruebas y análisis microbiológicos.
- 6.3 **Tamaño muestra:** Número de unidades que contiene la muestra tomada desde un lote, se simboliza por "n".
- 6.4 **Muestra representativa:** Fracción del lote que posee las características del total.
- 6.5 **Muestreo:** Procedimiento usado para extraer o constituir una muestra.
- 6.6 **Plantilla:** marco de metal o plástico con un área interna descubierta. El área descubierta debe tener las dimensiones que se señalan en este procedimiento, según especie y en ella se realizarán los hisopados de arrastre que se mencionan.

## 7. Aparatos (materiales)

- 7.1 Plantilla cuadrada estéril, con área interna de 100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cm).
- 7.2 Bolsas plásticas estériles con esponjas en su interior.
- 7.3 Bolsas plásticas estériles resellables pequeñas.
- 7.4 Bolsas plásticas estériles resellables grandes.
- 7.5 Cajas térmicas tipo Coleman.
- 7.6 Bolsas de hielo (Gel-Pack).
- 7.7 Botellas tipo Duran Schot de capacidad.
- 7.8 Tubos de ensayo 18 x 180 con tapa rosca.
- 7.9 Termómetros.
- 7.10 Guantes estériles.
- 7.11 Mascarilla.
- 7.12 Gorro o cofia.
- 7.13 Lápiz marcador
- 7.14 Botas plásticas blancas.
- 7.15 Solución de cloro (0,05%).

## 8. Medios de Cultivo (ver anexo 16.1).

- 8.1 Solución de peptona sal (medio de transporte).

Preparado por: Fecha: Firma:	Revisado por: Fecha: Firma:	Aprobado por: Fecha: Firma:
------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Fecha de Vigencia:

## 9. Procedimiento o descripción de la actividad.

### 9.1 Técnica de muestreo: método, por esponja, para carcasas de bovino:

#### 9.1.1 Areas de la carcasa a muestrear

Los puntos de muestreo seleccionados en las carcasas son los de mayor prevalencia de contaminación. Para ello se adopta lo establecido por el SAG en el Manual de Procedimiento para Monitoreo Microbiológico Oficial en Mataderos de Exportación, procedimiento utilizado, actualmente, por los mataderos nacionales, (ver tabla A y figura N°1).

Tabla A

Carne Bovino	
Área	Zona
1	Cadera
2	Falda
3	Pecho
4	Cuello

Área N°1 (Cadera): Parte posterior del muslo, sobre el músculo semitendinoso.

Área N°2 (Falda): Parte ventral del abdomen, sobre el músculo recto abdominal.

Área N°3 (Pecho): Parte ventral del tórax, sobre los músculos pectorales que rodean al esternón.

Área N°4 (Cuello): Cara lateral dorsal del cuello, sobre el músculo trapecio porción cervical.

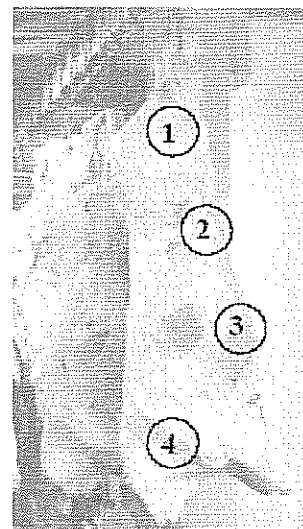


Figura N°1

#### 9.1.2 Técnica de Muestreo: método de muestreo por esponja

##### 9.1.2.1 Recolección de muestras

Localice los sitios del muestreo, de acuerdo a la figura anterior. Abrir la bolsa que contiene la esponja estéril y agregar peptona sal suficiente para humedecer la esponja sin exceso de fluido visible (ver figura N°2). Presionar la bolsa de manera de humedecer a fondo la esponja. Colocarse un par de guantes estériles y cuidadosamente remover la esponja desde la bolsa.

Preparado por: Fecha: Firma:	Revisado por: Fecha: Firma:	Aprobado por: Fecha: Firma:
------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Fecha de Vigencia:

Colocar la plantilla sobre el lugar (ver figura N°3). Pasar la esponja en el lado que incluye el muestreo (10 cm x 10 cm) por un total aproximado de 10 tiempos en dirección vertical y 10 tiempos en dirección horizontal (ver figura N°4).

Después de realizar el muestreo, colocar la esponja dentro de la bolsa. Agregar el diluyente adicional a la bolsa con la muestra para hacer un total de 25 mL.



Figura N°2



Figura N°3

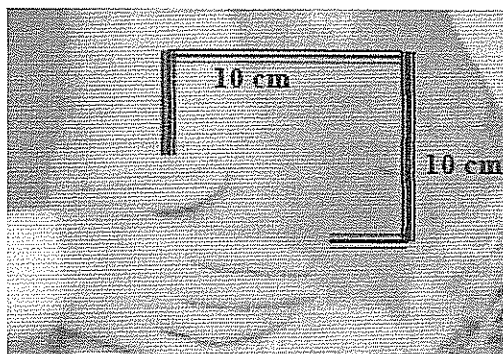


Figura N°4

Preparado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Fecha:	Fecha:	Fecha:
Firma:	Firma:	Firma:

Fecha de Vigencia:

### 9.1.3 Almacenamiento y transporte de muestras

Transportar las muestras en un cooler con ice pack o hielo picado en bolsa. No dejar que las muestras se congelen o tengan contacto con los ice packs o hielos, si se utilizan (ver figura N°5).

