

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Detección de *Salmonella* spp. Mediante PCR en
Muestras de Embutidos, Cereales y Superficies Inertes”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Ian Fabricio Armendáriz Toral

Pierina Elizabeth Barreiro Zambrano

GUAYAQUIL - ECUADOR

AÑO: 2013

AGRADECIMIENTO

Al Departamento de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), por permitirnos utilizar sus instalaciones, en especial al PhD. Efrén Santos por su guía y dedicación.

Al personal de Laboratorios PROTAL-ESPOL, por su esmero en la realización de proyecto y su gran acogida. En especial a la Dra. Gloria Bajaña por su paciencia y esfuerzo.

Ian Armendáriz

AGRADECIMIENTO

A la PhD. Esther Peralta, directora del CIBE, por darnos la oportunidad de desarrollar este tema. En especial PhD. Efrén Santos y también a todo su equipo por brindarnos su apoyo para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Gloria Bajaña por su confianza y por abrirnos las puertas de los Laboratorios de Protal para alcanzar nuestro objetivo. A la Dra. Mónica por su dedicación y perseverancia.

Pierina Barreiro

DEDICATORIA

A MIS PADRES: Hugo y Gloria, ellos son quienes me han motivado a llegar hasta acá, esto es para ellos.

Ian Armendáriz

DEDICATORIA

A DIOS quién, con su bendición, me ha permitido llegar hasta aquí.

A MIS PADRES Remberto Y Lorena por confiar en mí, por ser mis héroes y esforzarse con dedicación y entrega para que siempre estemos bien. Son ellos quienes han hecho de mí la persona que soy y les debo estar aquí conquistando una nueva meta.

A MI FAMILIA Y HERMANOS por darme todo su amor, apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

A Manuel por motivarme a seguir adelante.

A MIS AMIGOS con quienes he compartido estos últimos años llenos de altos y bajos, noches de estudio, viajes, y un sinnúmero de anécdotas.

Pierina Barreiro

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dr. Kléber Barcia V., PhD.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

PhD. Efrén Santos O.
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Priscila Castillo S.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Ian Fabricio Armendáriz T.

Pierina Elizabeth Barreiro Z.

RESUMEN

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio del genoma de la salmonela. El objetivo de este trabajo fue validar la detección de *Salmonella* spp. en muestras de interés para la industria alimentaria mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en comparación con la metodología tradicional (*Salmonella* en Alimentos. Método Oficial 967.26; AOAC).

Se evaluaron tres matrices de muestras: superficies inertes, cereales y embutidos con dos parejas de iniciadores en el PCR; cada matriz constó de 10 muestras y cada muestra se analizó por triplicado (muestra inoculada con un control positivo, un control negativo y sin inocular) para posteriormente realizar los análisis estadísticos, económicos y protocolares pertinentes.

Como resultado de los análisis realizados se tuvo que en Superficies 33 de las muestras dieron positivo y 67 negativo, en Cereales 28 dieron positivo, 67 negativo y 5 Falsos Negativos, por último en Embutidos se obtuvo 67 negativos, 25 positivos y 8 falsos positivos. Estos resultados demostraron que hay concordancia entre los métodos Tradicional y PCR, siendo ambas

técnicas eficientes para la detección de *Salmonella* spp. en las muestras analizadas.

Se validó estadísticamente la concordancia de resultados del procedimiento de detección de *Salmonella* spp. molecular y microbiológico, logrando identificar restricciones en el análisis y descartando amplificaciones de fragmentos genéticos no deseados.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Género <i>Salmonella</i>	7
1.3. Epidemiología	19
1.4. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
1.5. Descripción del ADN	47
1.6. Métodos tradicional y no tradicional para la detección de <i>Salmonella</i> spp. en la industria de alimentos.	55
CAPÍTULO 2	
2.1. OBJETIVOS	77
2.1.1. Objetivo general	77
2.1.2. Objetivos específicos	77
2.2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	78
2.2.1. Hipótesis	78
2.2.2. Justificación	79

CAPÍTULO 3

3. DISEÑO METODOLÓGICO	80
3.1. Población muestral	80
3.2. Descripción de las cepas.	81
3.3. Materiales y metodología	82
3.4. Análisis Estadístico	94
3.5. Validación	99

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS	100
4.1. Análisis estadístico comparativo del método PCR y Tradicional	100
4.2. Estimación de tiempos y costos	111
4.3. Discusión	115

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	121
-----------------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ABREVIATURAS

spp.:	Especies
<i>et al.</i> :	Colaboradores
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
H:	horas
Min:	Minutos
Seg:	Segundos
Ec.:	Ecuación
pH:	Potencial de hidrógeno
UV:	Ultravioleta
ATTC:	American Type Culture Collection
ETA:	Enfermedades transmitidas por alimentos
EDA	Enfermedades diarreicas agudas
EDTA:	Etilendiaminotetracético
cADN:	ADN complementario
ARNm:	ARN mensajero
A:	Adenina
T:	Timina
G:	Guanina
C:	Citosina
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
°C:	Grados Celsius
bp:	Pares de bases
µm:	Micrómetros
µl:	Microlitros
µg:	Microgramos
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
KCl:	Cloruro de Potasio
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
K:	Índice de Kappa
Po:	Proporción de concordancia observada
Pe:	Proporción de concordancia esperada

n:	Número de muestras
PR:	Precisión relativa
SR:	Sensibilidad relativa
ER:	Especificidad relativa
AP:	Acuerdos positivos
AN:	Acuerdos negativos
VP:	Verdaderos positivos
FP:	Falsos positivos
FN:	Falsos negativos

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Organización de Operones en un SST3.....	55
Figura 3. 1. <i>Salmonella</i> Positivo en Hektoen Entérico Agar.....	85
Figura 3. 2. <i>Salmonella</i> Positivo en Bismuto Sulfito Agar.	85
Figura 3. 3. <i>Salmonella</i> Positivo en XLD Agar.	85
Figura 3. 4. Mapa de la isla de patogenicidad 1 (SPI1)	91
Figura 4. 1. Muestras tomadas de superficies inertes en el gel al 1.5% de agarosa con el par de iniciadores Malo2 F y Malo2 R	101
Figura 4. 2. Comparación de muestras analizadas por el Método Tradicional y PCR con los iniciadores MALO2 F/MALO2 R	106
Figura 4. 3. Comparación de muestras analizadas por el Método Tradicional y PCR con los iniciadores 139/141.	106
Figura 4. 4. Comparación de las muestras de cereal analizadas por el Método Tradicional y PCR con ambos iniciadores.....	107
Figura 4. 5. Comparación de las muestras de superficie analizadas por el método tradicional y PCR con ambos iniciadores.....	108
Figura 4. 6. Comparación de las muestras de superficies analizadas por el método tradicional y PCR con ambos iniciadores.....	109
Figura 4. 7. La complejidad de la inhibición de la PCR.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Casos de EDA en el Ecuador.	20
Tabla 2. Casos de otras Salmonelosis en el Ecuador.....	20
Tabla 3. Casos de Fiebre Tifoidea en el Ecuador.	21
Tabla 4. Casos de Intoxicación Alimentaria en el Ecuador.	21
Tabla 5. Variantes y Tipos de Polimerasa.	33
Tabla 6. Descripción de Iniciadores	87
Tabla 7. Programa para realizar la PCR usando los iniciadores 139 y 141 ..	90
Tabla 8. Programa para realizar la PCR usando los iniciadores MALO 2 F y MALO 2 R.	90
Tabla 9. Tabla cruzada de los resultados de dos variables dicotómicas con el mismo resultado (método 1 y método 2).....	96
Tabla 10. Interpretación de los valores del índice de Kappa según el rango de valores.	98
Tabla 11. Tradicional Embutido - Embutido MALORNY.	102
Tabla 12. Tradicional Embutido - Embutido 139.	102
Tabla 13. Tradicional Cereal - Cereal Malorny.	103
Tabla 14. Tradicional Cereal - Cereal 139.	103
Tabla 15. Tradicional Superficie – Superficie Malorny.	104
Tabla 16. Tradicional Superficie - Superficie 139.....	104
Tabla 17. Método Tradicional - Malorny.....	105
Tabla 18. Método Tradicional - 139.	105
Tabla 19. Cereal 2 Tradicional - Cereal.	107
Tabla 20. Superficie2 Tradicional - Superficie.	108
Tabla 21. Embutido2 Tradicional - Embuutido.	109
Tabla 22. Parámetros Estadísticos	110
Tabla 23. Costo del análisis de PCR	112

Tabla 24. Duración del procedimiento de PCR en días laborables.....	113
Tabla 25. Duración del Método Tradicional en días laborables.	113
Tabla 26. Comparación de tiempos y costos de los métodos tradicional y PCR	114

INTRODUCCIÓN

Salmonelosis es una palabra común en el léxico de los ecuatorianos, esta patología es tan cotidiana en nuestro medio que se ha perdido, en cierto nivel, la conciencia de que la incidencia de esta enfermedad indica un grave problema sanitario.

A nivel industrial, la vigilancia y medidas de control de este patógeno en todas las etapas en la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un factor crucial en la gestión de la inocuidad de los productos, tanto así que en una gran cantidad de países, incluyendo Ecuador, se maneja una tolerancia cero con respecto a la presencia de esta bacteria en productos de consumo directo.

Se conoce que los métodos tradicionales de detección de *Salmonella* se basan en el cultivo en medios selectivos y la posterior caracterización de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos métodos requieren una gran inversión de tiempo.

La industria alimentaria, actualmente, demanda métodos rápidos de detección de ciertos patógenos, entre ellos los diversos serotipos de *Salmonella*, sin embargo muchos de estos métodos no gozan de una

confianza que sustituya por completo la metodología tradicional. A causa de esto, se ha acudido al desarrollo biotecnológico, como las técnicas moleculares, como una herramienta fiable y rápida en la detección de microorganismos en muestras de alimentos.

El objetivo de esta tesis fue enfocado en desarrollar un ensayo de PCR capaz de detectar *Salmonella* en muestras de alimentos seleccionadas y solventar estadísticamente la validez de este método frente a la metodología microbiológica tradicional, estableciendo sus limitaciones tanto operacionales como económicas.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

La salmonelosis es responsable de un gran número de infecciones tanto en humanos como en animales. Las cepas de *Salmonella* no son detectables en ciertas muestras químicas que contienen un pequeño número de organismos (Fricker, 1987). Sin embargo, el número de salmonelas presentes en las heces fecales de un individuo infectado es grande, aproximadamente 10^9 por gramo. Este nivel de excreción es mantenido por varias semanas antes de caer gradualmente hasta que el individuo deja de excretarlos (Taylor & McCoy, 1969). Es más, luego de la desaparición del organismo del tracto intestinal, más del 5% de los pacientes pueden volverse portadores crónicos de este organismo en sus heces fecales aún luego de la enfermedad (Jay,

2000). Por lo tanto la detección de las cepas de *Salmonella* en muestras fecales no es solamente importante para el diagnóstico de salmonelosis sino que, es esencial para identificar portadores del microorganismo especialmente entre los manipuladores de alimentos quienes tienen un alto riesgo de propagar el patógeno.

La salmonelosis es una enfermedad que puede ser asintomática, lo que genera un gran problema porque es una enfermedad altamente contagiosa, debido a la baja dosis infectante necesaria. Principalmente, esto es de gran interés en manipuladores de alimentos, los cuales podrían ser portadores y podrían diseminar la enfermedad (Fica *et al.* 2001).

Las infecciones de *Salmonella* spp. pueden causar pequeños brotes en la población; entre el 60% y 80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines infantiles, hogares geriátricos y restaurantes (Almeida, 2002).

La vigilancia de este patógeno en todas las etapas en la cadena de procesamiento de alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis. El mercado nacional e internacional, para proteger la salud de sus compradores,

exige que todos los productos de consumo estén libres de patógenos con *Salmonella* spp. (Gálvez, 2006).

Se han hecho grandes esfuerzos en materia de prevención para el control de las enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y de las entidades encargadas del control. Muchos países, tienen establecido dentro de su legislación “cero tolerancia” para este patógeno

En función de dicha legislación, es necesario implementar técnicas rápidas y muy sensibles en el control de la industria, antes de la liberación de los alimentos al mercado. La implementación de los métodos moleculares es necesaria, ya que las técnicas microbiológicas convencionales toman de 4 a 6 días para la detección y la identificación de *Salmonella* spp. (Schneider, 2007).

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

técnica molecular basada en la amplificación in vitro del ADN (Rodríguez, 2004).

Los métodos tradicionales consumen de tres a cinco días para detectar e identificar cepas de *Salmonella* spp. a través de pasos sucesivos en caldos de enriquecimiento, luego cultivos en medios selectivos y por último el análisis de las propiedades metabólicas y/o serológicas de las colonias sospechosas, por esta razón esta técnica consume mucho tiempo de trabajo del bacteriólogo. De otro lado, como este procedimiento toma demasiado tiempo algunos alimentos con una vida media corta pueden ser consumidos antes de que el resultado del análisis esté disponible. Además, células como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., y *Listeria monocytogenes* frecuentemente, se encuentran estresadas por las condiciones desfavorables a las que se exponen (altas concentraciones de sal, valores de pH desfavorables, o repetidos procesos de congelación y descongelación) y por este motivo no pueden ser detectadas fácilmente en los medios de cultivo. (Candrian, 1995).

1.2. GÉNERO *SALMONELLA*

Generalidades

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Recibe su nombre en honor al microbiólogo norteamericano Daniel Elmer Salmon, quien en 1876 fue reconocido como el primer doctor en medicina veterinaria graduado en una universidad de su país. Junto a Theobald Smith, conocido por su trabajo con anafilaxis, fueron quienes descubrieron los gérmenes designados como salmonelas, en 1885, aislándolos de cerdos con cólera (Stanchi, 2007).

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonelas son potencialmente patógenas (Stanchi, 2007; Smith *et al.*, 2003; Mahajan *et al.*, 2003) al ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea (Stanchi, 2007). En medicina humana están descritas diversas presentaciones de la salmonelosis:

fiebre entérica, septicemia y finalmente gastroenteritis; mientras tanto, en medicina veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia, enteritis aguda, subaguda y crónica, además de abortos en diferentes animales (Stanchi, 2007). Las diversas especies de esta bacteria se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque por lo general la enfermedad producida por este agente microbiano tiene un origen alimentario debido a la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno, teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (Stanchi, 2007; Smith *et al.*, 1952).

Morfológicamente, los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, de 0.7-1.5x2.0-5 mm, generalmente no fermentan lactosa, anaerobios facultativos no esporulado que generalmente móviles por flagelos peritricos (Terragno *et al.*, 2003).

Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. typhi*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol. Son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, rojo de metilo y citrato positivo, producen H₂S, son urea negativo y descarboxilasa positivo

(Terragno *et al.*, 2003). Otras características bioquímicas son la reducción de los nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetrionato reductasa (Jawetz *et al.*, 2005).

La salmonela se multiplica bien en medios ordinarios, las colonias post-incubación por 18 a 24 horas a 32°C son de 2 a 3 mm de diámetro salvo algunos serotipos que producen colonias pequeñas (Smith *et al.*, 1952). Los miembros del género *Salmonella* crecen en un amplio rango de temperaturas (7-28°C), el rango de pH ideal para su crecimiento es de 6.6 a 8.2; son incapaces de tolerar altas concentraciones de sal y sobreviven en agua congelada durante periodos prolongados (Jawetz *et al.*, 2005).

Clasificación Taxonómica

La clasificación actual del género *Salmonella* está basada en estudios realizados sobre la base de técnicas de hibridación del ADN de la bacteria y se ha concluido que éste está conformado por dos especies:

- 1) *Salmonella entérica*, dividida en seis subespecies aisladas de:
 - Subespecie I: *S. enterica* subsp. *enterica*: humanos y animales de sangre caliente.

- Subespecie II: *S. enterica* subsp. *salamae*: animales de sangre fría y del ambiente.
- Subespecie III a: *S. enterica* subsp. *arizonae*: animales de sangre fría y del ambiente.
- Subespecie III b: *S. enterica* subsp. *diarizonae*: animales de sangre fría y del ambiente.
- Subespecie IV: *S. enterica* subsp. *houtenae*: animales de sangre fría y del ambiente.
- Subespecie VI: *S. enterica* subsp. *indica*: animales de sangre fría y del ambiente.

2) *Salmonella bongori*. Subespecie V: no constituye un patógeno para los humanos, pero si ha sido implicada en ciertas patologías en animales (Popoff y Le Minor, 1992; Grimont y Weill, 2007).

Aunque solo existan dos especies de salmonelas según su hibridación de ADN, tanto las especies como las subespecies mencionadas se encuentran constituidas por más de 2400 variedades serológicas, determinadas según las distintas asociaciones de antígenos somáticos O y flagelares H (Stanchi, 2007).

Factores de Virulencia

Para este género, se conocen varios factores de virulencia, uno de ellos es la producción de al menos tres toxinas: las enterotoxinas, que son sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólico y diarrea, las endotoxinas que hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los lipopolisacáridos (LPS) y por último, las citotoxinas que están asociadas a la superficie celular, las cuales inhiben la síntesis proteica en la célula hospedadora y pueden estar implicadas en la adherencia a las células epiteliales, constituyendo esta última un segundo factor de virulencia de *Salmonella* spp. (Madigan et al., 1997). También se ha descrito en algunas subespecies de *Salmonella* (*S. typhimurium*) la formación de pseudópodos en la célula hospedera, lo que trae como resultado la internalización de la bacteria en las vesículas endocíticas; adicionalmente, la producción de adhesinas que incluyen fimbrias codificadas por el plásmido de la virulencia pSLT, permiten la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos, fimbrias polares largas que se encargan de la unión de la bacteria a las placas Peyer, y las fimbrias agregativas delgadas llamadas curli que también pueden

estar implicadas en la unión a las vellosidades de los enterocitos (Madigan et al., 1997).

Otros factores relacionados con la adherencia a los polisacáridos de superficie celular (O) y el antígeno Vi, un polisacárido capsular compuesto de ácido N-acetilglucosaminurónico, el cual ayuda a prevenir la fagocitosis y puede proteger la bacteria de las formas reactivas de oxígeno al interior de los fagocitos, las cepas negativas para el antígeno Vi son menos infecciosas y virulentas que las positivas para este antígeno (Parry et al., 2002).

La respuesta a la tolerancia del ácido es otro aspecto importante de virulencia de *Salmonella* spp., lo que permite a la bacteria atravesar el ambiente ácido del estómago, requisito necesario para la infección (Salyers y Whitt, 2002).

Patogenicidad

Todos los serotipos de *Salmonella* spp. conocidos son patogénicos para el hombre y los animales (Parker y Collier, 1990). La virulencia de la bacteria se relaciona con su capacidad de invadir las células hospedadoras, replicarse en su interior y resistir tanto la digestión por

los fagocitos como la destrucción por la acción del complemento, lo cual facilita la difusión de las salmonelas en el organismo hospedador (Henrici, 1999).

El complejo proceso de invasión es mediado por los productos de la expresión de varios genes cromosómicos, mientras que la capacidad de crecer en el interior de las células hospedadoras depende de la presencia de plásmidos de virulencia (Vadillo et al., 2002). Algunos factores que determinan el carácter patógeno de ciertas especies del género *Salmonella* se conocen, al menos parcialmente, y se encuadran en las que se denominan genéricamente “islas de patogenicidad” (o grupos de genes relacionados con la virulencia) que se encuentran en organismos patógenos pero que están ausentes o solo presentes en forma esporádica en las especies saprófitas (Vadillo et al., 2002).

La *Salmonella* spp. cuenta con cinco islas de patogenicidad, tres de ellas conteniendo genes de virulencia (Salyers y Whittt, 2002):

- Isla SPI1: contiene genes *inv* responsables de la internalización de las células, estos genes así como los otros de la misma isla de patogenicidad (*spa*, *prg* y *org*) codifican para un sistema de

secreción tipo III; también contienen genes que codifican proteínas que son inyectadas en la célula eucariótica por este tipo de sistema de secreción, como por ejemplo el gen *sptP* que codifica para una tirosina fosfatasa que altera las señales de transducción en células de la mucosa, produciendo diarrea. De igual forma posee genes involucrados en la regulación de genes de virulencia (*hila*, *invF*, *sira* y *phoPQ*), algunos de los cuales controlan la expresión de genes localizados en otras partes del cromosoma de la bacteria. Los genes contenidos en esta isla parecen ser importantes en las etapas iniciales de la infección en la cual las bacterias invaden las células de la mucosa.

- Isla SPI2: codifica un sistema de secreción tipo III, diferente al codificado por la isla por la isla SPI1, usado por la bacteria al interior del fagosoma para evitar la fusión fagosoma-lisosoma; también codifica las proteínas que inyecta a la célula eucariótica. Esta isla de patogenicidad parece tener mayor importancia en la fase sistémica de la infección.
- Isla SPI3: codifica un transportador de Mg^{+2} de alta afinidad, el cual puede ser de importancia en la supervivencia de la célula al interior de fagosomas. No codifica sistemas de secreción.

- Islas SPI4 y SPI5: no se conoce su función, no codifican sistemas de secreción.

Las células target se encuentran en el tramo final del intestino delgado y el tramo inicial del intestino grueso. Si la célula target se encuentra “libre” con respecto al número de salmonelas, es posible que se produzca una enfermedad de estas. Los microorganismos del género *Salmonella* segregan exotoxinas, las cuales una vez que ha tenido efecto la adherencia, determinan si la enfermedad generada es septicémica o diarreica. Las cepas que producen diarrea se multiplican, segregan toxinas semejantes a la toxina LT que altera la síntesis de los nucleótidos cíclicos, haciendo que el microorganismo invada la célula. Ya en el interior, la bacteria segregan la citotoxina que provoca la muerte celular y su desprendimiento de la mucosa intestinal, desencadenando un flujo de iones y líquido hacia la luz intestinal, lo que a su vez ocasiona diarrea (Hirsh, 2006). La gravedad de la enfermedad depende del número de células target afectadas (Blaser y Newman, 1982).

Además, es posible que las cepas que producen septicemia provoquen o no diarrea, destrucción de células target, o ambas cosas. La acción de la enterotoxina se basa en la interrupción de la síntesis

de proteínas provocando la muerte celular (Biberstein y Chung Zee, 1990). Los síntomas que se presentan, aunque no siempre, suelen ser septicemia y shock; las cepas que producen esta forma clínica de enfermedad eluden la destrucción por parte del hospedador y se multiplican en el interior de los macrófagos del hígado, bazo y también en el interior de los vasos sanguíneos (Hinton, 1971). Su destrucción en la corriente sanguínea se encuentra obstaculizada en parte por las unidades repetitivas del antígeno O del LPS, posiblemente porque se impide la unión entre el complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento y la membrana externa de la bacteria (Barrow y Lovely, 1991).

Las cepas de *Salmonella* spp. son relativamente hidrófilas, debido en parte a la fracción de carbohidratos del LPS que provoca su repulsión de la membrana de las células fagocitarias, la cual es relativamente hidrófoba; las bacterias no fagocitadas no son destruidas fácilmente porque en el animal el contenido de los lisosomas del macrófago no atacará con facilidad a las salmonelas que se encuentran en el interior del fagosoma, debido a que las bacterias sintetizan enzimas que tienen la capacidad de neutralizar las que son producidas por el fagosoma (Blaser y Newman, 1982). La multiplicación del

microorganismo origina una endotoxina, la cual explica la mayoría de los síntomas y el curso de la enfermedad (Stanchi, 2007).

Salmonelosis

La salmonelosis es el conjunto de infecciones producidas por microorganismos del género *Salmonella* spp. adquiridas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas y caracterizadas por presentar síndromes febriles asociados a manifestaciones gastrointestinales sistémicas con frecuencia severas (Saravia, 2008). Las manifestaciones clínicas de las salmonelosis en humanos y animales se presentan básicamente bajo tres modalidades: las denominadas fiebres entéricas, entre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *S. typhi*, las gastroenteritis producidas por varias subespecies y la forma septicémica, caracterizada por la bacteremia asociada a lesiones focales (Saravia, 2008). Dentro de las manifestaciones clínicas comunes está la fiebre acompañada de dolor abdominal, evacuaciones intestinales líquidas frecuentes, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre (Saravia, 2008).

La salmonelosis causante de diarrea (enterocolitis) es normalmente el resultado de la infección por *S. typhimurium* u otros serotipos no

adaptados al organismo huésped. La enfermedad puede ser aguda o crónica. El signo clínico inicial, suele ser una diarrea acuosa amarillenta durante aproximadamente 24 horas, la que puede persistir durante tres a siete días. La diarrea puede eventualmente contener sangre, mucosa necrosada y moco. Puede, así mismo, presentarse fiebre y deshidratación. La mortalidad es usualmente baja, sin embargo la morbilidad puede ser alta en pocos días de infección.

Las lesiones macroscópicas incluyen: dilatación del intestino, colitis fibrinosa o ulcerativa, colitis necrótica, tiflitis, los nódulos linfoides ileocecales se encuentran aumentados de tamaño, edematosos y hemorrágicos. Microscópicamente, la mucosa del intestino delgado se encuentra congestionada e infiltrada por neutrófilos en la lámina propia y folículos linfoides, necrosis de criptas y enterocitos local o difusa, las vellosidades del íleon pueden estar acortadas y cubiertas por bacterias, moco y neutrófilos. En la lámina propia y submucosa se observan macrófagos y linfocitos con neutrófilos solo en etapas muy tempranas de la enfermedad (Jubb *et al.*, 1993; Wray y Wray, 2000).

Si se supera la enfermedad infecciosa, pueden persistir las bacterias en su organismo, preferentemente en el complejo hígado-vesicular, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en las amígdalas. Así se originan

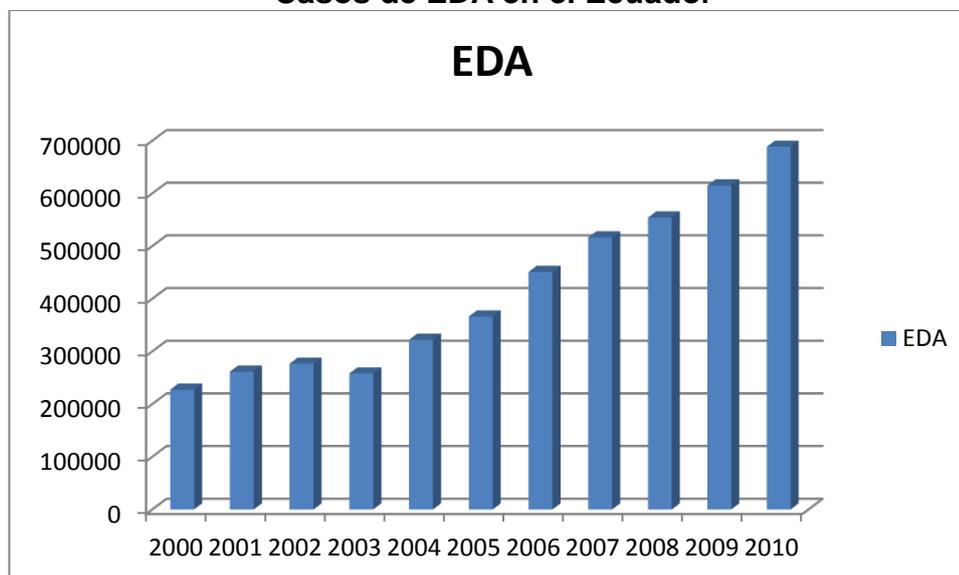
los portadores latentes, de tanta importancia epidemiológica que vierten en el ambiente salmonela, por lo general de manera intermitente a lo largo de un prolongado periodo de tiempo (meses y años), convirtiéndose así en punto de partida de nuevas infecciones (Blaha, 1995).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La Fiebre Tifoidea, la más grave de las salmonelosis, continúa siendo un problema mayor en muchos países en vías de desarrollo. Si bien resulta difícil conocer su real impacto, la OMS estima que, anualmente, se registran diecisiete millones de casos anuales, con unas seiscientas mil muertes (OMS, 2002).

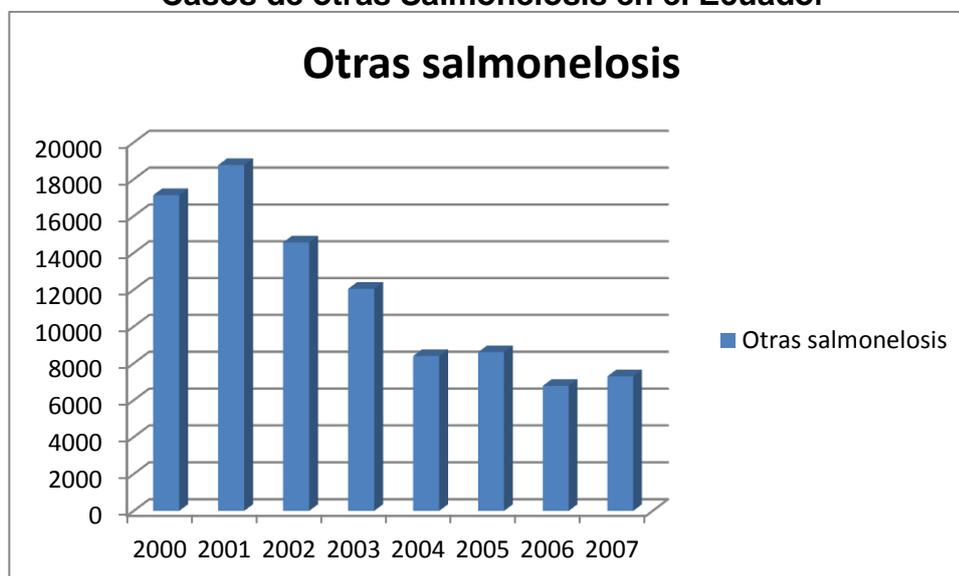
En el Ecuador, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Crónicas No Transmisibles, a cargo del Ministerio de Salud Pública muestra en su informe “10 PRINCIPALES CAUSAS DE MORBILIDAD” correspondiente al periodo 2000-2010 la alta ocurrencia de casos de ETA, EDA, salmonelosis en el país, agrupados en la tabla siguiente:

TABLA 1.
Casos de EDA en el Ecuador



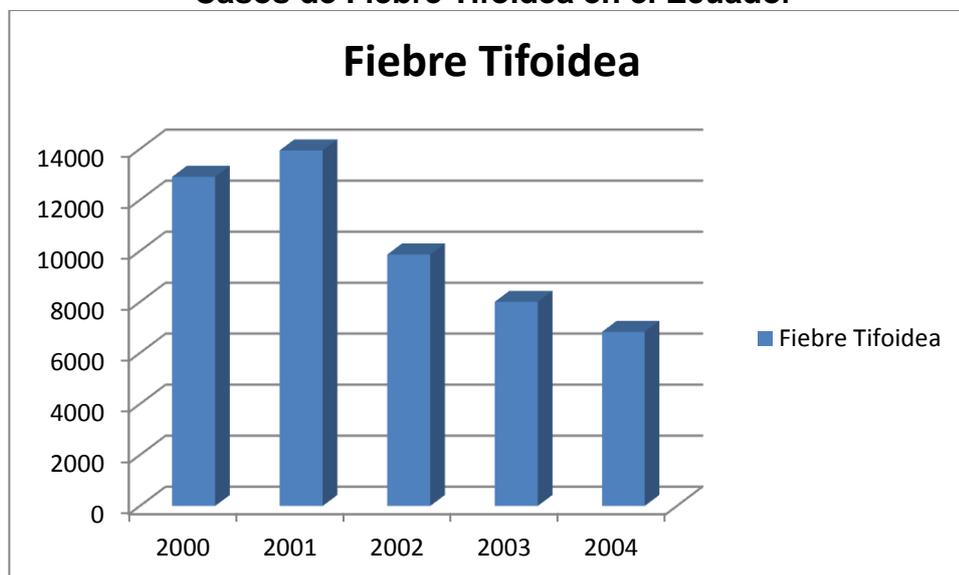
Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 2.
Casos de otras Salmonelosis en el Ecuador



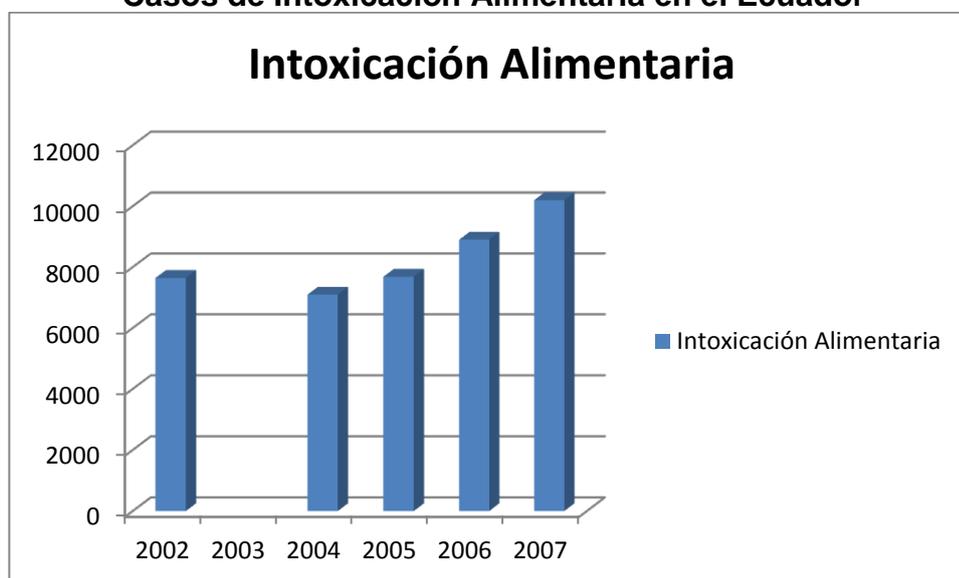
Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 3.
Casos de Fiebre Tifoidea en el Ecuador



Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 4.
Casos de Intoxicación Alimentaria en el Ecuador



Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

Cabe recalcar que estos datos solo muestran las principales 10 causas, por lo que cierta cantidad de casos son omitidas por no estar en esta lista. Además, se ha de suponer que estos son únicamente los casos reportados en las dependencias del MSP, por lo que se espera una cantidad más elevada de los casos que realmente ocurren en el Ecuador.

1.4. TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR implica la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante ciclos repetidos de síntesis dirigidos por cebadores o iniciadores. El mecanismo se basa en el principio de replicación del ADN en las células, en donde la enzima polimerasa genera una copia complementaria a la hebra de ADN parental a partir de deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en solución.

La PCR encuentra una “aguja” genética en un pajar. La secuencia de un único gen puede ser localizada entre una abundancia de otras secuencias de ADN, incluso en lisados crudos, y será amplificada de una forma exponencial hasta rendir una cantidad analizable. Siendo un principio tan sorprendentemente simple, nada ha tenido más impacto,

con la excepción del aislamiento de las enzimas de restricción, en el estudio y aplicación de la biología molecular.

La idea de amplificar repetidamente el ADN fue en principio publicada en 1971 (Kleppe *et al.*, 1971). Pero no fue explotada hasta algunos años más tarde por científicos de la Corporación Cetus después de que Karis Mullis independientemente ideara un método de amplificación con suficiente potencial. La técnica es exquisitamente sensible y rápida, reemplazando a menudo los tediosos e inconstantes procedimientos de clonaje, y es tolerante para muestras de ADN de pobre calidad.

Principios de la Técnica

Los oligonucleótidos específicos son sintetizados químicamente, de modo que estos cebadores son complementarios a las secuencias de ADN que flanquean la secuencia de interés. Uno de los cebadores es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y el otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose el uno al otro. Los cebadores son mezclados en una solución tamponada que contiene el ADN molde, los dNTPs, magnesio y una enzima polimerasa termoestable. La mezcla se cubre con una capa de aceite mineral para prevenir la evaporación, en el caso que el termociclador no posea tapa

termoregulada, y se colocan en el interior de un bloque de calor programable del equipo. El ADN molde de doble hebra entonces es desnaturalizado por calor a una temperatura por encima de su punto de fusión. A continuación se descende la temperatura lo suficiente para que ocurra la hibridación entre los cebadores y el ADN molde, pero que aún sea lo suficientemente alta para prevenir la hibridación errónea de los cebadores con otras secuencias de gran similitud que se encuentren en otras partes del genoma. El uso de altas concentraciones de cebadores favorece a que esta reacción ocurra con mayor eficiencia que la de realineamiento de las hebras del ADN molde. A veces, la temperatura es nuevamente incrementada para favorecer la actividad catalítica de la polimerasa, la cual se ha unido al extremo del dúplex molde-cebador. La síntesis comienza a partir de los extremos 3' hasta que la reacción es parada mediante un aumento de la temperatura hasta el punto de fusión por segunda vez. El producto de esta reacción es de longitud indefinida y se conoce como "producto largo". Así se completa el primer ciclo de la PCR. El segundo ciclo comienza con el paso de fusión, seguido del alineamiento del cebador. Esta vez, sin embargo, los cebadores no solo hibridan con el ADN original sino también con las hebras que han sido sintetizadas en la primera reacción. Estas hebras poseerán la secuencia del cebador que hizo posible la síntesis en el ciclo previo y

se extenderán más allá del sitio de unión del otro cebador. El segundo ciclo repite el primero con respecto al ADN original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá solo hasta el final de la molécula, lo cual se corresponde con el extremo 5' del cebador opuesto. Después de un tercer ciclo de PCR, es fácil ver que la síntesis dirigida por los productos de los primeros dos ciclos terminaran en los extremos definidos de ambos cebadores y este tipo de producto se acumulara exponencialmente con subsiguientes ciclos. El "producto largo" continuará incrementándose. Por consiguiente, el producto mayoritario de una PCR será de una longitud definida, consistiendo en la secuencia entre los cebadores y la propia secuencia de los cebadores.

CONTAMINACIÓN. La elevada sensibilidad que confiere a la técnica de PCR su utilidad, es también su limitación más seria. Ya que la amplificación exponencial de ADN moldes puede conseguirse incluso a partir de una sola célula, cualquier resto celular o reactivos contaminados pueden presentar un serio riesgo de resultados falsos. Con mucho, los reservorios más importantes de moldes "contaminados" son los productos de reacciones previas de PCR. Estos representan una fuente altamente enriquecida de la secuencia diana, y pueden llegar a encontrarse por todas partes en el laboratorio después de un periodo de tiempo utilizando los mismos cebadores.

Por esta razón, es prudente el preparar y analizar las reacciones de PCR en áreas separadas de laboratorio, utilizando el equipamiento específicamente para la técnica, reactivos autoclavados y alicuoteados, y múltiples controles en cada reacción.

Algunos laboratorios, que utilizan los protocolos de PCR hasta sus límites de sensibilidad, emplean una “esterilización” enzimática o fotoquímica para prevenir la amplificación de un producto anterior. Un método sencillo es irradiar con luz ultravioleta las vasijas de reacción y los reactivos previamente a la preparación de la amplificación. Esto causaría la formación de dímeros de pirimidinas y haría al ADN exógeno no apropiado como molde para la polimerasa. Sin embargo, la efectividad de esto dependerá de la capacidad de la radiación para penetrar donde sea necesario. Estos métodos de “esterilización” son atractivos pero, ya que su efectividad no es del 100%, no debe de permitirse que sustituyan las técnicas de laboratorio así como los controles adecuados.

Componentes esenciales del PCR

- **Tampón de amplificación:**

Los tampones de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de MgCl₂ está alrededor de 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación. Mezclas de los diferentes componentes de PCR se venden comercialmente en donde ya poseen una concentración optimizada de los reactivos y solo es necesario adicionar los cebadores y el ADN molde.

- **Concentración de Cloruro de Magnesio**

Los iones Mg^{2+} son necesarios para la correcta catálisis de las DNA polimerasas. Sin embargo, forman complejos con los dNTPs, iniciadores y moldes de ADN, disminuyendo la eficiencia de la reacción. Una concentración baja de iones Mg^{2+} resulta en un bajo rendimiento de amplificación, mientras que una concentración excesiva puede causar la obtención de productos inespecíficos, así como disminuir la fidelidad de copia.

El rango recomendado de concentración de $MgCl_2$ es 1-4 mM, bajo las condiciones normales de reacción. Si existen agentes quelantes en la solución de ADN molde, tales como EDTA, la concentración de $MgCl_2$ ha de ser aumentada. Los dNTPs también quelan el $MgCl_2$, ya que forman complejos solubles con los iones Mg^{2+} .

En el caso en el que las concentraciones recomendadas de $MgCl_2$ no den un rendimiento óptimo, se recomienda optimizar la concentración del mismo de forma empírica, comenzando desde 1 mM, y subiendo en pasos de 0.2 mM, hasta que se obtenga un resultado satisfactorio.

- **Iniciadores o cebadores**

A la hora de elegir unos iniciadores para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

- La **longitud de cada uno de los iniciadores** debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que iniciadores de mayor longitud (30-35) bases no aumentan el rendimiento y los iniciadores cortos carecen de suficiente especificidad.
- Ambos iniciadores deben tener una **Tm** similar (como mucho la diferencia entre ambas temperaturas debe ser de 5°C).
- La **relación bases púricas: Bases pirimidínicas** debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
- La **secuencia de los iniciadores** debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.
- Para evitar la formación de **dímeros de iniciadores** es necesario comprobar que los iniciadores no contengan secuencias complementarias entre sí.

Los **dímeros de iniciadores** consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los

iniciadores y se producen cuando un iniciador es extendido a continuación del otro. El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que iniciadores con los extremos 3' complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios. Algunas polimerasas, incluida la *Taq*, han mostrado una débil actividad polimerizadora no dirigida por un ADN patrón, la cual puede producirse sobre una hebra sencilla de oligonucleótidos, resultaría una buena oportunidad para que la extensión formara un corto solapamiento en el extremo 3' con el otro iniciador, suficiente para promover la formación del dímero.

- **Desoxinucleótidos Trifosfatos**

Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200 μ M. Es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ya que el desequilibrio en las concentraciones, aunque sea tan sólo en un dNTP, disminuye el rendimiento de la reacción, y favorece la incorporación errónea de nuevas bases, con lo que aumenta la tasa de error de copia, para cada uno de ellos. Cuando se requiere la máxima fidelidad de copia, la

concentración final de dNTPs debe estar en el rango de 10-50 μM , ya que la fidelidad de síntesis es máxima en estos valores. En un volumen de reacción de 25 μl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6-6.5 μg de ADN.

La concentración de dNTPs y de MgCl_2 van relacionadas, ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs se inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200 μM de cada dNTP se suele añadir MgCl_2 a una concentración de 1.5 mM. Bradley (1991) sugiere que la concentración de MgCl_2 sea 0.5-1 mM veces mayor que la concentración de los dNTPs y que la concentración de ambos componentes debe guardar siempre la misma relación.

- ***Taq*-Polimerasa**

Las cantidades óptimas de *Taq* polimerasa necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μl de volumen final de reacción. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes

de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

Por otro lado, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la *Taq*. Por ejemplo, concentraciones de 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

Las ADN polimerasas se clasifican en termolábiles y termoestables, la primera con una actividad óptima a la temperatura de 37 a 42°C, mientras que la segunda resiste incluso temperaturas de 95°C, pero su actividad óptima es a la temperatura de 72°C.

Actualmente existen variantes de Polimerasa, cuyas características se detalla en el siguiente cuadro:

TABLA 5.
Variantes y Tipos de Polimerasa

TIPO	Taq	Pwo	Pfu	Pbc
Fidelidad	1X	12X	30X	48X
Amplificación máxima	1Kb	4Kb	5Kb	12Kb
Volumen de reacción	2.5	2.5	1.25-5	1.25-5

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

- **ADN molde**

Es el ADN del cual se quiere amplificar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la *Taq* polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que se obtenga o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso de que se tenga ADN sin degradar pero unido a una serie de

contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad del PCR.

En resumen la calidad de la muestra de ADN debe cumplir las siguientes reglas:

1. La integridad el ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de los que se quiere amplificar.
2. El origen de la muestra y proceso de extracción de ADN: no debe contener agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de Mg^{++} en la disolución. Tampoco debe haber factores sanguíneos, fenol, detergentes que inhiban la actividad de la polimerasa.
3. La cantidad de la muestra: Oscila entre 100 – 500 ng; en caso de existir zonas repetitivas 10 – 50 ng.

- **Adyuvantes del PCR**

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad del PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del **DMSO** y del **glicerol**, el adyuvante más extendido y utilizado es el **BSA**. A

concentraciones por encima de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el BSA incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

Procesos del PCR

- **Desnaturalización Inicial**

El ADN molde ha de ser completamente desnaturalizado al inicio de la reacción. La desnaturalización incompleta del ADN puede causar un uso ineficaz del molde en los primeros ciclos de amplificación, y por tanto en un bajo rendimiento. Además, puede llevar a efectos de auto-anillamiento, que pueden dar lugar a falsos positivos.

Se recomienda que la desnaturalización inicial se lleve a cabo a 95°C durante 1-3 minutos, si el contenido en GCs es menor o igual al 50%. Sin embargo, si el ADN tiene un alto contenido en GC, el tiempo de desnaturalización puede aumentar hasta 3-4 min. Este tiempo puede alargarse hasta 10 minutos para moldes ricos en GC. Para evitar éste inconveniente se pueden añadir aditivos que favorecen la desnaturalización, tales como glicerol (hasta 10-15 % volumen), DMSO (hasta el 10%) o formamida (hasta 5%). Sin embargo, estos

aditivos modifican la temperatura de anillamiento de los iniciadores (con lo cual ha de ser de nuevo optimizada), y además inhiben la ADN polimerasa (por lo que ha de aumentarse su concentración. El DMSO y la formamida, a las concentraciones indicadas anteriormente, pueden llegar a inhibir la enzima en un 50%).

- **Desnaturalización**

Para dar inicio a la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios por lo tanto la separación de ambas cadenas. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los iniciadores y una posterior extensión.

- **Hibridación**

Esta fase se denomina también fase de anillamiento o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los iniciadores a las

secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los iniciadores y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) \quad \text{Ec1.}$$

No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de alineamiento específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

- **Extensión**

Durante este paso la *Taq* polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq* polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión

de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2 Kb.

- **Etapas de Elongación Final**

Tras el último ciclo, las muestras son incubadas en general a 72°C durante 5-15 minutos con el fin de rellenar los extremos de las moléculas sintetizadas. Durante este paso, además, la actividad transferasa terminal de la DNA polimerasa añade una adenina extra al extremo 3' de los productos de amplificación, lo que permite que sean utilizados directamente en clonaje T/A.

Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el **tiempo de rampa**. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.

Características del proceso PCR

- **Duración**

La duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos debe optimizarse, dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar. En muchos casos, la elección de estas condiciones debe hacerse de manera empírica.

- **Especificidad**

Es muy elevada, está determinada especialmente por la secuencia de los dos cebadores utilizados y por las condiciones de templado. Se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados por la aparición de una banda única indica que la técnica específica. Por ejemplo, si la temperatura de templado se reduce excesivamente se producen falsos positivos debidos fundamentalmente a apareamientos imperfectos del cebador con secuencias distintas de la diana, aunque similares, que resultan también amplificadas.

- **Capacidad de detección** (común, aunque incorrectamente, denominada **sensibilidad**)

Es muy alta (bajo límite de detección), tanto que la PCR permite detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica (cédula, pelo, semen, etc.). Sin embargo, esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra. Los resultados se obtienen de manera informal, lo que evita problemas de interpretación de los resultados y facilita el análisis de los mismos a través de programas informáticos.

- **Fidelidad**

Es decir, la capacidad de copiar secuencias con precisión, sin introducir mutaciones (cambios de la secuencia de nucleótidos). Esta característica depende sobre todo de que la enzima tenga o no la actividad correctora de pruebas (3' exonucleasa). Así la frecuencia de error oscila entre 2×10^{-4} de una polimerasa *Taq* convencional y 10^{-6} de la polimerasa *Pfu*, que tiene la actividad 3'-exonucleasa. En todo caso, la elección de la enzima dependerá del objetivo de la PCR.

Condiciones indispensables para la realización del PCR

Se deben cumplir tres condiciones fundamentales:

1) Laboratorio con estructura apropiada:

Tiene que constar de cuatro áreas separadas y aisladas, cuarto blanco exclusivo para la preparación del MasterMix, cuarto azul útil para la extracción de ADN, cuarto gris donde se encuentran los equipos de amplificación y cargado de muestras al tubo con la mezcla PCR, y por último el cuarto negro, donde se realiza la visualización y detección de los amplicones generados. Cada uno de los ambientes debe contar con sus propios materiales para trabajar, e instaladas en un sector con escasa circulación de gente.

2) Material y reactivos estériles:

El empleo de material y reactivos debe ser manejado con mucho cuidado evitando cualquier tipo de contaminación, por lo general el material proporcionado para la muestra debe nuevo y estéril, y los reactivos prepararse en el momento de trabajo , no guardar ni congelar mezcla, porque podría alterarse alguno de los componentes.

3) Personal altamente entrenado:

El flujo de circulación del personal y la muestra, el uso adecuado de materiales y principalmente el desarrollo de los procedimientos, conjuntamente con la interpretación correcta e idónea, permiten obtener excelentes resultados. De esta manera evitar resultados por falsos positivos debidos a fallas de manipulación y contaminación.

Métodos y variantes de la PCR

Actualmente han surgido modificaciones derivadas del método inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad, adaptación a muestras particulares, amplificar moléculas de ARN en lugar de ADN. Por ejemplo, una modificación muy común en la actualidad la *“Hot start PCR”* o comienzo en caliente, que consiste en la activación de la polimerasa cuando se haya alcanzado una temperatura superior a la del templado por un determinado tiempo (por ejemplo 10 min a 94°C). De este modo, se evita la elongación de cebadores asociados inicialmente con un poco de rigor (secuencias de homología parcial con la diana) y como resultado, se aumenta mucho la especificidad de la amplificación.

1. **PCR “larga”**: Denominada L-PCR (long PCR) o LA-PCR (Longer and accurate PCR “PCR más larga y exacta”), su objetivo es superar los límites de la PCR convencional para amplificar con fidelidad regiones diana de gran tamaño (entre 5 y 40 Kb). El principal factor limitante es la ausencia de actividad correctora de pruebas en la polimerasa *Taq* por lo que se añade una cantidad menor de otra enzima con capacidad correctora (Por Ej. La Pfu) para contrarrestar la carencia de esta actividad y, al mismo tiempo, seguir aprovechando la eficacia de elongación de la polimerasa principal.
2. **PCR “anidada”**: Si el cebador se coloca en un sitio erróneo durante la PCR debido a similitudes de frecuencia entre el ADN diana y un ADN relacionado, una alícuota de los productos puede reamplificarse con un segundo juego de cebadores que tienen secuencias 3' anidadas al juego original. Los productos procedentes de un lineamiento erróneo del cebador improbablemente tendrán suficiente similitud con el locus correcto para unir este segundo juego de cebadores. El resultado es entonces un producto más corto pero sin las secuencias contaminantes. Una modificación adicional de este método ha sido denominada PCR “gota dentro gota fuera” en la cual los dos

juegos de cebadores son añadidos simultáneamente. Los cebadores son diseñados de forma tal que el juego más externo produzca un producto con una temperatura de fusión mucho más elevada que el juego interno, y el juego interno tenga una temperatura de alineamiento baja. El ciclo comienza a elevadas temperaturas permitiendo que únicamente los cebadores externos inicien la síntesis. Después de varios ciclos la temperatura de alineamiento es disminuida permitiendo entonces que el juego interno cebe también. Unos cuantos ciclos más tarde, cuando se ha acumulado algo del producto más corto, la temperatura de desnaturalización es también disminuida de modo que los productos sintetizados a partir del primer juego de cebadores no puedan de nuevo fundirse para formar moldes, y eventualmente el producto principal llegara a ser la secuencia bordeada por los cebadores internos.

3. **PCR “inversa”**: Esta variante se emplea para clonar regiones desconocidas de un AND, situadas en posición vecinal a secuencias diana conocidas. Es decir, se amplifica la región externa, que flanquea a los cebadores. Para ello es necesario cortar el ADN a ambos lados de la región diana con una enzima de restricción, de tal forma que los extremos cohesivos resultantes

puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular. Esta es cerrada por una ligasa y se realiza la PCR con cebadores que hibridan con los extremos 5' de la secuencia conocida, por lo que la elongación se extenderá alrededor del círculo. Se generan copias de un ADN lineal delimitado, como en el ADN normal, por la posición de ambos cebadores.

4. **RT-PCR:** La aplicación de la PCR ha dado lugar a una nueva modalidad para analizar el ARNm. Éste es aislado, en primer lugar, de tejidos o células y entonces se lo utiliza como molde para la fabricación de un ADN complementario (cADN) por parte de la enzima transcriptiva reversa (el calificativo de reversa aplicado a esta enzima se debe a que su acción es “inversa” a la cumplida por la enzima transcriptasa, que produce ARN a partir de ADN). El cADN así obtenido es usado a su vez como molde que se replicará mediante la PCR, tras la aplicación de *iniciadores* diseñados para delimitar la región que resulta de interés. El control adecuado de todos los pasos de estas reacciones hace posible cuantificar con precisión los niveles de ARNm originales. La alta sensibilidad que caracteriza al método, llamado en esta variante RT-PCR (*pro Reverse Transcriptase-PCR*), permite su uso en la detección y cuantificación de ARN mensajeros poco abundantes.

5. **PCR “por contacto”** La PCR por contacto es un método utilizado para incrementar la especificidad sin comprometer la producción. El principio es iniciar la síntesis a muy altas temperaturas de anillamiento lo cual solo permite la formación única de los pares perfectamente alineados cebador-molde. La temperatura de alineamiento es bajada de una forma gradual con cada ciclo. Una vez que las copias de la secuencia diana han comenzado a acumularse durante los primeros ciclos, el alineamiento a alta temperatura llega a ser mucho menos crítico para la especificidad, como son los productos previos que forman el molde principal. Estos productos improbablemente tendrán secuencias de alineamiento falso. El beneficio de disminuir la temperatura de alineamiento es el incrementar la probabilidad de una interacción estable cebador-diana. El resultado es una mejora en la producción del producto específico comparándolo con los protocolos que utilizan alineamiento a una única alta temperatura.

6. **PCR “por comienzo caliente”** La mayoría de las muestras listas para amplificación presentan en mayor o menor proporción algo de ADN de banda sencilla incluso antes de la desnaturalización deliberada; los cebadores pueden unirse abundantemente a estas zonas a bajas temperaturas. La polimerasa *Taq* muestra un grado

de actividad a temperatura ambiente, a pesar de estar muy por debajo de su actividad óptima, la cual puede conducir a que estos dúplex imperfectamente apareados comiencen a ser extendidos antes de que la reacción propiamente comience. La PCR de comienzo caliente disminuye estos artefactos por la exclusión de un reactivo crítico (tal como la enzima o el magnesio) de la reacción hasta que se ha alcanzado el grado de desnaturalización. Esto puede conseguirse mediante la apertura de los tubos en el aparato térmico después de la primera fusión y la adición posterior del reactivo crítico, sin embargo, esto incrementa el riesgo de contaminación entre los tubos. Otro método es cubrir la mezcla de reacción con una capa de cera inerte y poner el reactivo crítico por encima. Una vez que la temperatura alcanza el punto de desnaturalización la cera se funde, la convección térmica mezcla los reactivos, y la síntesis comienza.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL ADN

El ADN está formado por dos cadenas complementarias de nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos, la desoxirribosa y una de cuatro posibles bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina

(C1). Son estas bases las que determinan el carácter complementario de las cadenas. Esto significa que dada una secuencia de bases en una de ellas, la otra presentará una única sucesión posible: si en la primera se encuentra con una molécula de guanina, se sabe que estará unida a una molécula de citosina; así mismo, una molécula de timina solo se podrá unir con una molécula de adenina. El ADN se duplica una y otra vez mediante un proceso que lleva, en primer lugar, a la separación de sus dos cadenas y luego a la síntesis de las dos nuevas cadenas, cada una de ellas idénticas (en condiciones normales y salvo errores) a aquella de cual se separó.

Genoma microbiano

El genoma microbiano comprende la secuencia completa de los genes de un microorganismo, el cual ha permitido un estudio más profundo y comprensible de la patogenia bacteriana y por consiguiente sus aplicaciones en prevención, diagnóstico y tratamiento de las mismas. Una vez conocida la dinámica invasiva, producción de toxinas, capacidad de adaptación en situaciones adversas y demás variables ha sido posible el diseño de vacunas más específicas, el desarrollo de antibióticos y drogas capaces de bloquear determinados procesos metabólicos vitales y un sinnúmero de aplicaciones.

Pese a que ya existen múltiples aplicaciones de la genética en el diagnóstico microbiano, es indispensable continuar con el perfeccionamiento y simplificación de las técnicas empleadas para el conocimiento de las secuencias genómicas bacterianas y así poder avanzar en el campo biotecnológico tanto clínica como industrialmente.

Genoma de Salmonella

El equipo de Julián Parkhill, del Centro Sanger, en Cambridge, ha secuenciado los 4.809.037 pares de bases del genoma de la *S. typhi* que es resistente a múltiples fármacos, lo que muestra la presencia de cientos de inserciones y deleciones cuando se compara con el genoma de la *Escherichia coli*.

El genoma de *S. typhi* CT18 está constituido por un cromosoma circular de 4.809.037 pb, con un contenido de G+C de 52.09%, más de plásmidos: el pHCM1 de 218,160 pb, que codifica para resistencia múltiple a antibióticos, y pHCM2 de 106,516 pb, que es críptico o de función desconocida. Al igual que *E. coli*, contiene más de cuatro mil genes. *S. typhi* constituye una excepción a la conservación del orden cromosómico, porque presenta rearrreglos mayores observados entre

diferentes aislados clínicos. Existen inversiones y transposiciones de grandes segmentos, posiblemente promovidos por recombinación homóloga entre genes ribosomales (*rrn*), y no se observan pérdidas, inserciones, o duplicaciones de regiones cromosómicas. El significado biológico de estas particularidades en el genoma de *S. typhi* permanece un misterio y, ciertamente, será el tema de futuras investigaciones.

En general, parece haber menor conservación del orden cromosómico en cepas de *Salmonella* que infectan hospedantes específicos. Por ejemplo, el orden de los fragmentos grandes obtenidos con la enzima I-CeuI, y analizados por electroforesis de campos pulsados, es de ABCDEFG en *S. typhimurium* LT2, *E. coli* K-12, y en especies de *Salmonella* que crecen en diferentes hospedantes. Sin embargo, en *S. typhi*, *S. paratyphi* C, *S. gallinarum*, y *S. pullorum*, las cuales son hospedante-específicas (la última también para aves), estos fragmentos están rearrreglados.

Otras variantes entre los genomas de las salmonelas incluyen la presencia o ausencia de diferentes islas de patogenicidad y de operones para fimbrias (descritos en las siguientes secciones). Asimismo, recientemente, se ha reforzado el concepto de la

transferencia horizontal de genes de patogenia a través de fagos temperados, o virus bacterianos que pueden alojarse en el cromosoma del genoma de otra bacteria.

La SPI-1 fue el primer locus descrito para *Salmonella*. Fue encontrado en base a una propiedad fundamental, la invasividad. La idea inicial fue identificar una mutante natural de *S. typhimurium* que no invadiera células epiteliales en cultivo. Posteriormente, se clonó en un plásmido vector una mezcla de fragmentos del genoma de una cepa naturalmente invasiva (banco de genes), y se introdujo (complementó) a células de la mutante, identificando un fragmento que la confería la capacidad invasiva. Así se aisló un fragmento que contenía genes de invasividad, que fue denominado *invCBA*. Posteriormente, se realizó mutagénesis dirigida de este locus (o sitio del genoma) en la cepa silvestre invasiva, con transposones (fragmentos de ADN que se insertan en otro ADN causando su mutación), confirmando que, al hacerlo, se disminuía la capacidad invasiva. Esta región, encontrada en el centiosoma 63 y que abarca 40kb, ha sido ampliamente estudiada y el número de genes contenidas en él se ha extendido a 30.

Es así que los genes *inv* originales se han extendido a *invJICBAEGFH*, en donde la mayoría forman parte de un sistema de secreción tipo III, y donde las proteínas *InkJ* e *InvH* son secretadas. Un sistema de secreción tipo III es esencialmente uno que se activa por el contacto de la bacteria con las células hospedadoras. Estos sistemas forman un puente de proteínas -tipo aguja- por el cual se transportan moléculas, las que tendrán el efecto sobre la célula hospedadora. De hecho, algunas de las proteínas del sistema de secreción tipo III forman parte de la membrana interna y otras cumplen una función exportadora. También participan en la secreción de genes *spaSRQPO* (denominados así por su parecido con los genes invasivos de la *Shigella*) y los genes *sipADCB* (*Salmonella Invasion Proteins*). El locus *invC* codifica para una ATPasa que aparentemente es la proveedora de los recursos energéticos en el proceso; y *sptP* que codifica para una fosfatasa que actúa sobre las tirosinas de las proteínas de las células hospedantes (*Salmonella Protein Tyrosine Phosphatase*), alterando la transducción de las señales del proceso.

En general, el patógeno busca, mediante este y los demás sistemas que posee, la alteración de la célula hospedante a fin de ingresar en esta. Un claro ejemplo es que la propia salmonela causa un efecto de “arrugamiento” al desarreglar el citoesqueleto celular para que, una

vez que se encuentra atizada, empieza el ciclo multiplicativo en un compartimiento vacuolar.

Muy aparte, el gen regulador *hilA* (*Hyper Invasive Locus*) llegó a ser identificado independientemente porque su sobre-expresión le confiere una capacidad hiperinvasiva a la salmonela. Se ha determinado que codifica, para un regulador que activa los promotores de los genes *inv* y *spa*, *sip* y *org* (*Oxygen-Regulated Gene*).

En cambio, el locus *invF* codifica para un regulador positivo para otros genes del locus. El locus *sicA* (*Salmonella Invasion Chaperone*) codifica una proteína chaperona que actúa en conjunción con la proteína reguladora *InvF*. Los genes *prgKJIH* (*PhoP Repressed Genes*) son activados por la proteína *HilA* y desactivados por la proteína reguladora *PhoP*, la cual también tiene un efecto regulador negativo sobre la expresión de *hila*. La expresión de *HilA*, a su vez, se ve regulada positivamente por un sistema anexo, el SirA/SirC.

Se puede, resumiendo, secuenciar los eventos de esta manera:

- a. Las proteínas SirA y SirC promueven la transcripción de los locus *hilC* y *hilD*, produciéndose las proteínas HilC y HilD.

- b. Las proteínas SirA, SirC, HilC y HilD se asocian a la ARN polimerasa para prender la transcripción de los genes *orgA*, *prg* y *hilA*.
- c. Las proteínas HilA y SirC se asocian a la ARN polimerasa para transcribir partir de los operones *inv* y *sip*.
- d. El aumento de la proteína PhoP inhibe la transcripción de los genes *hilC*, *orgA*, *prg* e *hila*. Consecuencia de esto la proteína activadora HilA se disminuye.
- e. El agotamiento de la HilA cesa por completo la transcripción en todo el sistema.

Este circuito ilustra el mecanismo de encendido y apagado en el genoma microbiano. Nos da también un indicio de la complejidad que posee un proceso invasivo, en este caso el de la salmonela, sobre todo si se considera que hay muchos otros genes involucrados en patogénesis.

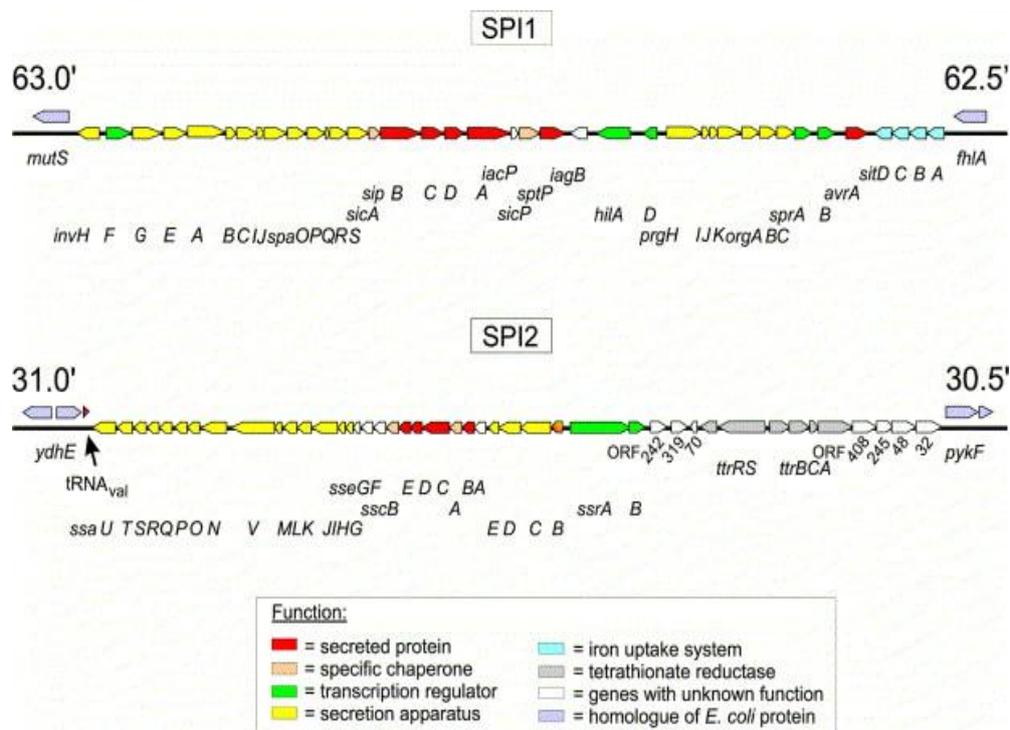


Figura 1.1. Organización de Operones en un SST3. **Fuente:** The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. Loströh, P y Lee, C. 2001.

1.6. MÉTODOS TRADICIONAL Y NO TRADICIONAL PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP. EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

Los métodos clásicos o tradicionales para el aislamiento de *Salmonella* spp. son un referente en todo laboratorio de análisis microbiológico de alimentos, son los más fiables y hay técnicas prediseñadas que son muy fáciles de adoptar. Así como siempre ha existido esa seguridad en la lectura de resultados, también se

destacada la inversión de tiempo que este análisis requiere, ya que no es antes del quinto día de análisis que se puede establecer un resultado de los mismos.

En los últimos años se han desarrollado y acogido varios métodos rápidos de análisis para la detección de este patógeno, la variabilidad de estos es muy grande y cada vez son más aceptados, principalmente por quienes frecuentemente requieren un análisis de presencia o ausencia de *Salmonella* spp.

Método Tradicional

Los métodos para el aislamiento de la bacteria están divididos en tres etapas sucesivas las cuales son: 1) Enriquecimiento No Selectivo, 2) Enriquecimiento Selectivo, 3) Siembra en Placa con medios sólidos selectivos y diferenciales. Posteriormente se lleva a cabo el estudio de las características Bioquímicas de las colonias sospechosas en los medios adecuados para su identificación, y finalmente el Análisis Antigénico.

1) Preenriquecimiento en medio no selectivo: Se utiliza cuando la muestra en estudio ha sufrido un proceso de desecación o

irradiación, cuando ha estado congelada por mucho tiempo o si el pH del medio es muy bajo, este tratamiento puede determinar que las bacterias presentes en la muestra se encuentren en un estado semilátente y tiene como finalidad la revitalización de los microorganismos afectados por las diferentes condiciones de tratamientos industriales o de almacenamiento, permitiendo que las células bacterianas comiencen el proceso de multiplicación normal sin estar expuestas a sustancias inhibidoras o selectivas que puedan llegar a ser tóxicas para estas bacterias “debilitadas”, sustancias que si están presentes en los medios selectivos de enriquecimiento. Se realiza en caldo peptonado bufferado o lactosado al 0.2%, para incrementar la recuperación de especies de salmonelas deterioradas por técnicas de elaboración, preservación, preservantes, presión osmótica alta, cambios bruscos de pH, etc. (Luna 1991; Hurtado 2001).

2) Medios de enriquecimiento selectivo: Se realiza en caldos de enriquecimiento, los cuales estimulan el crecimiento de formas compatibles con *Salmonella* spp., e inhiben el desarrollo de bacterias intestinales y coliformes. Entre los caldos mayormente usados para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. se encuentran:

- Caldo selenito: En el medio de cultivo, la peptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable y el mecanismo de acción del selenito, es inhibir el crecimiento de bacterias intestinales, coliformes y Enterococos, principalmente en las primeras 6 a 12 horas de incubación. *Salmonella* spp., y *Pseudomonas* spp., no son inhibidos (Merck, 1994).
- Caldo tetracionato: Medio que junto con el tiosulfato excedente, inhibe de igual forma coliformes y otras bacterias acompañantes, sin alterar las bacterias reductoras de tetracionato como *Salmonella* spp. y *Proteus* spp. Adicionalmente, las sales biliares que contienen inhiben considerablemente a todos los microorganismos de presencia obligatoria en el intestino (Palumbo y Alford, 1970).
- Caldo de enriquecimiento Gram negativos (GN) según Haina: Favorece la recuperación de los organismos Gram negativos, especialmente *Shigella* y *Salmonella* spp., pues en su composición tiene triptona que actúa como nutriente en el medio, citrato y desoxicolato de sodio, con acción

bacteriana para organismos Gram positivos, especialmente *Streptococos* fecales, todo tipo de bacilos esporulantes e inhiben el desarrollo de coliformes. Los fosfatos sirven de buffer, evitando la acidificación precoz del medio de cultivo cargo de productos metabólicos ácidos. Adicionalmente, la elevada concentración de manitol sobre l dextrosa ayuda a limitar el crecimiento de *Proteus* y acelera el de *Shigella* y *Salmonella* spp. (Hurtado, 2001).

Es necesario tener en cuenta que el caldo de enriquecimiento usado puede afectar la recuperación de algunos serotipos de *Salmonella* spp., por ejemplo, ciertos serotipos pueden ser inhibidos por el tetrionato si el inóculo es pequeño (*S. paratyphi* A, *S. houten*, *S. uccele*, *S. luton*, *S. gallinarum*, *S. meleagridis* y *S. treforest*, entre otras). (Van Schothorst, *et al*, 2004)

3) Medios de cultivo selectivos y diferenciales

- Medios de cultivo selectivos: Son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos deteniendo el desarrollo de otros; esto se logra con el agregado de sustancias inhibidoras como antibióticos, ciertos colorantes,

sales biliares, etc. Los medios EMB (a), MacConkey (b), desoxicolato (c) o CHROMagar Orientación (d), permiten detectar con rapidez los microorganismos No fermentadores de lactosa como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. El agente inhibidor en estos medios son sales biliares (stanchi, 2007).

- a) Agar eosina azul de metileno (EMB), permite demostrar la presencia de enterobacterias patógenas y propiciar su aislamiento, sin embargo, no es confirmativo, solo permite una orientación al diagnóstico. El modo de acción del medio se basa en que sus componentes lactosa y sacarosa permiten diferenciar las enterobacterias de acuerdo con su capacidad de fermentarlos y por el aspecto y el color de sus colonias. Los colorantes empleados inhiben notablemente el desarrollo de gérmenes Gram Positivos. Las colonias de *Salmonella* spp. se observan en el medio incoloras o con tonalidad ambar (Bonnie, 2001).
- b) Agar MacConkey (McK), las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias Gram Positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de este

disacárido; las colonias lactosa positivas (*E. Coli*) aparecen rojas con halo turbio; las lactosa negativas (*Salmonella* spp.) son incoloras (Stanchi, 2007).

- c) Agar desoxicolato, es un medio altamente selectivo por ser el desoxicolato sódico supresor del crecimiento de coliformes y Gram positivos. Las colonias típicas de la *Salmonella* spp. son pequeñas, incoloras, elevadas y opacas; algunas cepas producen precipitado negro en el centro (Stanchi, 2007).
- d) BD BBL™ CHROMagar™ Orientacion®: Medio de cultivo para el aislamiento e identificación de patógenos del tracto urinario. Permite la identificación de *E. Coli*, *Enterococcus*, grupos KES (*Klebsiella* – *Enterobacter* . *Serratia*) y PMP (*Proteus* – *Morganella* - *Providencia*), *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae* aunque requiere de pruebas confirmatorias. Algunos de estos microorganismos producen enzimas para el metabolismo de lactosa, glucósidos o ambos. Otros organismos no producen ningún tipo de enzima, por ejemplo *E. Coli* contiene enzimas para el metabolismo de lactosa pero es β glucosidasa negativo; algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como

Salmonella spp. y algunos cocos Gram positivos son β glucosidasa positivo pero no poseen las enzimas para la fermentación de la lactosa. Adicionalmente, la enzima triptófano deaminasa es típicamente encontrada en el grupo PMP.

El medio contiene sustratos cromógenos que permiten la diferenciación de los microorganismos mediante la degradación de enzimas específicas de cada uno (Bonnie, 2001; ISO, 2002)

- Medios de cultivo diferenciales: Permiten diferenciar las bacterias bioquímicamente por su actividad metabólica. Poseen un sustrato, sobre el cual actúa o no la bacteria, y esa actividad se revela por variación del PH del medio o por alguna actividad enzimática que modifica su aspecto. En el proceso de recuperación de *Salmonella* spp., los aislamientos sospechosos por ser No fermentadores de lactosa en el Medio Selectivo, son sembrados en medios diferenciales que permiten la observación de colonias características y propias de la bacteria (Stanchi, 2007). Los medios más reconocidos para el aislamiento de *Salmonella* spp. son:

a) Agar Hektoen entérico: Medio de cultivo selectivo y diferencial empleado para la demostración y aislamiento de bacterias intestinales patógenas, a partir de los más diversos materiales tales como heces y alimentos entre otros (Merck, 1994). Las colonias del género *Salmonella* se desarrollan con producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y un halo transparente alrededor dando características de un “ojo de pescado” (Merck, 1994, Murray y Shea 2004). Frente a otros medios de cultivo selectivos, el agar para enterobacterias Hektoen aun cuando posee suficiente efecto supresor de la flora acompañante, ejerce escasa inhibición de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. y por lo tanto, permite la obtención de altos rendimientos en estos gérmenes (King y Meztger 1968, Taylor y Schelhart 1971)

Debido a los dos indicadores, Azul de bromotimol y Fucsina ácida, las colonias lactosa-positivas muestran una expresiva diferencia cromática frente a las colonias lactosa negativas; de igual forma ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente la lactosa y más fácilmente la sacarosa y la salicina, sustancias reaccionantes fácilmente fermentables, lo que impide

hallazgos de patógenos falsamente positivos. La combinación de tiosulfato, como sustancia reaccionante y una sal de hierro como indicador, da una coloración negra a las colonias H₂S positivas. Una mezcla de sales biliares inhibe la flora acompañante (Merck, 1994, Murray y Shea 2004).

- b) Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD): Medio para el aislamiento y diferenciación de enterobacteriáceas patógenas, especialmente especies de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. El efecto inhibitorio de este medio de cultivo es débil; el desoxicolato genera la inhibición de bacterias coliformes y permite la dispersión de cepas de *Proteus* que puede llegar a confundirse con las colonias producidas por salmonela; adicionalmente, la diferenciación entre *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. se da porque la primera produce fermentación de Xilosa, descarboxilación de Lisina y genera ácido sulfhídrico (Hurtado, 2001). La forma de acción del medio se basa en que la degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa produce un viraje del medio a amarillo, por el indicador rojo de fenol. El tiosulfato y la sal de hierro, revelan la formación de ácido sulfhídrico por la

precipitación de sulfuro de hierro (negro) en las colonias. Las bacterias que descarboxilan la lisina, se reconocen por la presencia de un color rojo – púrpuro, debido al aumento del pH alrededor de sus colonias (Merck, 1994, Murray y Shea 2004). Varias de estas reacciones pueden presentarse simultáneamente o sucesivamente, lo que puede dar lugar a diversos matices de color del indicador de pH, o a un viraje de amarillo a rojo en el transcurso de una incubación más prolongada. Las colonias de *Salmonella* spp. se observan con pigmentación rosa o roja, algunas veces transparentes con o sin centro negro y/o completamente negras (Murray y Shea 2004).

- c) Agar Salmonella – Shigella (SS): Es un medio selectivo y diferencial. La selectividad está dada por las sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp. Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa y la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. *Salmonella* spp., desarrolla colonias traslúcidas ocasionalmente opacas, algunas con centro negro a causa de la

producción de ácido sulfhídrico (Meljem, 1995, Murray y Shea 2004).

- d) Agar verde brillante: Medio de enriquecimiento altamente selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias patógenas como *Salmonella* spp. a excepción de *S. entérica* serovar *typhi* y *paratyphi A*. En el medio la pluripeptona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y la sacarosa son los hidratos de carbono fermentables, el rojo de fenol es el indicador de pH, que vira a amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares; el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el verde brillante actúa como agente selectivo. Las colonias de *Salmonella* spp. se observan con coloración rosa, blanca o transparente sobre un fondo rojo (Murray y Shea, 2004)
- e) Agar bismuto sulfito: Es un medio diferencial y selectivo, usado para el aislamiento e identificación de *Salmonella entérica* serovar *typhi* y otras bacterias entéricas. El medio contiene peptona y tejidos animales, extracto de carne, glucosa, sulfato férrico y sulfito bismuto que actúa como inhibidor de la mayoría de organismos

comensales. Las colonias típicas de *Salmonella* spp. pueden ser café, gris o negras con o sin brillo metálico, generalmente el medio circundante (halo) es café que posteriormente se torna negro; algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro (Murray y Shea, 2004).

- f) Agar XLT4: Medio de cultivo selectivo y diferencial empleado para el aislamiento e identificación de microorganismos del género *Salmonella* excepto *S. entérica* serovar *typhi* (Dush y Altwegg, 1995). El medio contiene peptona como fuente de nitrógeno, extracto de levadura como fuente de vitaminas y otros cofactores; la diferenciación de *Salmonella* spp. de otros microorganismos se basa en la fermentación de la xilosa, lactosa y sucrosa; descarboxilación de la lisina y la producción de sulfuro de hidrógeno, la cual es detectada por la adición de iones férricos. Por su parte, el tiosulfato de sodio es adicionado al medio como fuente de sulfuro inorgánico, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico del medio y el rojo fenol es adicionado como indicador de los cambios de pH resultantes de las reacciones de fermentación y descarboxilación. Al medio

base, es adicionado suplemento de agar XLT4, con el fin de inhibir el crecimiento de organismos diferentes a la *Salmonella* spp. Las colonias típicas de la bacteria (H_2S positivas), aparecen negras o con tonalidad amarilla con centro negro después de 18-24 horas de incubación. A medida que pasa el tiempo, las colonias se recubren de pigmento negro por completo o toman una tonalidad rosada hacia la periferia, con centro negro; las colonias de *Salmonella* spp. de las cepas H_2S negativas, aparecen de color rosado amarillento. Por su parte, la mayoría de las colonias de *Citrobacter* sp. Que crecen en este medio son amarillas sin evidencia de ennegrecimiento. El crecimiento de *Enterobacter aerogenes*, *E. Coli*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Providencia*, *Alteromonas putrefaciens*, *Yersinia enterocolítica* y *Acinetobacter* son parcialmente inhibidas; las colonias que aparecen son de tonalidad roja (Becton Dickinson).

- g) BD BBL™ CHROMagar™ Salmonella®: Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento e identificación presuntiva de especies de *Salmonella* spp., permitiendo la diferenciación de la enterobacteria de la flora acompañante dada la presencia de sustratos

cromógenos en el medio. Los organismos Gram positivos son inhibidos como resultado de un medio base selectivo; adicionalmente cuenta con un agente antifúngico que previene el crecimiento de especies de *Candida*; otros agentes antimicrobianos presentes en el medio de cultivo inhiben el crecimiento de Gram negativos, microorganismos no fermentadores de lactosa y especies de *Proteus*. Debido a diferencias metabólicas en la presencia de cromógenos seleccionados, las colonias de *Salmonella* spp. se observan de color rosa-púrpura, mientras que los microorganismos pertenecientes a otros géneros se observan con pigmento verde-azulado, o son completamente inhibidos (Gaillot, *et al.*; 1999)

Método no Tradicional

Como ya se indicó previamente, las metodologías clásicas o tradicionales para la detección y aislamiento de los diversos serotipos de *Salmonella* spp. toman al menos tres a cinco días para obtener un resultado. Por esta razón, un número considerable de métodos alternativos de detección rápida de este patógeno se han desarrollado

para producir resultados de modo más rápido en muestras de alimentos y ambiente.

Muchos de éstos están disponibles comercialmente y han sido validados por la AOAC y/o AFNOR. La base de datos de los métodos validados por la AOAC muestra más de 30 métodos de testeo rápido para la detección de *Salmonella*.

Estos kits de detección utilizan un amplio espectro de diferentes tecnologías, incluyendo nuevas técnicas de cultivo, separación inmunomagnética, EIA-ELISA, ensayos basados fluorescencia y colorimetría, ensayos de flujo lateral que incorporan tecnología inmunocromatográfica, y técnicas moleculares como la hibridación de ADN y ensayos basados en la técnica de PCR.

Algunos de estos métodos se pueden automatizar para analizar grandes números de muestras simultáneamente. Casi todos los protocolos de pruebas rápidas incluyen una etapa de pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento selectivo para que, a continuación, se realice el ensayo para la detección rápida, con el objetivo de reemplazar el cultivo en agares selectivos y otras pruebas bioquímicas de confirmación. La mayoría de estos kits declaran

producir un resultado de 24 a 48 horas, o menos, usualmente dependiendo esto del de los protocolos de enriquecimiento.

En nuestro medio hay ciertos kits que tienen mayor acogida, ya sea por el establecimiento de las empresas que desarrollan y comercializan estos métodos de detección o por la accesibilidad económica que puedan tener estos métodos de testeo.

Ensayos de naturaleza inmunológica

- **Ensayo de flujo lateral.-** es una prueba presuntiva cualitativa que detecta la presencia de *Salmonella* en los alimentos dentro de 21 horas (tiempo total de la prueba). La muestra es enriquecida con un “medio de resucitación” y luego pasa a un enriquecimiento en un medio selectivo (Selenito Cistina o Rappaport-Vassiliadis). El cultivo enriquecido se utiliza para inocular el dispositivo de detección propio del kit, que inicia un flujo lateral a través de una zona de reactivo que contiene anti-anticuerpos conjugados de *Salmonella* con partículas de oro coloidal que capturan los antígenos presentes en el cultivo. El complejo antígeno-anticuerpo migra más lejos y es capturado por un adicional de anticuerpo adicional, el cual provoca que el oro coloidal se precipite y forme

una línea visual, indicando un resultado positivo. Una línea de control del procedimiento se formará independientemente de la presencia de *Salmonella* para indicar que la prueba está funcionando correctamente.

- **Ensayo de EIA-ELISA.-** es una técnica bioquímica que se utiliza para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. En el contexto de la detección de *Salmonella*, una muestra con una cantidad desconocida de antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido (generalmente una placa de microtitulación de poliestireno) o bien de manera no específica (por medio de la adsorción a la superficie) o específicamente (a través de la captura por otro anticuerpo específico para el mismo antígeno, en un "sándwich" ELISA). Después de que el antígeno está inmovilizado, un anticuerpo de detección se liga a una enzima, como peroxidasa de rábano (HRP), formando un complejo con el antígeno. Entre cada etapa, la placa se lava típicamente con una solución de detergente suave para eliminar cualquier proteína o anticuerpos que no se unen específicamente. Después de la etapa de lavado final, la placa se fija mediante la adición de un sustrato enzimático (ABTS o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) para producir una señal visible (producto colorimétrico o fluorescente) debido a la escisión enzimática del sustrato. Equipo colorimétrico se utiliza para medir

la señal que indica el equipo colorimétrico que indica la presencia del antígeno diana en la muestra.

Los ensayos de ELISA son muy específicos, sensibles, rápidos, fáciles de realizar y muy escalables, lo que permite a los laboratorios adoptar fácilmente la tecnología para los análisis microbiológicos de rutina. La reactividad de ELISA sin embargo, se ve influida por diversos componentes del medio de enriquecimiento y condiciones de incubación utilizados. Con la mayoría de los métodos de ELISA, los resultados negativos se pueden obtener dentro de 24 h después de una incubación durante la noche en caldo selectivo. Los resultados positivos todavía pueden requerir un mayor aislamiento cultural y la confirmación serológica y bioquímica en función de los requisitos reglamentarios.

Hibridación del ácido nucleico

La hibridación del ADN también se ha descrito para la detección de *Salmonella* (Chan *et al.* 1988). Sondas dirigidas a regiones específicas del genoma de *Salmonella* proporcionan una herramienta poderosa para el uso en ensayos de hibridación de ADN. Tales métodos de detección han demostrado, en ciertos casos, ser más sensibles que la

electroforesis en gel de agarosa y más específicos que el cultivo o pruebas inmunológicas (ensayos basados Ten Bosch *et al.* 1992. Manzano *et al.* 1998). Por ejemplo, Maciorowski *et al.* en 1998 fue capaz de detectar productos de PCR a partir de *S. Typhimurium* alimentos para animales inoculados por hibridación con biotina y fluorescente sondas marcadas. Tal especificidad elimina la necesidad de confirmación serológica y la incidencia de falsos positivos causada por anticuerpos de reactividad cruzada con otros microorganismos. Además, a diferencia diferenciaciones bioquímicos, las reacciones de sonda no se basan en actividades enzimáticas y por lo tanto no son afectadas por la interferencia algún componente de los medios de cultivo o la presencia de bacterias con fenotipos similares. La mayoría de los ensayos de hibridación de ADN tratan aprovechar esta especificidad del ensayo de microarreglos de ADN haciendo un direccionamiento a múltiples genes; pese a todo esto son pocas las aplicaciones relacionadas con la detección de *Salmonella* a partir de muestras alimentarias y ambientales hasta el momento.

Separación inmunomagnética

En un intento de reducir la longitud de los análisis microbiológicos de rutina y para reducir al mínimo los problemas asociados con sistemas

de detección rápida tales como la interferencia de los alimentos y residuos de alimentos y la falta de sensibilidad, no ha habido mucho interés en el desarrollo de técnicas de separación y de concentración antes de la detección. Varias técnicas han sido utilizadas para este propósito, incluyendo: centrifugación (Basel *et al.* 1983.), filtración (Farber y Sharpe, 1984), entre otros. Sin embargo, el más exitoso de los enfoques para la separación y concentración de organismos objetivo ha sido el uso de la separación inmunomagnética (IMS). Las ventajas de IMS son que reduce el tiempo total de análisis y mejora la sensibilidad de detección. IMS es rápido, método técnicamente simple y específico para el aislamiento de los organismos diana (Shaw *et al.* 1998). Partículas paramagnéticas son recubiertas con anticuerpos específicos para el organismo diana y se añadió a un cultivo de enriquecimiento posterior. El organismo diana es capturado sobre las partículas magnéticas y todo el complejo se retira entonces del sistema por la aplicación de un campo magnético. El microorganismo objetivo es removido de los restos de comida y microorganismos competidores, que de otro modo pueden interferir con el sistema de detección. Si es necesario, el complejo aislado se puede volver a poner en suspensión en un caldo de enriquecimiento de modo que el número de células puede ser aumentado rápidamente para mejorar la sensibilidad de los ensayos de detección. Además, IMS por diseño se

puede utilizar en conjunción con otros métodos de detección rápida, incluyendo ELISA, la electroquimioluminiscencia, y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para aumentar aún más su sensibilidad analítica (Fluit *et al.* 1993; Cudjoe *et al.* 1994.; Cudjoe *et al.* 1995; Sapanova *et al.* 2000). Se ha informado de que IMS es más sensible que los métodos de cultivo convencionales y es capaz de reducir el tiempo de cultivo total de análisis de uno a dos días (Lynch *et al.* 2004; Ten Bosch *et al.* 1992).

CAPÍTULO 2

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. *Objetivo general:*

- Evaluar la veracidad del método de PCR, en relación a la metodología microbiológica tradicional, para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes.

2.1.2. *Objetivos específicos:*

- Validar estadísticamente el procedimiento de detección de *Salmonella* spp. en las muestras de embutidos, cereales y superficies inertes por la técnica de PCR.

- Bosquejar los lineamientos de protocolo básicos para detectar *Salmonella* spp. en muestras alimentarias, con bases en la experimentación realizada.
- Comprobar la especificidad de amplificación del gen *invA* ante fragmentos de ADN no deseados de otros microorganismos patógenos comunes en muestras alimentarias.
- Identificar las variables que existen en el análisis, que puedan afectar los resultados en detección de *Salmonella* spp. en las muestras de embutidos, cereales y superficies inertes por la técnica de PCR.
- Estimar y comparar las variables de costo y tiempo requeridas por cada metodología.

2.2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2.2.1. Hipótesis

Salmonella spp. se mantiene presente en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes.

La reacción en cadena de la polimerasa es específica para amplificar una secuencia predeterminada del genoma de *Salmonella* spp.

2.2.2. Justificación

La salmonelosis es una de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) más comunes y agresivas en el ser humano. En América Latina, según datos reportados al SIRVETA, desde el año 2000 al 2008 ha habido 6.332 reportes de brotes de ETAs, viéndose afectadas en estos brotes 230.141 personas y han fallecido 317. En nuestro país, se ha reportado 220.137 casos de salmonelosis entre los años 1990 y 2008 según datos de Vigilancia Epidemiología del Ministerio de Salud Pública.

En el ámbito comercial el Ecuador contabiliza, en los últimos 14 años, 130 rechazos de la Unión Europea de productos alimenticios, de los cuales 2 casos han sido por presencia de alguna variedad de *Salmonella* (RASFF, 2012); mientras que en la agencia norteamericana FDA reporta por lo menos 15 casos de presencia de *Salmonella* desde el 2006 hasta enero del 2012 en productos alimenticios.

CAPÍTULO 3

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. POBLACIÓN MUESTRAL

La población en estudio está conformada por tres matrices de muestras que son: embutidos, cereales y superficies inertes. La elección de dichas matrices se realizó en base a la frecuencia y cantidad de las muestras, que solicitan detectar la presencia de *Salmonella* spp., ingresadas a los laboratorios de PROTAL.

La veracidad del resultado bacteriológico efectuado en el laboratorio depende directamente de la calidad de la muestra enviada, es por esto que se consideró muy importante la aplicación de las buenas prácticas de laboratorio.

Para este estudio se recolectaron 90 muestras: 30 de superficies inertes, 30 de cereales y 30 de embutidos.

El análisis se realizó de manera simultánea, la parte microbiológica en PROTAL y el desarrollo de la PCR en el CIBE.

El tamaño de la muestra se escogió por limitaciones de reactivos, mas no por un factor estadístico. Sin embargo, para poder llevar a cabo una validación, se realizó el mínimo de ensayos requeridos.

3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS

En los estudios comparativos realizados se emplearon de cepas de control ATCC. Las cepas de referencia son: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 700927), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 33583), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Todas estas cepas fueron donadas por el laboratorio de PROTAL.

3.3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Toma y preparación de muestras

Como ya se indicó previamente, se tenían tres matrices: cereales, embutidos y superficies inertes en el muestreo se tomaron 4 tipos de cereales de distintas marcas comerciales: “arroz crocante con sabor a vainilla”, “cereal con salvado de trigo”, “Arroz crocante con sabor a chocolate” y “hojuelas de maíz azucaradas”. Así mismo para los embutidos se tomaron “salchichas frankfurt” de dos distintas marcas comerciales, una marca de “salchicha vienesa de pollo” y una de “salchichas de línea diaria”. Por otro lado, para las superficies inertes, bajo previo permiso, se tomaron muestras en distintas superficies en la cocina de un servicio de alimentación de la ESPOL con hisopos de transporte estériles.

Se evaluó cada matriz de tres maneras: inoculadas con *S. typhimurium*, inoculadas con un control negativo, en este caso *E. coli*, y sin ninguna clase de inoculación. Por cada evaluación de las matrices se realizaron 10 repeticiones para aumentar la fiabilidad de los resultados.

Para la contaminación de las muestras, tanto con *S. typhimurium*, como con *E. coli* como controles positivos y negativos, respectivamente, se realizó un raspado de un cultivo puro (en PCA) de estas cepas para llevarlas a 10 ml de un caldo de enriquecimiento Lethen. Posteriormente se tomó 1 ml de este caldo contaminado para la inoculación de cada superficie o muestra, según haya sido el caso.

Procedimiento microbiológico para embutidos y cereales

El pre enriquecimiento se realizó en 90 ml de caldo lactosado, la relación cultivo-muestra es 90:10. El caldo se dispensó asépticamente en fundas estériles.

Se pesaron 10 g de cada muestra a analizar, se sellaron y se homogenizaron por medio minuto en un Stomacher. Las fundas fueron previamente etiquetadas para su identificación.

Se llevó el caldo con la muestra a incubación a 37 grados Celsius por 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se tomó alrededor de 1 ml de cada muestra y se lo transfirió asépticamente a tubos de ensayo estériles,

previamente etiquetados. Estas muestras fueron dirigidas al diagnóstico molecular de las mismas.

Para continuar con el análisis microbiológico, se pasó al enriquecimiento selectivo tomando 1 ml de cada muestra y llevándolo a un tubo con 10 ml de caldo tetracionato estéril, al que previamente se le adicionó 0,2 ml de una solución de yodo-yoduro y 0,1 ml de una solución de verde brillante. Se llevó a incubación por 24 horas a 37 grados Celsius.

Las muestras enriquecidas fueron posteriormente inoculadas en tres medios de cultivos selectivos: agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), Hektoen entérico agar y agar bismuto sulfito y llevadas a incubación por 48 horas a 37 grados Celsius.



Figura 3. 1. *Salmonella* Positivo en Hektoen Entérico Agar. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.



Figura 3. 2. *Salmonella* Positivo en Bismuto Sulfito Agar. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.



Figura 3. 3. *Salmonella* Positivo en XLD Agar. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

Procedimiento microbiológico para superficies inertes

Las muestras tomadas con los hisopos de transporte estériles fueron transportadas de modo seguro y a temperatura de refrigeración hasta los laboratorios para su correspondiente análisis.

El pre enriquecimiento se realizó sumergiendo el hisopo de transporte en 10 ml de caldo lactosado estéril previamente dispensado de modo aséptico, el cual se llevó a incubación a 37 grados Celsius por 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se tomó alrededor de 1 ml de cada muestra y se lo transfirió asépticamente a tubos de ensayo estériles, previamente etiquetados. Estas muestras fueron dirigidas al diagnóstico molecular de las mismas.

Para el análisis microbiológico, se siguió el mismo procedimiento de enriquecimiento selectivo y de cultivos selectivos previamente descritos.

Procedimiento para el diagnóstico molecular.

Se amplificó una región del gen *invA* y fue publicado por Rahn *et al.* (1992). El gen *invA* está situado en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* spp. que codifica las proteínas de un sistema de secreción tipo III (Collazo, CM y Galán JE, 1997). Además, se comparó la efectividad de dos sets de iniciadores para la detección específica de *Salmonella* spp.

TABLA 6.
Descripción de Iniciadores

Set de iniciadores	Tamaño (bp)	Publicador
139: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 141: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	284	Rahn <i>et al.</i> , 1992
Malo2-F: GTA TTG TTG ATT AAT GAG ATC CG Malo2-Ra: ATA TTA CGC ACG GAA ACA CG TT	373	Malorny, 2006

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

Para la indicación de una posible inhibición de la PCR por productos derivados de la muestra, se llevaron controles internos, los cuales consistieron en siempre analizar, por cada gel de agarosa, una muestra inoculada con *Salmonella typhimurium* (como control positivo) y una muestra de *E.coli* (como control negativo).

Es de máxima importancia evitar todo tipo de contaminación en el análisis molecular, tanto de la muestra como del laboratorio, por lo que se llevaron a cabo ciertos procedimientos preoperacionales como:

- Se encendió por 30 minutos la luz UV de la cabina de procedimiento para PCR, conteniendo tubos Eppendorf de 0.2 mL, puntas, guantes, micropipetas, marcador indeleble y demás materiales necesarios para el diagnóstico molecular.
- Transcurridos los 30 minutos, se limpió la superficie con una solución descontaminante de posibles trazas de ADN, (DNA AWAY®, Catálogo S2571505).
- Se realizó la descongelación de los reactivos, en donde una vez que se descongelaron se mantuvieron en hielo o *coolers* para evitar la degradación de los mismos.
- Con puntas estériles se preparó el MasterMix, en la cual se adicionaron por cada muestra, 0.25 µl de cada primer (forward y reverse), 5 µl de GoTaq® (Promega), y el resto se lo completó con agua para llegar a 9 µl. Todo esto se multiplicó por el número de muestras totales que se tuvo en cada corrida: 30 muestras más 1

control positivo (Cepa aislada de *Salmonella*) y más 1 control negativo (Cepa aislada de *E.coli*). Posteriormente se repartieron 9 μ l en cada tubo Eppendorf esterilizado y rotulado.

- Se llevaron las muestras a analizar junto a los viales en sus *coolers* al área de siembra. Previamente se esterilizó la cabina de flujo laminar con luz UV por 30 minutos y luego se esterilizó con alcohol las superficies de contacto.
- Se procedió a pasar 1 μ l del caldo lactosado con la muestra que contenía el ADN a los viales con MasterMix. Luego de esto se realizó un agitado manual.
- Los tubos Eppendorf preparados, se ingresaron en el termociclador y se programó el termociclador de acuerdo a cada pareja de iniciadores (Tablas 7 y 8) ya establecido para el iniciador a usar.
- Mientras se realizaba la amplificación, se preparó el gel de agarosa: pesando 1,5 g de agarosa y disolviéndolo en 100 ml de tris-acetato-EDTA (TAE) para lograr una concentración del 1,5%. Posteriormente se lo calentó en un microondas para que se disuelva, teniendo en cuenta que no se formen burbujas.

TABLA 7.
Programa para realizar la PCR usando los iniciadores 139 y 141

PAREJA DE INICIADORES 139 (BM-397) Y 141 (BM-398)			
DESNATUR. INICIAL	95°C	10 min	1 vez.
DESNATURALIZACIÓN	95°C	30 seg	Se repite el ciclo 35 veces.
HIBRIDACIÓN	60°C	30 seg	
EXTENSIÓN	72°C	30 seg	
ELONGACIÓN FINAL	72°C	3 min	1 vez.

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 8.
Programa para realizar la PCR usando los iniciadores MALO 2 F y MALO 2 R.

PAREJA DE INICIADORES MALO2 F (BM-399) Y MALO2 R (BM-400)			
DESNATUR. INICIAL	95°C	10 min	1 vez.
DESNATURALIZACIÓN	95°C	30 seg	Se repite el ciclo 35 veces.
HIBRIDACIÓN	55°C	30 seg	
EXTENSIÓN	72°C	30 seg	
ELONGACIÓN FINAL	72°C	3 min	1 vez.

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

- Se esperó a que la solución de agarosa se enfriara un poco y se le adicionó 10 µl de SYBR Safe (10.000x, Invitrogen), un reactivo fluorescente que se intercala entre las pares de bases que conforman el ácido nucleico, y se lo puso en el molde, el cual debe estar correctamente nivelado. Es sumamente importante mantener el gel lo menos expuesto a la luz.

- Una vez que el termociclador realizó la amplificación, se llevó el gel a la cubeta electroforética conteniendo el tampón TAE para llevar a cabo la electroforesis (luego de que se sembraron y se colocó el marcador de peso molecular) a 120 voltios por 20 minutos.
- Transcurrido este tiempo, se transporta el gel una cámara de Luz UV, en la cual se puede visualizar el ADN amplificado.

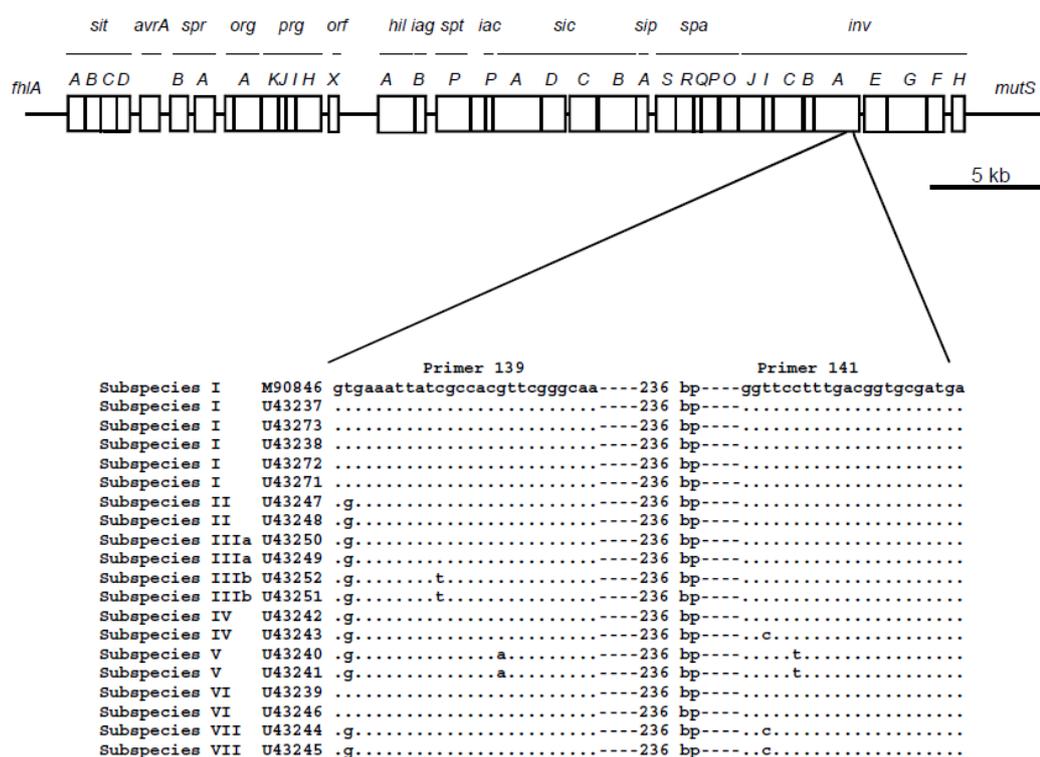


Figura 3. 4. Mapa de la isla de patogenicidad 1 (SPI1). Las secuencias de alineamiento de los cebadores 139/141 (Rahn *et al.* 1992) con respecto a las subespecies de *Salmonella* ssp muestra en la parte inferior. Un punto indica una secuencia idéntica de nucleótidos con respecto al iniciador. **Fuente:** Evaluation of *Salmonella* spp. specific primer-sets for the validation within the Food PCR Project. Malorny, B; Bunge, C y Helmuth, R. 2000.

Aislamiento e identificación microbiológica

El aislamiento e identificación se evaluó en los medios de cultivo XLD Agar, Bismuto-Sulfito Agar y Hektoen Entérico Agar. En primer lugar se usó este estudio para confirmar la pureza del cultivo y determinar si la morfología y característica de las colonias eran indudablemente correspondientes a *Salmonella* spp.

Así se obtuvo que en los resultados positivos en Agar Hektoen Entérico, la identificación de microorganismos del género *Salmonella* está determinada por el crecimiento de colonias con una coloración negra en su parte central y transparente alrededor, lo que ha permitido, en el dialecto común, definir que los microorganismos del género *Salmonella* en agar Hektoen crecen con apariencia de “ojo de pescado” (Figura 3.1.) (Luna, 1991; Gaillot *et al.*, 1999; Dusch y Atwegg, 1993).

En el caso del Agar Bismuto Sulfito, las colonias de *Salmonella* crecidas sobre este, muestran un centro negro rodeado de un borde claro; están bordeadas también de un precipitado negro con brillo metálico, por la reducción de iones de bismuto que se transforman en

bismuto metálico. A veces, las colonias son marrones, grises o verdes (Figura 3.2.) (Pascual y Calderón, 2000).

Por último, las colonias de *Salmonella* desarrolladas sobre Agar XLD, son rojas con centros negros debido a un cambio de pH por fermentación de la xilosa y descarboxilación de la lisina. Los centros negros se deben a la producción de H₂S. A veces no se forman centros negros o, por el contrario, las colonias son negras casi por completo (Figura 3.3.) (Pascual y Calderón, 2000).

La caracterización bioquímica solo se continuó con las colonias que resultaron sospechosas de ser positivas en los medios previamente mencionados. Se utilizaron las pruebas de bioquímica más comunes como lo son urea, agar hierro triple azúcar (TSI) y lisina.

De acuerdo al protocolo establecido el diagnóstico molecular, cada corrida en la PCR fue llevada bajo los parámetros de Buenas Prácticas de Laboratorio y cerciorándonos de que las muestras y variables estén debidamente identificadas y controladas.

Adicionalmente a esto, más adelante se va a llevar a cabo una estimación de tiempos y costos, para la cual, se ha tomado en cuenta

todos y cada uno de los materiales, equipos y reactivos usados para el ensayo de PCR, así como el tiempo que tomó realizarlo.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante la estadística se puede establecer la fiabilidad de los procedimientos de medición empleados. Tradicionalmente se ha reconocido una fuente importante de error de medida en la variabilidad entre observadores (Landis, 1977), por lo que el principal objetivo de los estudios de fiabilidad debe consistir en estimar el grado de esta variabilidad.

De este modo, las variables que pasan a ser las más críticas en un típico estudio de fiabilidad son: el sesgo entre observadores (la tendencia de un observador a dar consistentemente valores mayores que otro) y la concordancia entre observadores (hasta qué punto los observadores coinciden en su medición).

Con respecto al segundo aspecto, la manera concreta de abordar el problema depende directamente de la naturaleza de los datos: si estos son de tipo continuo es habitual la utilización de estimadores del coeficiente de correlación intraclase, mientras que cuando se trata de

datos de tipo categórico el estadístico más empleado es el índice kappa.

Kappa de Cohen

El índice kappa relaciona el acuerdo que exhiben los métodos de observación, más allá del debido al azar, con el acuerdo potencial también más allá del azar. En esencia, el proceso de elaboración del índice es el siguiente: se calcula la diferencia entre la proporción de acuerdo observado y la proporción de acuerdo esperado por azar; si ésta es igual a cero, entonces el grado de acuerdo que se ha observado puede atribuirse enteramente al azar; si la diferencia es positiva, ello indica que el grado de acuerdo es mayor que el que cabría esperar si solo estuviera operando el azar y viceversa: en el caso (ciertamente improbable) en que la diferencia fuera negativa entonces los datos estarían exhibiendo menos acuerdo que el que se espera solo por concepto de azar. Kappa es el cociente entre esa cantidad y el acuerdo máximo que se puede esperar sin intervención del azar.

Landis y Koch propusieron en 1977 una escala de interpretación del valor de kappa que considera como aceptable un valor mayor o igual a 0,40 y excelentes los valores superiores a 0,75.

TABLA 9.
Tabla cruzada de los resultados de dos variables dicotómicas con el mismo resultado (método 1 y método 2).

	Método 2			
	Sí	No	Total	
Método 1	Sí	a	b	a+b
	No	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	n

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

La proporción de coincidencias frente al total de sujetos en este caso sería $(a+d)/(a+b+c+d)$, es decir, $(a+d)/n$. Por simple azar, es previsible observar un cierto grado de concordancia entre los dos métodos, para determinar si la concordancia observada es superior a la que se esperaría encontrar por azar resulta conveniente utilizar el índice de concordancia de kappa, que se define como:

$$K = (P_o - P_e) / 1 - P_e \quad \text{Ec2.}$$

Donde P_o representa a la proporción de concordancia observada y P_e la proporción de concordancia esperada por azar. Por tanto, el índice

kappa presenta un valor de 1 cuando la concordancia observada es perfecta, un valor de 0 cuando la concordancia observada es igual a la concordancia esperada por azar y valores inferiores a 0 cuando la concordancia observada es inferior a la concordancia esperada por azar.

La proporción de concordancia esperada por azar (P_e) se calcula como la suma del producto de las probabilidades de clasificar los sucesos en cada una de las categorías por cada uno de los métodos.

Analíticamente:

$$P_e = (a+b)(a+c) + (c+d)(b+d) / n^2 \quad \text{Ec3.}$$

Para interpretar qué significado tiene el valor del coeficiente que se obtuvo al realizar el análisis estadístico, Landis y Koch propusieron la clasificación que se detalla en la tabla 10.

El estudio de comparativo incluyó tres características de la prueba: Precisión Relativa (PR), Sensibilidad Relativa (SR), Especificidad Relativa (ER).

TABLA 10.
Interpretación de los valores del índice de Kappa según el rango de valores.

kappa	Grado de acuerdo
<0	Sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	Muy bueno

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

La precisión relativa se define como el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método alternativo y el método de referencia de muestras idénticas, se define por: $(AP + AN + FP) \times 100 / (AP + AN + VP + FN + FP)$, donde AP se refiere al acuerdo positivo, AN a un acuerdo negativo, FP a los falsos positivos, VP de verdaderos positivos y falsos negativos FN.

La sensibilidad relativa se define como la capacidad del método alternativo para detectar el microorganismo objetivo en comparación con el método de referencia, como sigue: $(AP + VP) \times 100 / (AP + FN)$.

La especificidad relativa se define como la capacidad del método alternativo para no detectar el microorganismo diana cuando no es

detectado por el método de referencia, como sigue: $(AN \times 100) / (AN + FP)$.

Los resultados falsos negativos se definieron como las muestras que dan un resultado negativo con PCR y un resultado positivo con el método tradicional. Los resultados verdaderos positivos se definieron como muestras con resultados positivos en PCR y resultados negativos en el método tradicional, cuando las muestras fueron contaminadas artificialmente.

3.5. VALIDACIÓN

La validación se la realizó por medio de los Laboratorios PROTAL, en el Anexo F se encuentran los certificados correspondientes.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Análisis estadístico comparativo del método PCR y tradicional

Se pretendió evaluar todas las variables posibles de ambos métodos de detección, así como también el desempeño de los cebadores y si la matriz demuestra presenta alguna restricción en su diagnóstico.

En la figura 4.1 se muestra un resultado típico de un análisis de PCR, en los carretes de los extremos se coloca un marcador de peso molecular, en este caso de 500 pb. Con esta guía se puede estimar si las muestras analizadas fueron amplificadas acorde a los iniciadores empleados. Los espacios que denotan un blanco intenso se consideran como resultados positivos, ya que su fluorescencia ante la

luz UV, es el indicador de que el gen en cuestión se ha amplificado en una cantidad suficiente en la PCR.

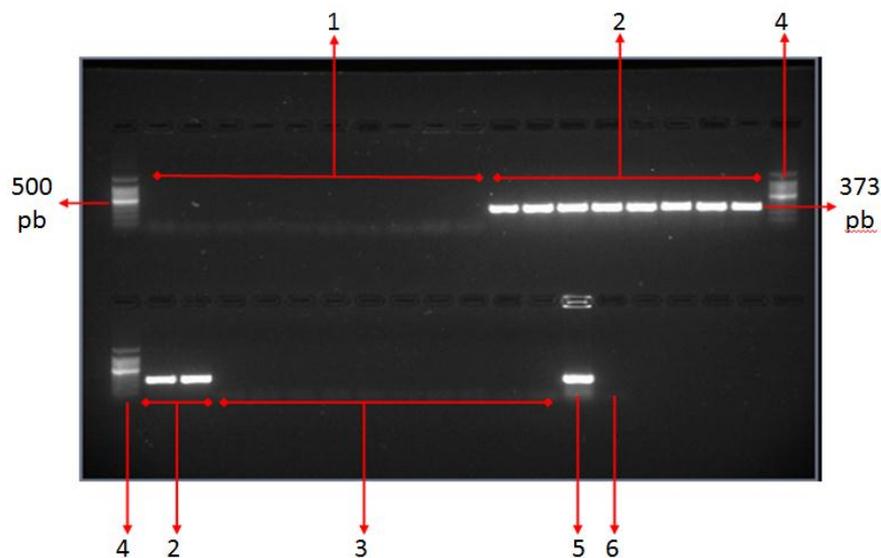


Figura 4. 1. Muestras tomadas de superficies inertes en el gel al 1.5% de agarosa con el par de iniciadores Malo2 F y Malo2 R. 1: Muestras sin inocular. 2: Muestras inoculadas con *S. typhimorium* con tamaño de amplicón de 373 pb. 3: Muestras inoculadas con *E. Coli*. 4: Marcador molecular que va de 100 pb a 500 pb es la banda más intensa. 5: Control positivo. 6: Control negativo. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

A continuación se muestran los resultados de los análisis estadísticos de concordancia entre varios factores de los elementos estudiados:

Se estudió el desempeño de cada pareja de cebadores con cada matriz de muestra, los resultados de los análisis de embutidos se detallan en la Tabla 11 y la Tabla 12.

TABLA 11.
Tradicional Embutido - Embutido MALORNY

		TRADICIONAL EMBUTIDO		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
EMBUTIDO MALORNY	NEGATIVO	20	5	25
		66,67 %	16,67 %	83,33 %
	POSITIVO	0	5	5
		0,00 %	16,67 %	16,67 %
	TODO	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA	0,57142			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 12.
Tradicional Embutido - Embutido 139

		TRADICIONAL EMBUTIDO		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
EMBUTIDO 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

Se observa que en la evaluación de la matriz “Embutidos” se evidenció una concordancia moderada con la utilización del cebador Malo2F-Ra mientras que hubo una concordancia perfecta con los cebadores 139/141. Esta desviación se debió posiblemente debido a que por

error se realizó el diagnóstico molecular a partir del medio de cultivo selectivo y mas no del pre enriquecimiento como dicta la metodología. De la misma manera se evaluó cada matriz de cereales con cada par de iniciadores:

TABLA 13.
Tradicional Cereal - Cereal Malorny

		TRADICIONAL CEREAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
CEREAL MALORNY	NEGATIVO	20	3	23
		66,67 %	10,00 %	76,67 %
	POSITIVO	0	7	7
		0,00 %	23,33 %	23,33 %
	TODO	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA	0,756757			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 14.
Tradicional Cereal - Cereal 139

		TRADICIONAL CEREAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
CEREAL 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	20	10	30
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

La matriz "Cereales" presentó un mayor índice de concordancia perfecto con los iniciadores 139/141 y un índice bueno para

Malorny2F-Ra. Esta variación se observó en las muestras que poseían chocolate, lo que llevó a realizar una investigación y corroborar que en ciertas ocasiones ciertos compuestos presentes en el chocolate pueden inhibir la PCR, esto se lo detallará más adelante.

La tercera matriz, las superficies inertes también se evaluaron de forma cruzada con cada par de cebadores:

TABLA 15.
Tradicional Superficie – Superficie Malorny

		TRADICIONAL SUPERFICIE		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
SUPERFICIE MALORNY	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	20	10	30
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 16.
Tradicional Superficie - Superficie 139

		TRADICIONAL SUPERFICIE		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
SUPERFICIE 139	NEGATIVO	20	0	20
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	10	10
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	20	10	30
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

La matriz “Superficies Inertes” presentó con ambos iniciadores un índice de concordancia perfecto.

Finalmente, se evaluaron todos los resultados obtenidos con cada pareja de cebadores y su correspondiente resultado según la metodología tradicional, los resultados se observan en la Tabla 17 y Tabla 18:

TABLA 17.
Método Tradicional - Malorny

		TODO TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO MALORNY	NEGATIVO	60	8	68
		66,67 %	8,89 %	75,56 %
	POSITIVO	0	22	22
		0,00 %	24,44 %	24,44 %
	TODO	60	30	90
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA	0,785714			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

TABLA 18.
Método Tradicional - 139/141

		TODO TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO 139	NEGATIVO	60	0	60
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	30	30
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	60	30	90
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

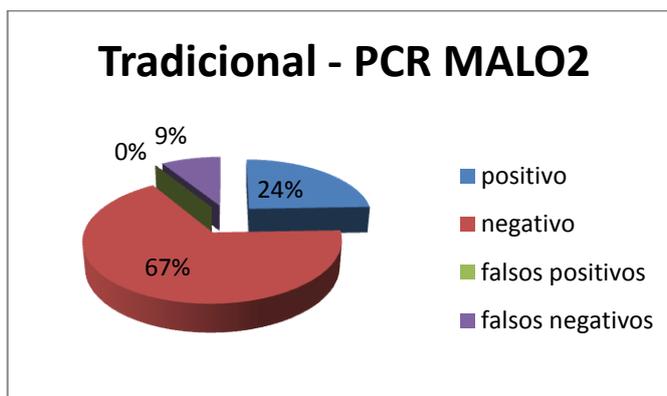


Figura 4. 2. Comparación de muestras analizadas por el Método Tradicional y PCR con los iniciadores MALO2 F/MALO2 R. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

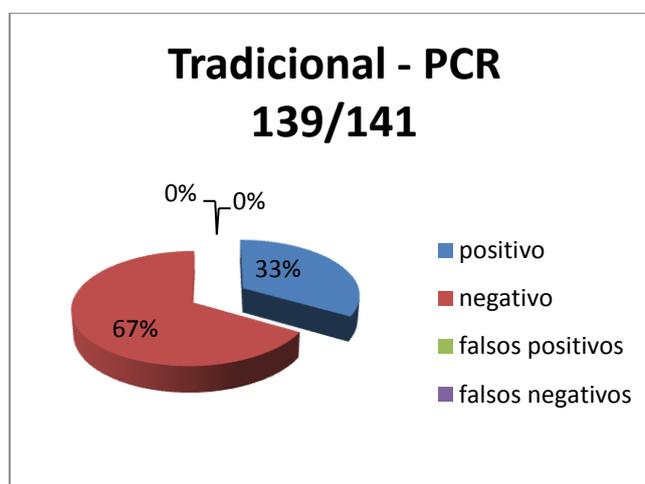


Figura 4. 3. Comparación de muestras analizadas por el Método Tradicional y PCR con los iniciadores 139/141. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

La evaluación del desempeño de los iniciadores indica que todas las muestras diagnosticadas con el par de iniciadores 139/141 mostraron una concordancia perfecta con respecto al método tradicional. Las muestras evaluadas con la pareja de primer Malo2F-Ra denotaron muy un índice bueno, pero obviamente menor al par antes

mencionado debido a que el 9% de los resultados fueron falsos negativos.

TABLA 19.
Cereal 2 Tradicional - Cereal

		CEREAL2 TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO CEREAL	NEGATIVO	40	3	43
		66,67 %	5,00 %	71,67 %
	POSITIVO	0	17	17
		0,00 %	28,33 %	28,33 %
	TODO	40	20	60
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA		0,883117		

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

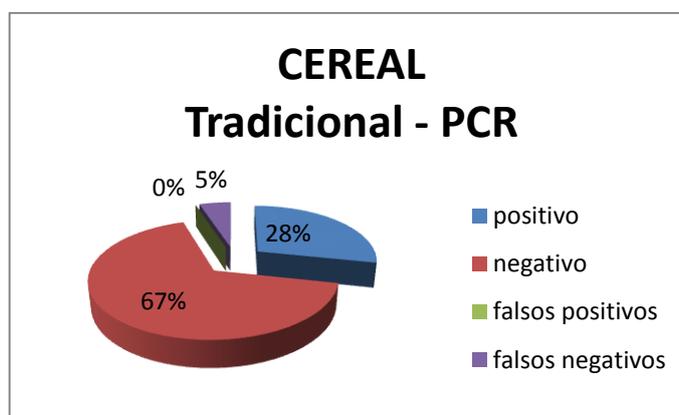


Figura 4. 4. Comparación de las muestras de cereal analizadas por el Método Tradicional y PCR con ambos iniciadores. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

La matriz “Cereal” presenta un índice de concordancia muy bueno. Este índice se lo puede mejorar realizando nuevas pruebas en la que se realice una extracción de ADN de las muestras que contenían chocolate. Se volvió realizar un nuevo análisis de PCR extrayendo el

sobrenadante de la centrifugación de la muestra y, efectivamente, sí se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras.

Se analizaron todos los resultados de las tres matrices estudiadas de acuerdo al diagnóstico molecular, sin importar que pareja de cebadores fuera empleada, versus los resultados microbiológicos.

TABLA 20.
Superficie2 Tradicional - Superficie

		SUPERFICIE2 TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO SUPERFICIE	NEGATIVO	40	0	40
		66,67 %	0,00 %	66,67 %
	POSITIVO	0	20	20
		0,00 %	33,33 %	33,33 %
	TODO	40	20	60
		66,67 %	33,33 %	100,00 %
KAPPA	1			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

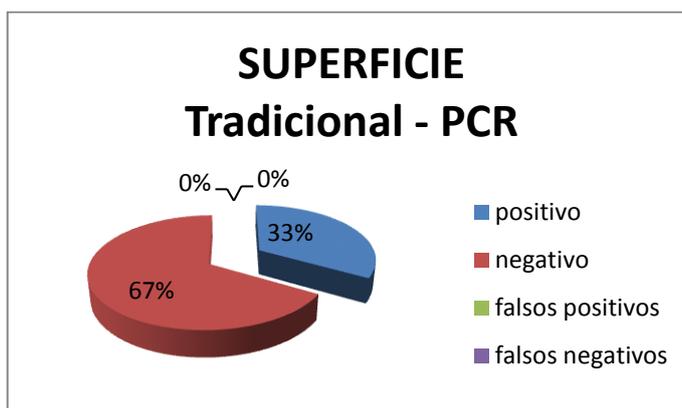


Figura 4. 5. Comparación de las muestras de superficie analizadas por el método tradicional y PCR con ambos iniciadores. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

La matriz “Superficies Inertes” no presentó ningún problema ni desviación en los análisis y diagnósticos realizados, su concordancia es perfecta.

TABLA 21.
Embutido2 Tradicional - Embutido

		EMBUTIDO2 TRADICIONAL		
		NEGATIVO	POSITIVO	TODO
TODO EMBUTIDO	NEGATIVO	40	5	45
		66,67 %	8,33 %	75,00 %
	POSITIVO	0	15	15
		0,00 %	25,00 %	25,00 %
	TODO	40	20	60
66,67 %		33,33 %	100,00 %	
KAPPA	0,8			

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

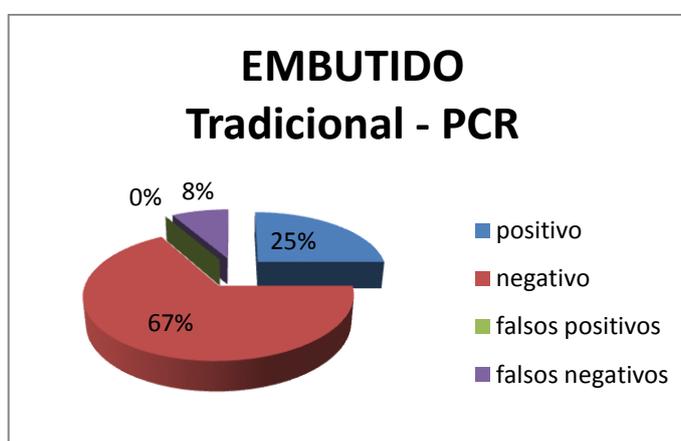


Figura 4. 6. Comparación de las muestras de superficies analizadas por el método tradicional y PCR con ambos iniciadores. **Elaborado por:** Ian Armendáriz – Pierina Barreiro. 2012.

La matriz “Embutido” muestra un índice de concordancia muy bueno pese a presentar un 8% de falsos negativos debido a la inconsistencia metodológica antes mencionada.

Finalmente, la Precisión Relativa, Sensibilidad Relativa y Especificidad Relativa fueron evaluadas para la PCR en comparación al método clásico microbiológico, como se muestra a continuación:

TABLA 22. Parámetros Estadísticos.

AP: Acuerdo Positivos, AN: Acuerdos Negativos, FN: Falsos Negativos, VP: Verdaderos Positivos, FP: Falsos Positivos, PR: Precisión Relativa, SR: Sensibilidad Relativa, ER: Especificidad Relativa, N = PA + FN + FP + VP.

Iniciadores PCR	Nº de Muestras						% Evaluado			k ^e
	N	AP	AN	FN	VP	FP	PR	SR	ER	
139-141	90	27	60	3	0	0	97	90,00	100	0,92
Malo 2F- 2Ra	90	25	60	5	0	0	94	83,33	100	0,86
TOTAL	180	52	120	8	0	0	96	86,67	100	0,89

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

La Tabla 22 muestra un resumen completo de todos los parámetros estadísticos, los cuales demuestran una alta fiabilidad de todos los casos que fueron objeto de estudio.

4.2. Estimación de tiempos y costos

En esta sección se muestra un cálculo estimado de los tiempos empleados en cada uno de los pasos para llevar a cabo los métodos que aquí se comparó, PCR y método tradicional (Tabla 23), basados en todos los reactivos, materiales y equipos que se usó para desarrollar la técnica de PCR; cabe recalcar que no se va a realizar en detalle el bosquejo de los gastos para realizar el método tradicional, porque se va a basar en el precio final que ha establecido los laboratorios ubicados en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), PROTAL.

Es necesario recalcar que para poder implementar un centro que realice este tipo de análisis se necesita de una alta inversión, para la adquisición de equipos y para una adecuación de las diversas áreas del laboratorio. Esto debido a que las herramientas necesarias para el desarrollo de la técnica, como el termociclador y el transiluminador UV con cámara, que son los equipos más representativos en la inversión inicial, presentan un costo considerablemente elevado, al igual que un posible reacondicionamiento de la infraestructura, necesaria para tener un área apta y exclusiva para análisis de PCR, puesto que debe ser un

área exenta de posibles contaminantes de ADN, e incluso de la luz en ciertas etapas.

A continuación se indica una breve recopilación de costos a considerar para el diagnóstico molecular:

TABLA 23.
Costo del análisis de PCR, tomando en cuenta que por cada ensayo o se analizarán 10 muestras.

COSTO DEL ANÁLISIS DE PCR	
MANODE OBRA	\$ 7
EQUIPOS	\$ 5
REACTIVOS	\$ 4
TOTAL	\$ 16

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

Si bien es cierto, al hacer los cálculos de tiempos empleados en los ensayos tanto para PCR como para el método tradicional, no es el tiempo estipulado en las tablas 24 y 25 como TOTAL, y esto se debe a que en el caso de estos procedimientos por ejemplo en el de PCR, si se pone a enriquecer la muestra el día 1 a las 9 am, estará lista para las 9 am del día 2, y de aquí sumado las 7 horas faltantes para terminar el ensayo se cumplen las horas del día laboral, por lo tanto en total serán 2 días.

TABLA 24.
Duración del procedimiento de PCR en días laborables

DURACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PCR	
Pre enriquecimiento	24h
Preparación de muestras para PCR	2h
Análisis de PCR	4h
Electroforesis y observación	1h
TOTAL	2 días

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

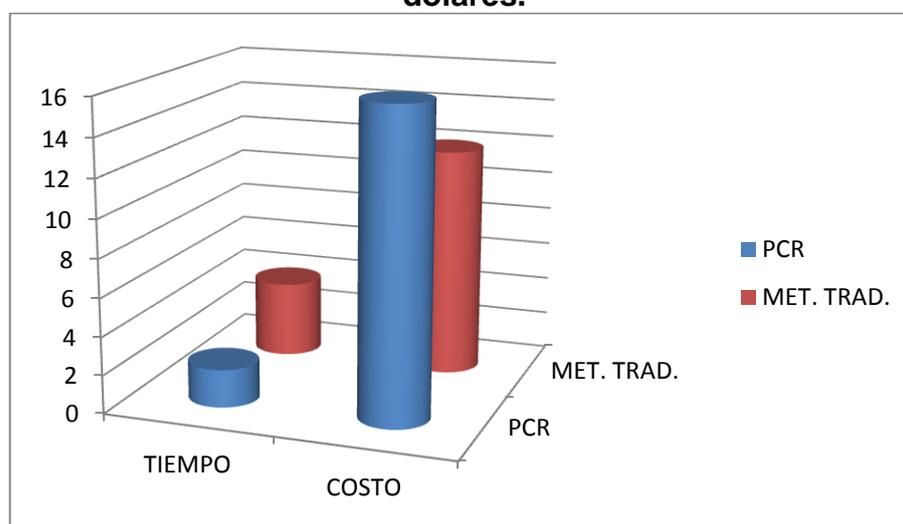
TABLA 25.
Duración del Método Tradicional en días laborables

PROCEDIMIENTO	DURACIÓN
Preparación de muestra y agares	2h
Pre enriquecimiento	24h
Tetracionato	24h - 48h
XLD Agar	24h - 48h
Bismuto Agar	
Hektoen Agar	
TOTAL	4 días

Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

En el caso del análisis de *Salmonella* por el método tradicional, se tomó como referencia el costo de ensayo por muestra que tiene establecido los Laboratorios de PROTAL, como se dijo anteriormente, que es 12 dólares por muestra. Por otro lado, al hacer las experimentaciones, se notó que hacer el análisis de PCR, el tiempo usado en el ensayo se reducía a la mitad, comparado con el método tradicional.

TABLA 26.
Comparación de tiempos y costos de los métodos: tradicional y PCR. Teniendo como resultados en PCR 2 días con un valor de 16 dólares y el método tradicional de 4 días con un valor de 12 dólares.



Elaborado por: Ian Armendáriz - Pierina Barreiro. 2012.

Como se puede observar en la Tabla 26, el método tradicional demora 4 días en su realización mientras que para el método de PCR se necesitan 2 días, por lo que, para la industria es mucho más factible usar este método. Sin embargo, compensando el tiempo que se ahorra al hacer el ensayo de PCR, éste es más costoso debido a los reactivos y los equipos sumamente costosos que se emplean para su ejecución, con un precio de 16 dólares por muestra en contraste con el método tradicional que cuesta 12 dólares por muestra. Cabe recalcar que esto es sólo una estimación de los costos ya que debido a las múltiples variables y a que la tesis no se centra en esto, no se hizo un estudio detallado de los costos.

4.3. Discusión

El presente trabajo es un estudio que busca ser precursor de la detección del gen *invA* en *Salmonella* spp. aislada de muestras de alimentos en el Ecuador, pretendiendo una pronta aplicación de métodos moleculares para detección de patógenos en nuestro medio y el desarrollo de estudios similares.

El consumo de alimentos de carácter masivo y la industria dedicada a la elaboración de los mismos tiene una particular relevancia dentro de la producción y desempeño económico nacional. Según las Cuentas Nacionales, en el 2007 el valor agregado de la industria manufacturera (sin incluir la refinación de petróleo) representó el 13,99% del Producto Interno Bruto (PIB) siendo la industria de alimentos y bebidas la de mayor aporte (7,83% del PIB) (Carrillo, 2009). Este mismo sector productivo muestra un incremento de exportaciones en los 10 últimos años, principalmente hacia Europa y Norteamérica, siendo un notorio inconveniente que, a medida que se ha observado un aumento de volumen en las exportaciones, los productos rechazados por inconformidades en la calidad también se han visto incrementados.

Analizando los reportes y resultados de enfermos de intoxicaciones alimentarias, EDA, fiebre tifoidea y salmonelosis se deduce que siguen siendo un riesgo común en nuestro medio, lo que hace necesario la implementación de programas de control sanitario más efectivos acompañados de programas de vigilancia epidemiológica y una apertura de los servicios de Salud Pública en la determinación de los diagnósticos etiológicos, cuyos datos que se destinen a un sistema de registro estadístico que se pueda emplear como base para una mejora del Sistema de Vigilancia Epidemiológica, a cargo del Ministerio de Salud Pública.

El empleo de técnicas alternativas en la gestión de inocuidad en los alimentos va ganando cada día más adeptos en el área industrial, especialmente aquellas cuyo principal valor agregado es la reducción de tiempo para obtener resultados. Pese a esto son pocos, o incluso nulos, quienes emplean métodos de diagnóstico molecular, como lo es la Reacción en Cadena de Polimerasa en la industria de alimentos en el Ecuador. Esto puede deberse a muchos factores, listando entre ellos la falta de conocimiento del método y la ausencia de estudios realizados localmente que avalen la utilización de la técnica de PCR en nuestro medio y así obtener una herramienta de diagnóstico

caracterizada por su rapidez, versatilidad de automatización, reproducibilidad y confianza.

En el presente estudio se realizó la amplificación del gen *invA*, uno de los genes descritos en todas las cepas invasivas de *Salmonella* (Galán, 1991) con dos pares de cebadores, replicando satisfactoriamente los resultados que brinda la PCR, tales como especificidad y capacidad para procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo en comparación a métodos tradicionales, como ya han sido descrito en una gran cantidad de estudios similares previos (Chen *et al.*, 1997; Malorny, 2004; Di Pinto *et al.*, 2007).

Estadísticamente, se encontró un muy buen acuerdo entre los dos métodos mediante el empleo del índice de kappa, demostrando que tanto el método microbiológico como el molecular pueden ser usados en el análisis de *Salmonella* spp. en este tipo de muestras, dejando abierta la posibilidad de la adopción de la metodología no convencional si lo amerita, luego de haber evaluado una serie de aspectos como el costo operacional, inversión inicial (de ser necesaria), la urgencia en la obtención de resultados para liberación de lotes que desencadena en un menor costo de almacenamiento y un mayor tiempo de vida en percha del vendedor final, si fuese el caso.

Luego de pruebas realizadas y su respectivo análisis, se ha observado la técnica de PCR es una prueba muy sensible, esta sensibilidad varía dependiendo del tipo de alimento analizado, del métodos de preenriquecimiento aplicados y del método, de un trabajo adecuado del analista y también del método y la fuente de extracción del ADN. Lo importante es que este estudio es válido para las matrices evaluadas, si se quisiese aplicar lo descrito en este estudio en otro tipo de muestra es necesario un estudio previo de las limitantes posibles y llevar a cabo una prueba piloto del examen, adecuando la técnica a cada tipo de alimento. Así mismo, si fuese necesaria la detección de otras bacterias invasivas tales como *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasiva y demás, se deberá elegir los cebadores adecuados ya que la ausencia de la secuencia del gen *invA* en otro género de patógenos dejaría el procedimiento descrito sin validez.

Existen algunas limitaciones para la reproducibilidad de este estudio que deben considerarse si se quisiese aplicar el método en otros laboratorios. Se ha descrito que los resultados pueden variar de acuerdo al termociclador que se emplee, ya sea por marca o incluso entre modelos de la misma marca (Reynisson, 2006), por lo que es necesario ajustar el programa de temperaturas y componentes de la PCR antes de establecer una metodología.

Un problema que se repite en muestras de alimentos es la presencia de inhibidores, en este trabajo se experimentó problemas con el análisis de muestras que contenían derivados de cacao, este inconveniente ya ha sido declarado por varios autores (Di Pinto *et al.*, 2007; Rowlyk, 2010). Esto puede solucionarse mediante varios métodos, en el presente trabajo se ha elegido una centrifugación del caldo de preenriquecimiento que contenía la muestra y tomando el sobrenadante para realizar el análisis, obteniendo resultados positivos. Así mismo, el crecimiento del microorganismo objetivo podría verse inhibido por la flora acompañante, dando un resultado negativo por el método tradicional, o bien, la sensibilidad del ensayo de PCR podría ser disminuida. Por esto, es importante seleccionar un medio de enriquecimiento adecuado para inhibir la flora de fondo y establecer un tiempo de incubación adecuado, ya que la sensibilidad de la PCR tiende a aumentar con el incremento del tiempo de enriquecimiento (Guo *et al.*, 2000).

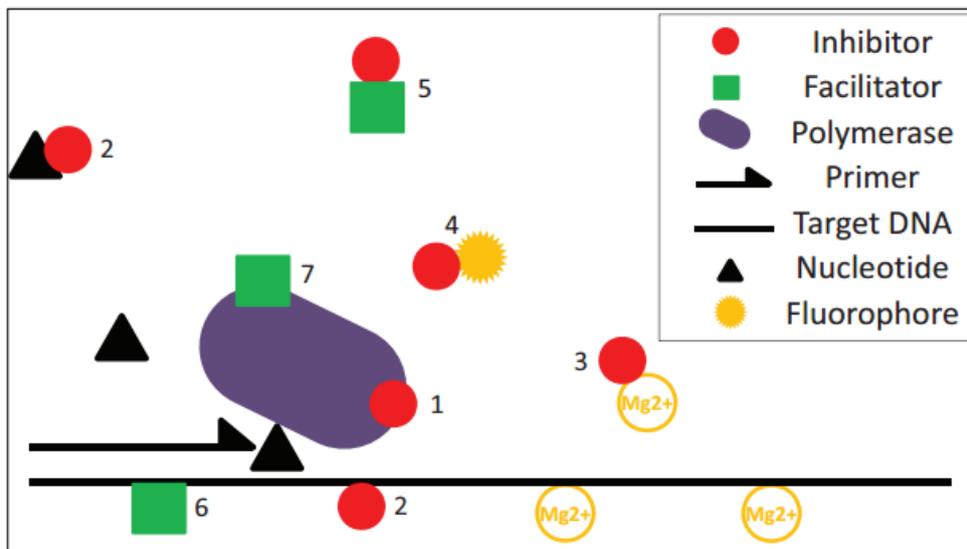


Figura 4. 7. La complejidad de la inhibición de la PCR. Un solo compuesto inhibidor de la PCR puede afectar a la reacción de varias formas, y diferentes inhibidores pueden tener efectos diferentes. Los inhibidores pueden (1) unirse o degradar la ADN polimerasa, (2) unirse a nucleótidos, cebadores o la plantilla de ADN, (3) quelar cationes (4) prevenir la liberación de la fluorescencia de los tintes de detección. Algunos facilitadores de la PCR pueden contrarrestar la inhibición por (5) que sirve como un objetivo para los inhibidores o se unen a los inhibidores, (6) la estabilización de ADN de cadena simple (7) la mejora de la actividad de la ADN polimerasa. **Fuente:** Hedman, 2011.

En resumen, los resultados son promisorios para la implementación del diagnóstico molecular PCR como una interesante alternativa para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos, por su especificidad, rapidez y fiabilidad.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se estandarizó la técnica molecular de PCR para la detección del gen *invA*, característico de la *Salmonella* spp. en muestras de cereales, embutidos y superficies inertes, las cuales son matrices comunes en la industria alimentaria del Ecuador.
2. Se demostró que el método tradicional y la técnica de PCR no difieren significativamente entre ellos mediante el estudio estadístico de la experimentación, donde se evaluó la concordancia entre los resultados obtenidos por el método tradicional (microbiológico) y el método alternativo (PCR), llegando a establecer un índice kappa de 0.89, el cual equivale a una concordancia muy buena. Así mismo, el análisis estadístico determinó la precisión, sensibilidad y especificidad

entre los métodos comparados, obteniendo valores de 96, 86.67 y 100, respectivamente.

3. El uso de los iniciadores empleados (Malo2F/Malo2R y 139/141) no influye significativamente a la respuesta del análisis de detección de *Salmonella* spp. en las muestras. Además se verificó que estos iniciadores amplifican específicamente el gen de invasividad *invA*, presente en la gran mayoría de serotipos de *Salmonella* y ausente en el resto de bacterias.

4. Se identificó una restricción en el diagnóstico molecular de las muestras que contenían chocolate, lo que hizo necesario realizar una extracción del material genético de la muestra para su análisis mediante la técnica de PCR.

5. El tiempo de detección molecular es menor que el microbiológico. El método tradicional demandó alrededor de 96 horas, que es el doble del tiempo que tomó el análisis por la técnica de la PCR (48 horas) para la obtención de resultados, siendo el factor tiempo el mayor beneficio del protocolo propuesto.

6. Económicamente, el costo operativo de la PCR es mayor al ensayo microbiológico. Se estima que es menor el valor monetario de un análisis microbiológico que el de un diagnóstico molecular, ya sea por costo de análisis por muestra o por costo de la inversión inicial.
7. Es necesario realizar un estudio previo a la matriz, si no se tiene un historial de la misma. En caso de sospechar la presencia de un inhibidor, se recomienda realizar un tratamiento de extracción de ADN que preceda a la PCR, evitando así un posible error en los resultados.
8. Se recomienda hacer un estudio de sensibilidad de detección de la técnica de PCR para establecer el límite mínimo en que se pueda identificar la presencia de *Salmonella spp.* en muestras de alimentos.
9. Sería recomendable efectuar más estudios que promuevan el desarrollo de técnicas alternativas y modernas aplicables en la industria de producción de alimentos, puesto que el desarrollo biotecnológico cada día propone nuevos métodos, con diversos beneficios, que deben ser tomados en cuenta para todos los que forman parte del sector industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- **Luna, G.** 1991. Manual Operativo de Análisis Microbiológicos Para Alimentos. Primera Edición. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá – Colombia.
- **Collazo, C. M. & Galán, J. E.** 1997. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. *Gene* 192, 51–59.
- **Pascual, M. y Calderón, V.** 2000. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Segunda Edición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid – España.
- **Hurtado, F.** 2001. Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola. Ingeniero de Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Tesis de Pregrado. Guayaquil – Ecuador.
- **Rahn et al.** 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* 6, 271-279.

- **Malorny et al.** 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl environ Microbiol* 70, 7046-7052.
- **Merck, E.** 1994. *Manual de Medios de Cultivo*. Darmstadt-Alemania.
- **Palumbo, S. y Alford, J.** 1970. Inhibitory action of tetrathionate enrichment broth. *Applied Microbiology*. 20, 970-976.
- **Van Schothorst, M.; Renaud, A. y Van Beek, C.** 2004. *Salmonella* insolation using RVS both and MLCB agar. *Food microbiology*. 4 (1): 11-18.
- **Bonnie, E.** 2001. Insolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry and egg products. In: *Microbiology laboratory guidebook*. 3rd edition. Food Safety and Inspection Service. Department of Agriculture. Washington D.C. – EEUU.
- **Stanchi, O.** 2007. *Microbiología Veterinaria*. Primera Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires – República Argentina.
- **ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDS).** 2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* 4th edition. ISO 6579:2002.

- **Meljem, J.** 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación para la determinación de *Salmonella* en Alimentos. (en línea) <<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>> (Consulta: 7 mayo de 2012).
- **Dusch, H. y Altwegg, M.** 1993. Comparison of Rambach agar, SM-ID medium and Hektoen enteric agar for primary isolation of non-typhi salmonella from stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:410-412.
- **Becton Dickinson.** XLT4 – AGAR BASE. [En línea] <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/XLT4_Agar_Base.pdf-101.9KB> (Consulta: 2 marzo de 2012).
- **Murray, P. y Shea, Y.** 2004. *Pocket Guide to Clinical Microbiology*. 3rd edition. ASM Press. Washington, DC.
- **King, S. y Metzger, W.J.** 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. *Applied Microbiology*. 16:557-578.

- **Taylor, W.I. y Schelhart, D.** 1971. Insolation of Shigella, comparison of xylose lysine, deoxycholate agar, Hektoen enteric agar *Salmonella*- Shigella agar and Eosine Methylene Blue agar with stool specimens. *Applied Microbiology*. 21:32-37.
- **Gaillot, O.; Di Camillo, P.; Berche, P.; Courcol, R. y Savage, C.** 1999. Comparison of CHROMagar *Salmonella* Medium and Hektoen Enteric Agar for Isolation of *Salmonella* from Stool Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 762 – 765.
- **Carrillo, D.** 2009. La industria de los alimentos y bebidas en el Ecuador. [En línea]. <http://www.uasb.edu.ec/UserFiles/381/File/ALIMENTOS.pdf>
- **Galán, J. y Curtiss, R.** 1991. Distribution of the invA, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: invA mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 59:2901–8.
- **Guo, X.; Chen, J.; Beuchat, L. y Brackett, R.** 2000. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from hilA. *Appl Environ Microbiol* 66:5248–52.

- **Di Pinto, A.; Forte, V.; Guastadisegni, M. G.; MArtino, C.; Schena, F. y Tantillo, B.** 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, 18, 76-81.
- **Fricke, C. R.** (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *J Appl Bacteriol* 63, 99–116.
- **Taylor, J. y Mccoy, J. H.** (1969). *Salmonella* and Arizona infection In *Food-borne Infections and Intoxications*, pp. 3–72. Edited by H. Riemann. New York: Academic Press.
- **Jay, J. M.** (2000). Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and Shigella In *Modern Food Microbiology*, 6th edn, pp. 511–528.
- **Van der Zee, H. y Huis in't Veld, J. H. J.** (2000). Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In *Salmonella in Domestic Animals*, pp. 373–391. Edited by C. Wray & A. Wray. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- **Almeida, C.** 2002. Sistemas modernos de inspección y control de alimentos. Memorias, Simposio Internacional Salud Publica Veterinaria, Protección Sanitaria y Desarrollo Agropecuario, ICA/FAO, Bogotá, Colombia, p. 315.

- **Gálvez, E.** 2006. Calidad e inocuidad en las cadenas latinoamericanas de comercialización de alimentos. FAO (Fecha de acceso: 15 de agosto de 2007) 14: 1-93. Disponible en: <http://www.fao.org/Ag/ags/subjects/es/agmarket/agsfop14.pdf>
- **Schneider, A.; Gronewald, C.; Fandke, M.; Kurth, B.; Barkowsk, S. Y Berghof-Jager, K.** 2002. Real-time detection of the genus with the LightCycler System. Biochemica; 4:19-21. [En línea] [http:// www.molecular-food-safety-testing.com](http://www.molecular-food-safety-testing.com)
- **Rodríguez, I. y Barrera, H.** 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Revista Ciencia UNAL; 7:323-35.
- **Fica, C.; Alexandre, M.; Prat, S.; Fernández, A.; Fernández J.; y Heitmann, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de la salmonellosis en Chile. Desde *Salmonella* thypi a *Salmonella* enteritidis. Rev Chil Infect 18 (2): 85-93.
- **Candrian, U.** 1995 Polymerase chain reaction in food microbiology. J Microbiol Metho, 23: 89

- **RASFF**. 2010. Informe anual Del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos RASFF. Comunidad Europea.
- **OMS**; Typhoid Fever. WHO Fact Sheet N149. March 1997; [En línea] <http://www.who-int/inffs/en/fact149.html>
- **Landis, J. y Koch, G.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*; 33: 159-174.
- **Reynisson E., Josefsen M., Krause M., Hoorfar J.** 2006. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 66:206-216.
- **Chen, S.; Yee, M.; Griffith, C.; Larkin, C.; y Yamashiro, R.** 1997. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int J Food Microbiol*; 35:239-50.
- **López, G. y Pita, S.** 1999. Medidas de Concordancia: El índice de kappa. *Cad Aten Primaria*; 6: 169-171.

ANEXO A

DETALLE DE LA ESTIMACIÓN DE TIEMPOS Y COSTOS

ESTIMACIÓN DE TIEMPOS			
PROCEDIMIENTO	DURACIOÓN	PROCEDIMIENTO	DURACIOÓN
Pre enriquecimiento	24h	Pre enriquecimiento	24h
Tetrationato	24h - 48h	Preparación de muestras para PCR	2h
XLD Agar		Análisis de PCR	4h
Bismuto Agar	24 - 48h	Electroforesis y observación	1h
Hektoen Agar		TOTAL	2 días
TOTAL	4 días		

ESTIMACIÓN DE COSTOS PARA EL ANÁLISIS DE PCR

		X	HORA (X1)	DOS DIAS
EQUIPOS	Termociclador	50000	2.170138889	3.472222222
	cubeta de electroforesis	445	0.019314236	0.030902778
	Alimentador	481 X/10años/12meses/24días/8h	0.020876736	0.033402778
	cabina para pcr	1741	0.075564236	0.120902778
	TRANSILUMINADOR UV	18000	0.78125	1.25
TOTAL del costo por muestra asumiendo que se analizan mínimo 10 muestras por corrida				4.907430556

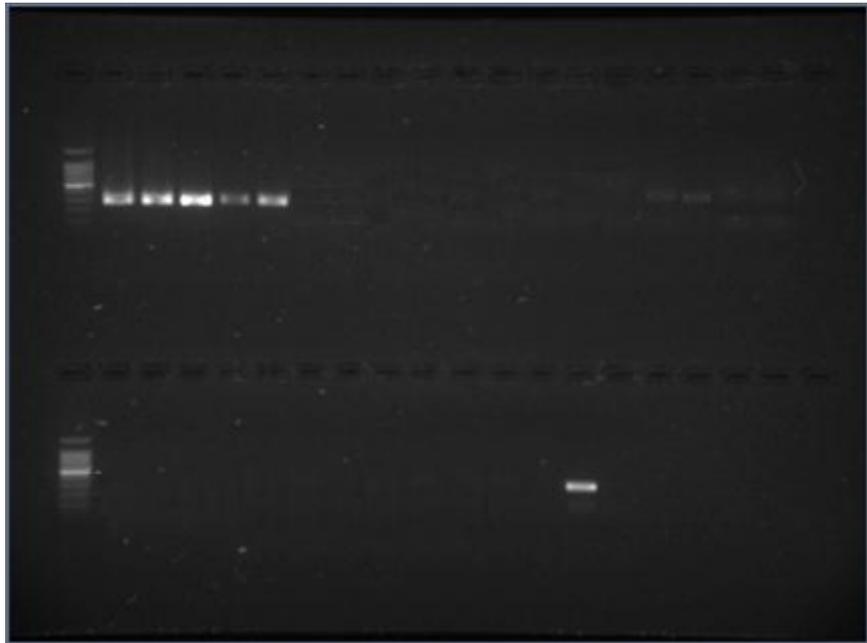
MANO DE OBRA	800	X/24días/8h	4.166666667	X1*16 horas/10 muestras por corrida	6.666666667
---------------------	------------	--------------------	--------------------	--	--------------------

MANODE OBRA	6.666666667
EQUIPOS	4.907430556
REACTIVOS	4
PRECIO POR MUESTRA	15.57409722

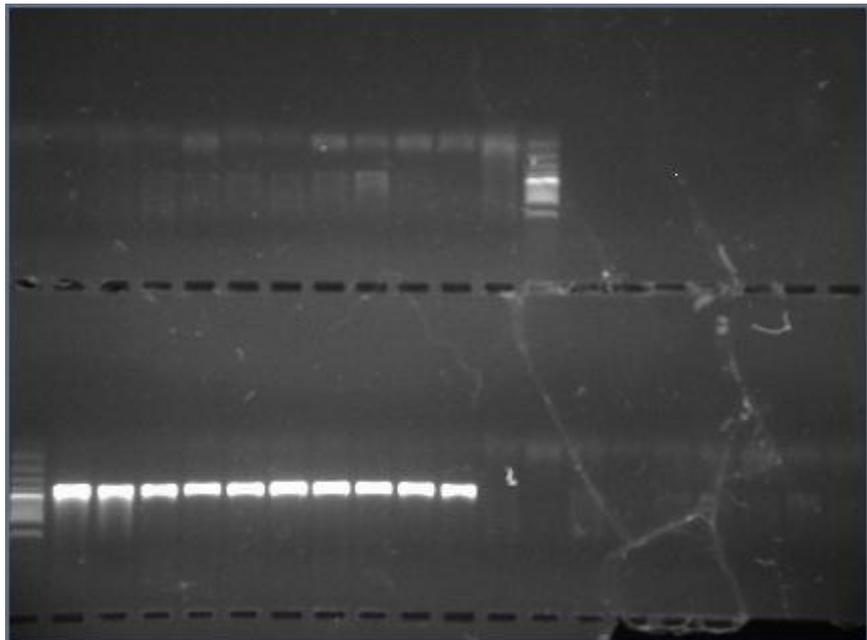
ANEXO B

RESULTADOS DE LAS MUESTRAS MOLECULARES: EMBUTIDO

INICIADOR: MALORNY



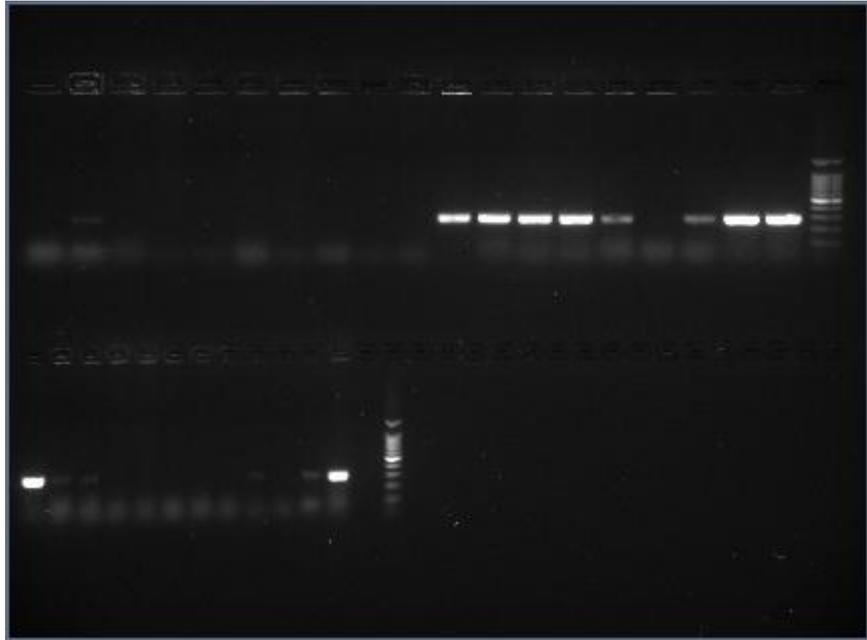
INICIADOR: 139



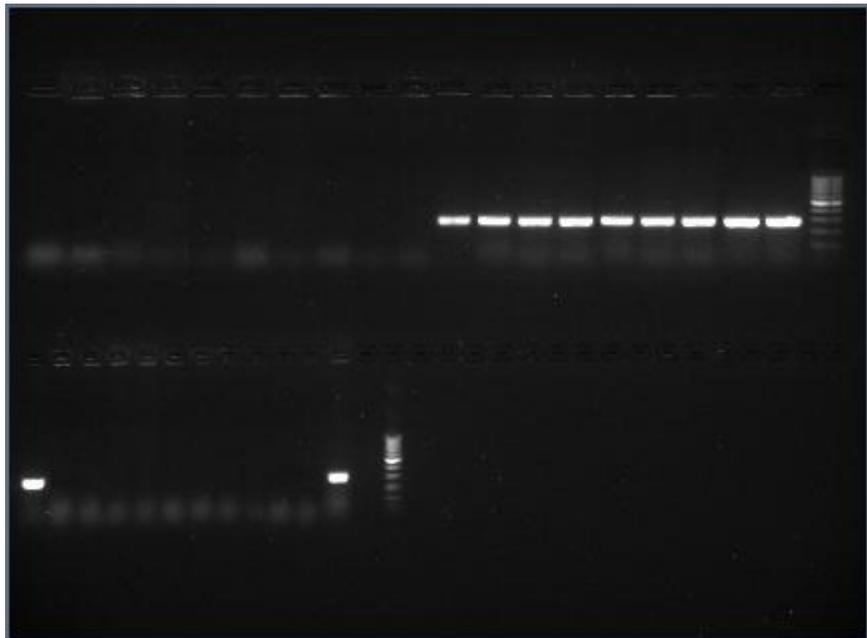
ANEXO C

RESULTADOS DE LAS MUESTRAS MOLECULARES: CEREAL

INICIADOR: MALORNY



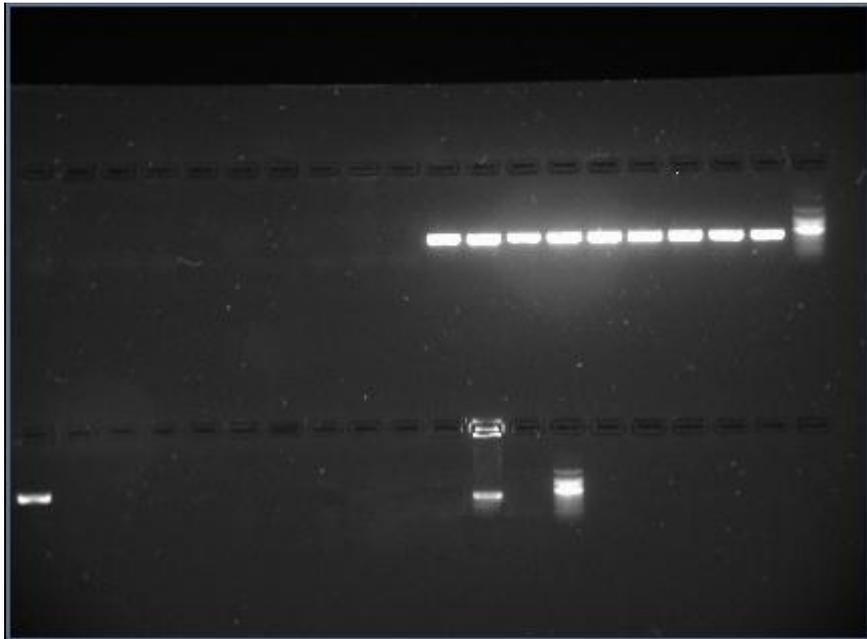
INICIADOR: 139



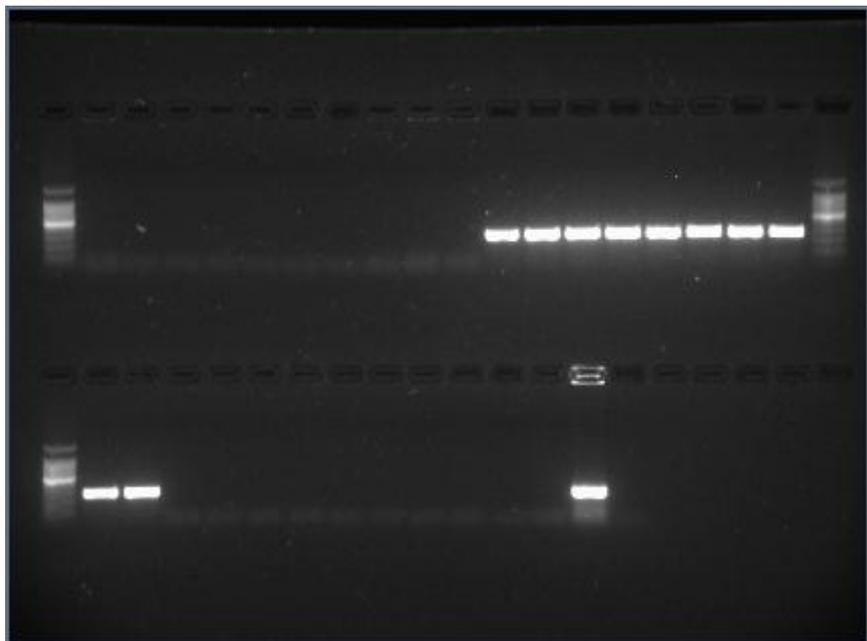
ANEXO D

RESULTADOS DE LAS MUESTRAS MOLECULARES: SUPERFICIE

INICIADOR: MALORNY C



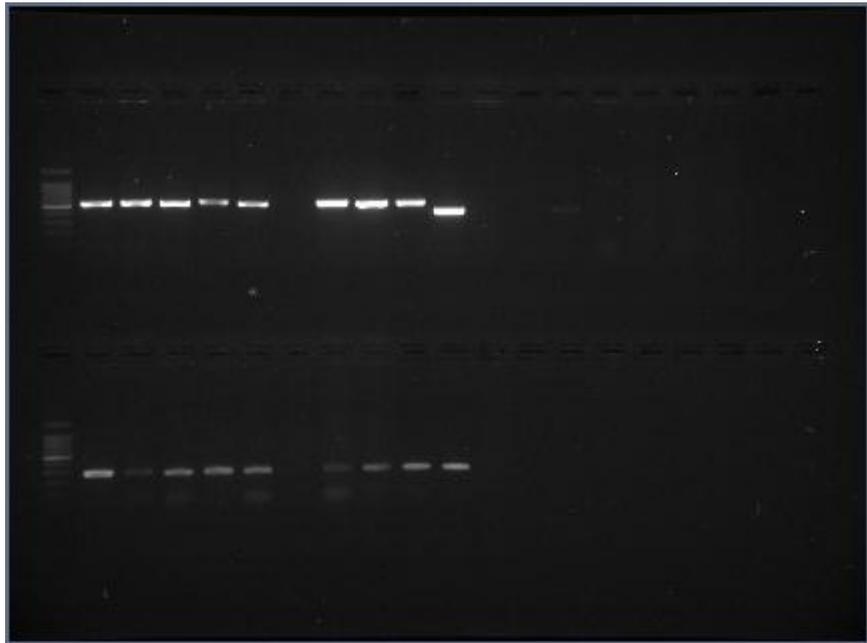
INICIADOR: 139



ANEXO E

RESULTADOS DE LAS MUESTRAS MOLECULARES CON CHOCOLATE MEDIANTE EXTRACCIÓN DE ADN: EMBUTIDOS

INICIADORES 27F/518R. Publicado por Andersson, *et al.* 2008.



ANEXO F

CERTIFICADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN LOS LABORATORIOS DE PROTAL



Escuela Superior Politécnica del Litoral
Laboratorio PROTAL-ESPOL



Datos del cliente

Nombre: Ian Fabricio Armendáriz Toral	Teléfono: 099092517
Dirección: Samanes 5 Mz. 933 v. 26	

Identificación de la muestra

Nombre: Superficies inertes	Código muestra: X1 a X10, E1 a E10, S1 a S10.
Marca comercial: N/A	Lote: N/A
Tipo de alimento: Superficie inerte	Fecha elaboración: N/A
Conservación: Ambiente.	Fecha expiración: N/A
Fecha recepción: 22/febrero/2012	Fecha análisis: 22/febrero/2012
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5°C ± 2.5°C y Humedad Relativa 55% ± 15%	

Análisis Microbiológicos

Ensayos Realizados	Código Muestra	Unidad	Resultado	Requisitos	Método/Referencia
Salmonella spp. *	X1	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X2	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X3	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X4	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X5	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X6	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X7	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X8	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X9	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	X10	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E1	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E2	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E3	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E4	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E5	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E6	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E7	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E8	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E9	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	E10	Aus. /Pres.	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S1	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S2	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S3	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S4	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S5	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S6	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S7	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S8	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S9	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *
Salmonella spp. *	S10	Aus. /Pres.	Presencia	Presencia	AOAC 967.26 *

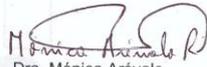
• Observaciones:

* Parámetro No Acreditado

Los datos microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno de Aseguramiento de Calidad del laboratorio de Microbiología.

Guayaquil, 02 de abril del 2012


Dra. Gloria Bajana de Pacheco
Directora General y Gerente Técnico


Dra. Mónica Arévalo
Jefa de Microbiología

www.laboratorioprotal.espol.edu.ec

Campus "Gustavo Galindo II", Km. 30.5 vía Perimetral, contiguo a la Uda. Santa Cecilia
Teléfonos: 042 - 269223 / 729 / 739 * Telefax: 042 - 269233
laborprotal@espol.edu.ec



Escuela Superior Politécnica del Litoral
Acreditado Sistema ISO 17025
Laboratorio PROTAL - ESPOL



Datos del cliente

Nombre: Ian Fabricio Amendáriz Toral	Teléfono: 099092517
Dirección: Samanes 5 Mz. 933 v. 26	

Identificación de la muestra

Nombre: Embutidos varios.	Código muestra: X1 a X10, E1 a E10, S1 a S10.
Marca comercial: N/A	Lote: N/A
Tipo de alimento: Alimentos cárnicos.	Fecha elaboración: N/A
Conservación: Refrigeración 0°C - 4°C.	Fecha expiración: N/A
Fecha recepción: 13/marzo/2012	Fecha análisis: 13/marzo/2012
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5°C ± 2.5°C y Humedad Relativa 55% ± 15%	

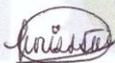
Análisis Microbiológicos

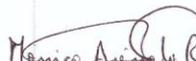
Ensayos Realizados	Código Muestra	Unidad	Resultado	Requisitos	Método/Referencia
Salmonella spp.	X1	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X2	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X3	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X4	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X5	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X6	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X7	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X8	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X9	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X10	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E1	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E2	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E3	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E4	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E5	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E6	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E7	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E8	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E9	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E10	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S1	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S2	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S3	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S4	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S5	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S6	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S7	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S8	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S9	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S10	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Ausencia	AOAC 967.26

Observaciones:

Los datos microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno de Aseguramiento de Calidad del laboratorio de Microbiología.

Guayaquil, 02 de abril del 2012


Dra. Glorina Bajaña de Pacheco
Directora General y Gerente Técnico


Dra. Mónica Arévalo
Jefa de Microbiología

www.laboratorioprotal.espol.edu.ec

Campus "Gustavo Galindo U.", Km 30.5 a la Perimetral, contiguo a la Cdlra. Santa Cecilia
Teléfonos: 042 - 269723 / 725 / 739 • Telefax: 042 - 269733
laboratorioprotal.espol.edu.ec



Escuela Superior Politécnica del Litoral
Acreditado Sistema ISO 17025
Laboratorio PROTAL - ESPOL



Datos del cliente

Nombre: Ian Fabricio Armendáriz Toral	Teléfono: 099092517
Dirección: Samanes 5 Mz. 933 v. 26	

Identificación de la muestra

Nombre: Cereales varios	Código muestra: X1 a X10, E1 a E10, S1 a S10
Marca comercial: N/A	Lote: N/A
Tipo de alimento: Cereal	Fecha elaboración: N/A
Conservación: Ambiente.	Fecha expiración: N/A
Fecha recepción: 07/marzo/2012	Fecha análisis: 07/marzo/2012
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5°C ± 2.5°C y Humedad Relativa 55% ± 15%	

Análisis Microbiológicos

Ensayos Realizados	Código Muestra	Unidad	Resultado	Requisitos	Método/Referencia
Salmonella spp.	X1	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X2	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X3	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X4	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X5	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X6	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X7	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X8	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X9	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	X10	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E1	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E2	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E3	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E4	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E5	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E6	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E7	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E8	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E9	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	E10	Aus. /Pres. / 25g	Ausencia	Ausencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S1	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S2	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S3	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S4	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S5	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S6	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S7	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S8	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S9	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26
Salmonella spp.	S10	Aus. /Pres. / 25g	Presencia	Presencia	AOAC 967.26

• Observaciones:

Los datos microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno de Aseguramiento de Calidad del laboratorio de Microbiología.

Guayaquil, 02 de abril del 2012

Dra. Gloria Bajaña de Pacheco
Directora General y Gerente Técnico

Dra. Mónica Arévalo
Jefa de Microbiología

www.laboratorioprotal.espol.edu.ec

Campus "Estación balnearia II", Km 30.9 vía Perimetral, cantón a la Caba, Santa Cecilia
Teléfonos: 042 - 263223 / 229 / 235 * Telefax: 042 - 263233
labprotal@espol.edu.ec