Procesar las muestras en el laboratorio dentro de 1 hora de recolección o almacenar a  $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 24 h.

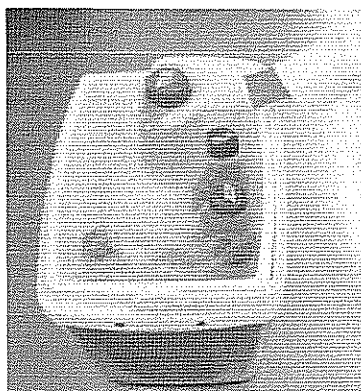


Figura N°5

## 9.2 Técnica de muestreo: Método, por enjuague, para carcasas de aves.

### 9.2.1 Técnica de Muestreo: método de muestreo por enjuague

#### 9.2.1.1 Recolección de muestras:

Seleccionar las carcasas a muestrear utilizando un procedimiento aleatorio.

Abrir la bolsa estéril (evitando contaminar el interior de la bolsa), utilizando guantes estériles, colocar la carcasa de ave dentro de la bolsa y agregar 500 ml del diluyente. Agitar por 30 segundos. Extraer la cantidad necesaria del homogenizado teniendo en cuenta previamente los análisis a realizar.

Después de realizar el muestreo, colocar el frasco dentro de una bolsa estéril resellable y previamente rotulada. Refrigerar inmediatamente.

Las carcasas ya muestreadas, vuelven a proceso, previo a un enjuague con agua corriente fría.

Preparado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Fecha:	Fecha:	Fecha:
Firma:	Firma:	Firma:

Fecha de Vigencia:



### 9.2.2 Almacenamiento y transporte de muestras

- 9.2.2.1 Transportar las muestras en un cooler con ice pack o hielo picado en bolsa. No dejar que las muestras se congelen o tengan contacto con los ice packs o hielos, si se utiliza. Procesar las muestras en el laboratorio dentro de 1 hora de recolección o almacenar a  $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 24 h.

## 10.- Interferencias

- 10.1 El diluyente debe estar siempre almacenado en frascos o tubos con la capacidad adecuada para la toma de muestra (técnica de muestreo por enjuague en carcasas de bovino).
- 10.2 El personal destinado para la toma de muestras deben ser mínimo dos personas, con el objetivo de que una de ellas se encarga de preparar y entregar el material (rotulación, apertura del material para toma de muestra estéril y recepción de muestra ya tomada) y la otra de la toma de muestra en sí.
- 10.3 El personal que toma la muestra debe utilizar el material (guantes y bolsas) estériles e individuales para cada muestra.

## 11. Bibliografía

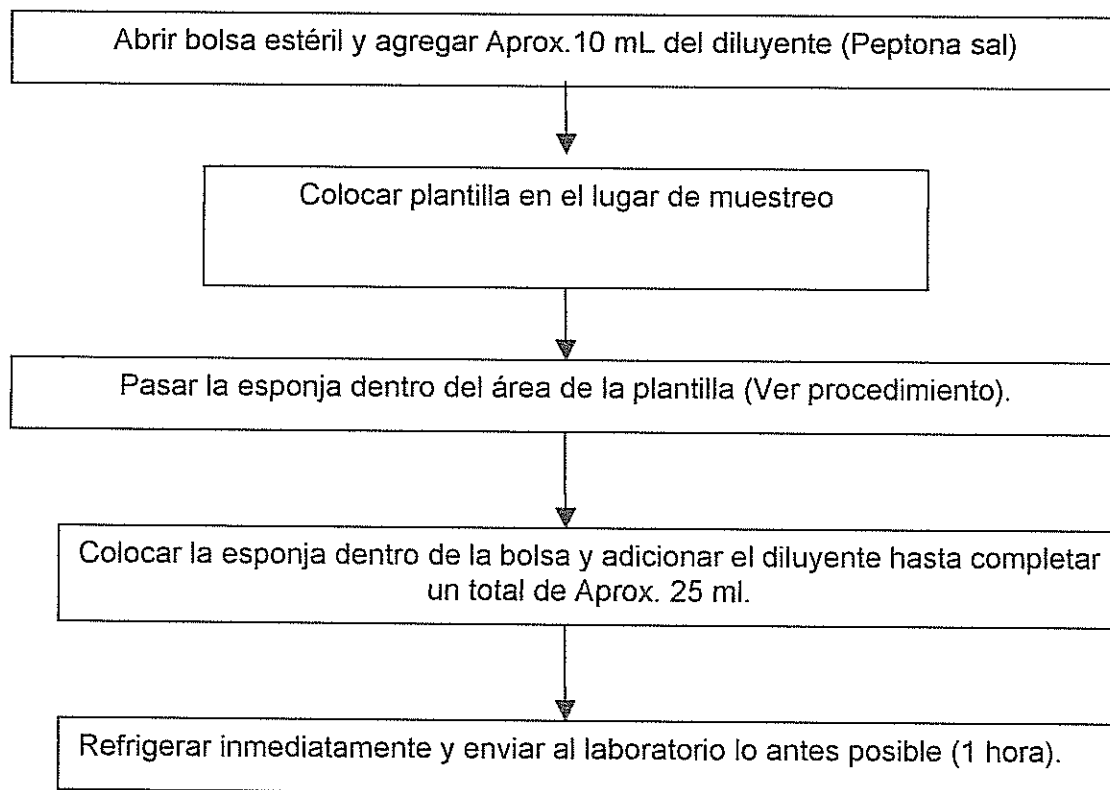
- 11.1 Manual de Procedimientos para Monitoreo Microbiológico Oficial en Mataderos de Exportación (pág.10 hasta 13, pág. 24 hasta 27 y pág.31 hasta 41).

Preparado por: Fecha: Firma:	Revisado por: Fecha: Firma:	Aprobado por: Fecha: Firma:
------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Fecha de Vigencia:

## 15. Diagramas de Flujo

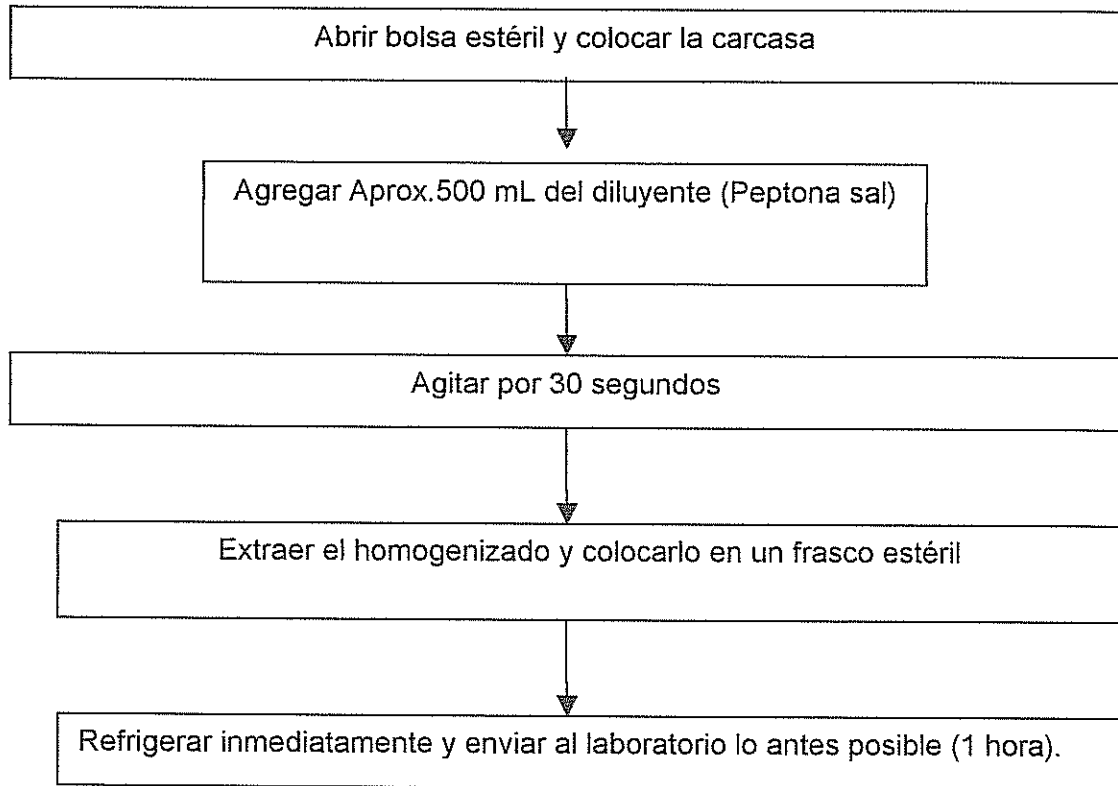
### 15.1 Técnica de muestreo: método, por esponja, para carcasas de bovino



Preparado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Fecha:	Fecha:	Fecha:
Firma:	Firma:	Firma:

Fecha de Vigencia:

### 15.2 Técnica de muestreo: método, por enjuague, para carcasas de ave



Preparado por: Fecha: Firma:	Revisado por: Fecha: Firma:	Aprobado por: Fecha: Firma:
------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Fecha de Vigencia:

**16. Anexo**

**16.1 Anexo Preparación Medios de Cultivo.**

**SOLUCION PEPTONA SAL**

Componentes	cantidad
Enzima digestiva de caseína	1,0 g
NaCl	8,5 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización el pH es de  $7,0 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Dispensar el medio asépticamente en frascos (o tubos) estériles con la capacidad suficiente para obtener las porciones necesarias para el análisis.

Esterilizar por 15 minutos en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ .

Preparado por: Fecha: Firma:	Revisado por: Fecha: Firma:	Aprobado por: Fecha: Firma:
------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Fecha de Vigencia: