UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

DETERMINACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano EN MUESTRAS DE ALIMENTOS DE LOS ESTABLECIMIENTOS ADYACENTES A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA QUITO, SECTOR EL GIRÓN.

AUTORA:

ANDREA ESTEFANÍA ECHEVERRÍA TORRES

DIRECTOR:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, diciembre del 2014

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE GRADO

Yo, autorizó a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaró que los conceptos desarrollados, análisis realizados y conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, diciembre del 2014

_____

Andrea Estefanía Echeverría Torres

1722690813

DEDICATORIA

Le agradezco a Dios por ser el guía y la fuerza que necesito día a día, gracias a sus bendiciones me ha permitido alcanzar mis mayores logros.

A mis padres que con todo su cariño y amor lograron darme todo en la vida para que yo pudiera cumplir mis sueños, a su vez por motivarme en cada momento para alcanzar mis más grandes anhelos, a ellos por siempre mi corazón y mis más sinceros agradecimientos.

A mis mejores amigos por ser mis compañeros de lucha, que con sus consejos y enseñanzas han convertido los momentos en inolvidables lecciones de alegría en mi vida.

A mi tutora MSc. Viviana Chiluisa Utreras por toda su paciencia y comprensión ayudándome paso a paso en mi formación como una persona de bien preparándome en cada reto presentado durante este camino.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana, por formar profesionales capaces.

A MSc. Viviana Chiluisa Utreras por darme la oportunidad de ser parte de su proyecto, y por su ayuda prestada durante la investigación y entrega de sus conocimientos académicos.

A la Ingeniera Ivonne Vaca y al Ingeniero Daniel Acurio por su ayuda en parte estadística que contribuyeron a la finalización de este trabajo de grado.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), por facilitarme tanto las instalaciones como sus equipos.

A todos, gracias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 1 3

ANTECEDENTES 3

CAPÍTULO 2 7

MARCO TEÓRICO 7

2.1. Género *Salmonella* 7

2.1.1. Taxonomía y nomenclatura 8

2.1.2. Acción patógena 9

2.1.3. Epidemiología: 11

2.1.3.1. Fuentes de infección y transmisión: 13

2.2. Contaminación de los alimentos 15

2.3. Cronómetro evolutivo ADNr 16S bacteriano 16

2.4. Métodos alternativos de detección de *Salmonella* y ADNr 16S bacteriano 17

2.4.1. Detección de *Salmonella* en alimentos: 17

2.4.2. Detección del ADNr 16S bacteriano en alimentos 17

2.5. Métodos moleculares 18

2.5.1. PCR 19

2.5.1.1. Aspectos básicos de la PCR 19

2.5.1.2. La Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) 20

2.5.1.2.1. Etapas del PCR: 22

2.5.1.3. PCR en tiempo real 26

2.5.1.3.1. Optimización de la PCR en tiempo real 31

2.6. Tendencia actual del uso de la PCR en tiempo real 31

2.6.1. Aplicaciones de la PCR en tiempo real. 32
CAPÍTULO 3 34
MARCO METODOLÓGICO 34
3.1. Localización y tamaño de muestra: 34
3.1.2. Selección, obtención, y preparación de las muestras 34
3.1.3. Extracción de ácidos nucleicos 36
3.1.4. Aplicación de la técnica de PCR en tiempo real. 38
3.1.4.1. Curva estándar: 38
3.1.5. Diseño experimental: 38
3.1.6. Análisis estadístico 39
CAPÍTULO 4 41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41
4.1. Resultados mediante PCR –RT de ADNr 16S bacteriano 41
4.1.1. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno ..41
4.1.2. Curva estándar obtenida para la cuantificación de ADNr 16s Bacteriano en la muestra de alimento 42
4.1.3. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de ADNr 16S bacteriano en las muestras de alimento 43
4.1.4. Amplificación de ADN 16S Bacteriano: fluorescencia vs ciclos 45
4.2. Resultados mediante PCR –RT de *Salmonella* sp. 46
4.2.1. Análisis inicial en el alimento 46
4.2.2. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno ..47
4.2.3. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de *Salmonella* sp. en la muestra de alimento 48
4.2.4. Amplificación de *Salmonella* sp: fluorescencia vs ciclos 50
CONCLUSIONES: 53

RECOMENDACIONES: 55

LISTA DE REFERENCIAS 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los establecimientos por el alimento con sus respectivas concentraciones promedio de casos positivos de ADNr 16S bacteriano ug/ml.....43

Tabla 2. Distribución de los establecimientos por el alimento con sus respectivas concentraciones promedio de *Salmonella* sp. en ug/ml 48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista al microscopio de un Bacilo Gran negativo 7
Figura 2. Alimentos implícitos en brotes de *Salmonella* en Latinoamérica, año 2008...12
Figura 3 Estructura química de un nucleótido formado por las bases nitrogenadas.....20
Figura 4.Tiempo vs. Temperatura en la que se muestran las 3 etapas de un ciclo PCR..21
Figura 5.Desdoblamiento inicial de la doble hélice de la molécula de ADN a la que se añaden el Primer y la Taq polimerasa 23
Figura 6. Los Primers inician la serie de enlaces químicos en cada una de las hebras únicas formadas en la primera etapa. 23
Figura 7. Copiado total de las dos hebras de la molécula de ADN.....24
Figura 8. Fases de una curva de amplificación de qRT-PCR 28
Figura 9. Curvas de amplificación (positiva y negativas) en una PCR a tiempo real.....30
Figura 10. Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos 37
Figura 11. Fórmula para determinar datos que poseen medianas similares o no.....40
Figura 12. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno ...41
Figura 13. Curva estándar obtenida para la cuantificación de ADNr 16S bacteriano en la muestra de alimento 42
Figura 14. Curvas de amplificación de ADN 16S bacteriano: fluorescencia vs ciclos....45
Figura 15. Curva estándar obtenida para la cuantificación de *Salmonella* sp. en la muestra de alimento 47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Materiales y reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos.....61
Anexo 2. Muestras de ADNr de 16S bacteriano y ADN de Salmonella sp. 61
Anexo 3. Kit de Preparación de muestras de alta pureza para PCR 62
Anexo 4. Diluciones seriadas de ADN de una cepa certificada (control interno) 62
Anexo 5. Master Mix Salmonella sp. (Master Plus Hybpobe) 63
Anexo 6. Master Mix ADNr 16S bacteriano (Master Plus Sbyr Green) 63
Anexo 7. Capilares de 20 µl.....63
Anexo 8. PCR en tiempo real.....64
Anexo 9. Ensamblaje de los capilares en el equipo 64
Anexo 10. Termobloque.....65
Anexo 11. Aire acondicionado.....65
Anexo 12. Termociclador.....66
Anexo 13. Cámara de flujo laminar 66

RESUMEN

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares como es el caso de la PCR en Tiempo Real, que es una técnica estándar que se emplea para la cuantificación tanto de ADN como de mRNA en una muestra a analizar mediante la identificación de la expresión genética y de secuencias específicas. Esta técnica brinda una gran cantidad de datos con una alta sensibilidad y rapidez, usando plataformas modernas que evitan la contaminación que puede ser causada en laboratorio por ácidos nucleícos. Mediante el uso de esta técnica se ha logrado detectar microorganismos patógenos alimentarios de manera inmediata como es la *Salmonella* sp., que en cantidades mínimas es capaz de provocar enfermedades gastroentéricas resultando peligroso para la salud del consumidor.

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar mediante PCR en Tiempo Real la presencia o ausencia de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano, en muestras de alimento de comida rápida adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana. Se investigaron varios establecimientos y las muestras se analizaron por triplicado (muestra, con un control positivo, un control negativo) para posteriormente realizar los análisis estadísticos pertinentes. Como resultado de los análisis realizados se detectó en el 100% de las muestras la presencia de ADNr 16S bacteriano mediante Kruskall-Wallis se mostró significancia estadística; mientras, que de *Salmonella* sp. tan solo el 6,7% de casos analizados fueron positivos, Kruskall-Wallis reveló que no existe diferencia significativa. Mediante la curva estándar se logró cuantificar la cantidad de ADN en cada muestra.

Palabras clave: Salmonella sp., ADNr 16S bacteriano, PCR en Tiempo Real, alimento

ABSTRACT

Progress in biotechnology has allowed the development of molecular techniques such as Real Time PCR, which is a standard technique used for quantification of both DNA and mRNA in a test sample by identifying the gene and expression of specific sequences. This technique provides a large amount of data with high sensitivity and speed using modern platforms that prevent pollution that can be caused by nucleic acids in the laboratory. Using this technique it has been possible to detect food immediately pathogens as *Salmonella* sp. in small amounts can cause gastroenteric diseases resulting dangerous to the health of consumers.

The present study was performed in order to determine by Real-Time PCR the presence or absence of *Salmonella* spp. and 16S rDNA in samples of food fast food adjacent to the Universidad Politécnica Salesiana. Were analyzed several establishments and each of the samples were analyzed in triplicate to make a proper statistical analysis. As a result of the analysis performed was detected in 100% of samples for the presence of 16S rDNA bacterial by Kruskal-Wallis showed a statistical significance, while Salmonella sp. only 6,7% of cases analyzed were positive, Kruskal-Wallis revealed that no significant difference. Using the standard curve was achieved quantify the amount of DNA in each sample.

Keywords: Salmonella sp., 16S rDNA, PCR RealTime, food

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el género *Salmonella* sp. representa uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial, causante de enfermedades gastroentéricas en humanos y en animales. Una de las principales fuentes de contagio con bacterias patógenas es el consumo de alimentos contaminados, entre los que se pueden mencionar productos cárnicos, avícolas, productos lácteos, huevos y vegetales. Se ha demostrado que los alimentos se contaminan durante su procesamiento o, por el empleo de materia prima contaminada pues el género *Salmonella* constituye gran parte de la flora normal de las aves, cerdo y ganado (Jiménez, Muñoz, & Delgado, 2010).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos continúan siendo una gran amenaza a la salud pública en todo el mundo, y son una causa importante de mortalidad. Aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos, tales como la diarrea y vómitos; en algunas ocasiones las enfermedades por alimentos pueden resultar mucho más severas y peligrosas para la vida del consumidor, especialmente en niños.

En el Ecuador, las enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETAs) están entre las diez primeras enfermedades de notificación obligatoria, siendo la salmonelosis una de las más importantes causas de brotes (MSP, 2009). En el Ecuador, en el año 1990 se reportaron 9.908 casos de salmonelosis; en el 2001 esta cifra aumentó bruscamente a 18.772, periodo desde el cual el número ha ido disminuyendo paulatinamente con 3286 casos en el 2012 (MSP/EPI 2, 2012).

En la ciudad de Quito, entre enero del 2011 y mayo del 2012 se notificaron 1034 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, de estos el 62% pertenecen al género *Salmonella* manifestándose en barrios como son el Centro Histórico, Guamaní, San

Bartolomé de las Casas, La Tola-Vicentina, La Libertad y Cotocollao (Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012).

Para evaluar las infecciones transmitidas por alimentos, se utilizan métodos microbiológicos clásicos que requieren en general de un pre enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos y la confirmación posterior usando pruebas basadas en la morfología y bioquímica propias de cada uno de los microorganismos objetos de estudio. Por lo tanto, estos métodos resultan laboriosos y requieren un largo proceso para obtener resultados definitivos. Para solucionar estos inconvenientes se han desarrollado diversas metodologías alternativas para la detección, identificación y cuantificación de microorganismos patógenos de origen alimentario entre las que se destaca la técnica molecular de la PCR en Tiempo Real.

La presente investigación muestra la utilidad y ventajas que presenta la PCR en Tiempo Real como una herramienta para la detección e identificación de bacterias patógenas en muestra de alimentos, así como las nuevas tendencias en el uso de estas herramientas moleculares de diagnóstico, proporcionando una estrategia rápida y sensible para la detección de patógenos disminuyendo el tiempo requerido para la obtención de los resultados.

Para ello se cumplieron las siguientes etapas: 1) Elección de una diana genética de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano, 2) Aplicación de la PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano en muestras de alimentos 3) Validación de los resultados de la PCR en Tiempo Real de la detección de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1.JUSTIFICACIÓN

La comercialización de alimentos en la vía pública es un fenómeno de gran impacto social, cultural, económico y sanitario. En nuestro país, esta actividad es muy común en las ciudades principales, ya que ofrecen ciertas ventajas como: fácil acceso, bajo costo, variedad de alimentos y rapidez en su servicio (Albo, Apraiz, & Bedin, 2011); lo cual los convierte en la alternativa que más se adapta al ritmo de vida de los habitantes. Los consumidores habituales de este tipo de alimentos, son jóvenes en su mayoría en edad estudiantil, quienes han adoptado esta clase de alimentos como parte de su dieta diaria o frecuente; el reducido espacio de los establecimientos donde se comercializan y el difícil acceso a servicios como agua y energía, pueden convertirse en un factor de incumplimiento de las normativas sanitarias de inocuidad en los alimentos y manejo de los mismos, que llegarían a desencadenar un vector de contaminación por microorganismos patógenos.

La naturaleza de los alimentos expendidos en la vía pública son en su gran mayoría denominados “comida rápida”, los cuales están elaborados principalmente a base de pan, carne de res, huevos, papas, queso y embutidos, la mayoría de ellos expuestos a contaminación física tanto en su almacenamiento, transporte y manipulación, como también en la preparación del alimento final (Yánez, Máttar, & Durango, 2008). La presencia de microorganismos está reglamentada por los organismos de salud de cada país; cuando alguno de ellos, principalmente patógeno supera las cantidades indicadas por la norma sanitaria, se convierte en un potencial transmisor de enfermedades producidas por alimentos significando así, un riesgo para la salud de los consumidores (Lupien & Flores, 2002).

Las especies *Samonella enterica y Salmonella tiphymurium* son parte de los 14 patógenos principales transmitidos por alimentos; sus principales fuentes como carnes, lácteos y huevos, la convierten en uno de los géneros de microorganismos patógenos más comunes en alimentos de comida rápida siendo la causa predominante del desarrollo de la Salmonelosis, enfermedad infecto-contagiosa que se distingue en 3 tipos principales: Fiebre tifoidea, gastroenteritis y septicemia (Jiménez, Muñoz, & Delgado, 2010).

En el 2011, se reportaron en la provincia de Pichincha 805 casos de salmonelosis transmitidos por alimentos (Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012) en las zonas marginales y rurales, los niños y ancianos enfrentan el 50% de riesgo de adquirir esta enfermedad debido a las condiciones de vida, el poco acceso a servicios básicos y principalmente a la dificultad de acceder a un diagnóstico clínico para prevenir el desarrollo de la enfermedad (Rodríguez, 2011, pág. 38).

El desarrollo de técnicas moleculares de detección y diagnóstico, ha permitido la determinación de ácidos nucleicos y secuencias específicas de material genético de organismos de interés; por lo que los resultados obtenidos mediante las mismas son más específicos, sensibles y rápidos que los métodos tradicionalmente empleados (Chiluisa Utreras, 2006). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, se basa en la amplificación *in vitro* de ADN con la ventaja de llevar a cabo, a partir de un mismo vial, la detección y cuantificación del ADN de interés, junto con un análisis de los factores relacionados al sistema de amplificación por PCR.

La aplicación de estas herramientas moleculares, tanto para la identificación de patógenos como para la cuantificación de su material genético, sentará las bases para posteriores proyectos de investigación relacionados con el tema. El aporte de este estudio sobre las condiciones de inocuidad de los alimentos y el ambiente sanitario de

los establecimientos en que se expenden, podrá contribuir con el mejoramiento de la calidad de vida de los consumidores y la regularización de los procesos de control de los organismos de salud.

El planteamiento de este tema de tesis es el primero en desarrollarse en la Universidad Politécnica Salesiana por lo que, sentará las bases para la estandarización y establecimiento de las herramientas moleculares para posteriores temas de investigación.

1.2.Objetivos

1.2.1. General:

- Determinar mediante PCR en tiempo real *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano en alimentos de los establecimientos adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, sector EL Girón.

1.2.2. Específicos:

1. Obtener muestras de alimentos en 10 establecimientos para la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización del kit de purificación.

2. Establecer una curva estándar de la concentración inicial de ácidos nucleicos tanto para *Salmonella* como para ADNr 16S bacteriano, con la finalidad de determinar la concentración del ADN presente en las muestras.

3. Cuantificar las concentraciones de ADN presente en los extractos mediante la técnica de PCR en Tiempo Real y establecer un proceso estándar.

1.3.HIPÓTESIS

1.3.1. Nula:

Los establecimientos de alimentos adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, no presentan bacterias determinadas mediante PCR en Tiempo Real.

1.3.2. Alternativa:

Al menos uno de los establecimientos de alimentos adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, presentan bacterias determinadas mediante PCR en Tiempo Real.

1.4.VARIABLES E INDICADORES

1.4.1. Variables dependientes:

- Concentración (ug/ml) de *Salmonella* sp. : Es la medición de la cantidad de ADN extraído en correlación con la curva estándar a partir de diluciones seriadas de una cepa certificada mediante PCR en Tiempo Real.

- Concentración (ug/ml) de ADNr 16S bacteriano: Es la medición de la cantidad de ADN extraído en correlación con la curva estándar a partir de diluciones seriadas de una cepa certificada de una bacteria conocida mediante PCR en Tiempo Real.

1.4.2. Variables independientes:

- Muestras de alimentos de los 10 establecimientos.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

*2.1.*Género *Salmonella*

Morfología de *Salmonella* sp.

Figura 1. Vista al microscopio de un Bacilo Gran negativo
Fuente: Foodpoisonjournal, 2006

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y su hábitat principal es el tracto intestinal del hombre y los animales. Los miembros de este género se destacan por su gran capacidad de adaptación, lo que les permite infectar a un amplio rango de hospedadores. En general son bacterias móviles por medio de flagelos, aunque existen variantes aflageladas. Las bacterias de este género pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el ambiente asociados a substratos orgánicos, creciendo óptimamente a 37°C y catabolizando la glucosa y otros carbohidratos como el manitol, la maltosa y el sorbitol, con producción de ácido y gas. Son oxidasa negativas y catalasas positivas, producen H_2S, descarboxilan la lisina y la ornitina, y no hidrolizan la urea ni fermentan la lactosa. Además pueden utilizar el citrato como única fuente de

carbono, se inactivan a un pH inferior a 5 y a temperaturas superiores a 60ºC (Shelobolina ES et al., 2004).

El género *Salmonella* recibió su nombre en homenaje al anatomopátologo Salmon, que fue el primero en aislar *Salmonella cholerasuis* del intestino del cerdo (Shelobolina ES et al., 2004).

2.1.1. Taxonomía y nomenclatura

La clasificación de la especie *Salmonella* ha sido un asunto polémico durante varios años. Sin embargo, la taxonomía de este género se ha establecido sobre una base científica y el Centro Colaborador de la OMS, para referencia de Investigaciones sobre Salmonelosis.

La taxonomía y nomenclatura de *Salmonella* es muy compleja y han sido objeto de numerosos cambios desde que Salmon describiera por primera vez este microorganismo en 1885. Se han utilizado muchos sistemas de clasificación diferentes que han dividido el género en especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos. Según este sistema el género *Salmonella* contiene dos especies: *Salmonella enterica y Salmonella bongori*. La primera está dividida a su vez en seis subespecies, de las cuales *S. enterica* subespecie *enterica*, es la más importante desde el punto de vista sanitario. Las subespecies de *Salmonella* se clasifican en serotipos o serovariedades según las características de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). En la actualidad se reconocen más de 2500 serotipos distribuidos entre las especies y subespecies de *Salmonella* (Shelobolina ES et al., 2004).

Así pues, en la actualidad, *Salmonella enterica* agrupa a la mayoría de las bacterias del género que se aíslan de animales de sangre caliente, incluido el hombre, y se divide en

seis subespecies (o subgrupos fenotípicamente distintos) designadas con números romanos o con un nombre: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e indica (VI) (Le Minor & Popoff, 1987; Brenner et al., 2000; Grimont & Weill, 2007).

Los serotipos de *Salmonella* pueden ser clasificados en grupos desde un punto de vista epidemiológico según estén más o menos adaptados a una especie hospedadora (Kingsley & Bäumler, 2000). Así, existen serovariedades adaptadas estrictamente a un hospedador específico (por ejemplo, *S. Typhi* únicamente asociada a infecciones en el hombre o *S. gallinarum* en aves), serovariedades adaptadas a un hospedador específico pero que en algunos casos pueden aislarse en otros hospedadores (por ejemplo, *S. cholerasuis* que se ha asociado a procesos sistémicos graves en cerdos y en el hombre) y serovariedades no adaptadas a hospedadores específicos (por ejemplo, *S. typhimurium* que se aísla de una gran variedad de animales y del ambiente) (Uzzau et al., 2000). Estos últimos, son los que con más frecuencia originan brotes de salmonelosis en el hombre, asociados al consumo de productos contaminados, principalmente huevos y carne.

2.1.2. Acción patógena

Es un patógeno asociado a enfermedades que afectan a un amplio rango de vertebrados; algunos de ellos son patógenos estrictos de humanos (*Salmonella typhi*) y otros afectan principalmente a animales (*Salmonella gallinarum)*, sin embargo la mayoría de los serotipos no están adaptados a un huésped específico. Generalmente la infección se adquiere por la ingesta de agua o alimentos contaminados, tras lo cual se pueden dar tres posibilidades: la eliminación del microorganismo, la aparición del estado portador asintomático, o el desarrollo de la enfermedad con algunas manifestaciones clínicas entre las más comunes se pueden distinguir las siguientes: Gastroenteritis, Fiebre entérica y Septicemia (D´Aoust JY, 2007).

- Gastroenteritis o enterocolitis:

Es considerada como una de las manifestaciones clínicas más habituales en los países desarrollados, la cual se produce por el consumo de alimentos contaminados y suele estar asociada por todos los serotipos de *Salmonella* a excepción de los que producen fiebre entérica. Los síntomas aparecen de 8 a 72 horas después del contacto con el patógeno, caracterizándose por la aparición de nauseas y vómitos, seguidos de cefaleas, dolor abdominal y deposiciones diarreicas en mayor o menor grado, siendo también común la aparición de fiebre (D´Aoust JY, 2007).

La enfermedad suele ser autolimitada, pero puede ser más grave en grupos especialmente sensibles como niños, ancianos o personas inmunocomprometidas, por lo que la presencia de *Salmonella* en un alimento en la cantidad que sea, se considera siempre un peligro grave para la salud de las personas que consumen estos alimentos (D´Aoust JY, 2007; Hohmann EL, 2001).

- Fiebre entérica:

Está producida por los serotipos *Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B y Paratyphi C*. La fiebre entérica producida por *Salmonella typh*i se denomina fiebre tifoidea y la producida por los otros serotipos fiebre paratifoidea. La transmisión se produce por vía fecal-oral y el hombre es el único reservorio. Las manifestaciones clínicas aparecen después de un periodo de incubación que varía entre 7 y 28 días, pudiendo aparecer diarrea o estreñimiento, fiebre prolongada, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento (D´Aoust JY, 2007).

- Septicemia con infección local o sin ella:

La septicemia causada por *Salmonella* puede ser ocasionada por cualquiera de las bacterias de este género que se encuentran en los alimentos y el agua contaminados. La infección es sistémica y afecta prácticamente a todos los sistemas orgánicos. El síntoma más común es fiebre intermitente. En las personas con el VIH, la septicemia recurrente causada por *Salmonella* es una afección característica del SIDA, acompañado en algunos casos con cuadros clínicos muy graves como meningitis, neumonías o artritis aséptica como la artritis reactiva o el síndrome de Reiter (Smith JL, 1994).

Las infecciones humanas con cepas no tifoideas también pueden degenerar en infecciones sistémicas y producir diversas enfermedades crónicas. En estos casos, las salmonelas son capaces de atravesar la pared intestinal y producir una bacteriemia, apareciendo en algunos casos cuadros clínicos muy graves como meningitis, neumonías o artritis aséptica como la artritis reactiva o el síndrome de Reiter (Smith JL, 1994).

2.1.3. Epidemiología:

Salmonella es una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas en la mayoría de los países, tanto por la aparición de casos aislados como por brotes epidémicos. Los casos reportados en Ecuador en los últimos años de salmonelosis fueron 8402, fiebre tifoidea 6829, intoxicaciones alimentarias 7095 casos, constituyendo en las zonas marginales del país el 50% de riesgo de adquirir salmonelosis, afectando tanto a niños como ancianos siendo los más sensibles al contagio por esta bacteria (Rodríguez, 2011).

En nuestro país esta enfermedad ocupa el tercer lugar en las consultas médicas, especialmente de niños mayores de 2 años, en las áreas urbano-marginales y rurales, las

condiciones de insalubridad en la preparación de los alimentos y la escasez de agua potable aumenta el riesgo de contagio; otra característica de la infección por *Salmonella* es su marcada variación estacional, ya que se manifiesta con mayor incidencia en los meses de verano (Rodríguez, 2011). Los brotes epidémicos de Salmonelosis en países en vías de desarrollo pueden asociarse con tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, sobre todo cuando son provocados por cepas resistentes a los antibióticos.

Algunas investigaciones orientadas a la detección de *Salmonella* en comidas expendidas en la vía pública realizadas en países latinoamericanos han determinado una incidencia de *Salmonella* sp. importantes (Rodríguez, 2011), en varios tipos de alimentos como lo muestra a continuación la siguiente figura:

***Salmonella* en Latinoamérica**

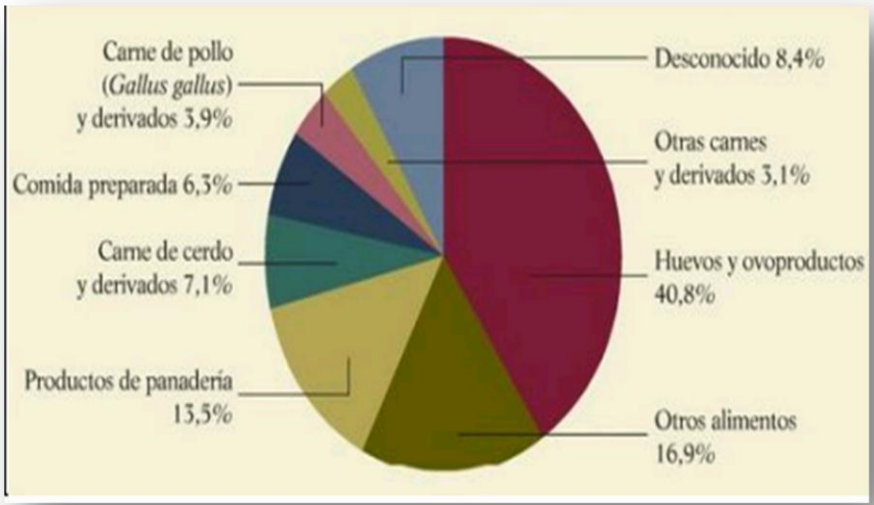


Figura 2. Alimentos implícitos en brotes de *Salmonella* en Latinoamérica, año 2008
Fuente: EFSA, 2010

El género *Salmonella* casi siempre ingresan por vía oral. Principalmente por los alimentos o bebidas contaminadas. La dosis inefectiva promedio está entre 10^5 y 10^8 microorganismos. Estas invaden las células epiteliales por un proceso denominado endocitosis mediada por bacterias. La endotoxina de la pared, que es compartida con la

mayoría de las enterobacterias, produce necrosis focal en el sitio en que se encuentra colonizando la bacteria. La producción de endotoxinas por algunas cepas se manifiesta por cuadros diarreicos (D´Aoust JY, 2007).

2.1.3.1. Fuentes de infección y transmisión:

Las bacterias de este género están muy adaptadas a diferentes ambientes, por lo tanto, la manera de llegar hasta el humano pude ser muy variada. Los alimentos son el principal vehículo por el que *Salmonella* causa infección en los humanos. Los productos implicados en los casos de salmonelosis son principalmente: carnes crudas de vacunos, cerdo y aves y alimentos que contengan huevo. La contaminación de la carne puede ocurrir durante la vida del animal o después de su sacrificio. Otros alimentos como agua, vegetales, frutas, cereales, zumos, especias, entre otros, pueden ser también causantes de la infección aunque en menor grado (D´Aoust JY, 2007).

Por lo general, la transmisión a través de agua requiere la ingestión de una menor cantidad de microorganismos y en consecuencia se asocia con un tiempo de incubación más prolongado y una tasa de ataque menor que la infección transmitida por los alimentos.

La Salmonelosis es una infección por fases: la puerta de entrada es por la vía digestiva donde el bacilo debe sobrepasar la barrera defensiva, representada por la acidez gástrica antes de adherirse e invadir las células del epitelio intestinal y penetrar por medio de ciertos genes de virulencia en su interior, donde se multiplica y produce alteraciones histopatologías.

Puede afectar a cualquier persona y se presenta con una frecuencia similar en ambos sexos, mientras que varía en los diferentes grupos de edad. Los niños menores de 5 años

tienen la mayor incidencia de salmonelosis, mientras que en las personas mayores de 65 años y en las personas inmunocomprometidas la incidencia también es alta (Shelobolina ES et al., 2004).

Su distribución es mundial, así *S. typhimurium* es uno de los serotipos mas prevalentes en el mundo, pero últimamente *S. enterica* la ha desplazado siendo el causante de toxiinfecciones alimentarias en países desarrollados y uno de los más frecuentes en países en desarrollo (D´Aoust JY, 2007).

Todos los alimentos pueden contaminarse con materia fecal humana o animal en algún momento de la producción. La carencia de medidas de intervención tendientes a mitigar el riesgo de contaminación de materias primas, alimentos parcialmente elaborados y producto final, transforman el riesgo potencial en un verdadero problema para la salud pública.

Los productos y subproductos cárnicos, leche cruda, huevos, productos que contienen huevos y vegetales, otros alimentos perecederos y aquellos que requieren manipulación, se asocian con mayor frecuencia a brotes de ETA por *Salmonella* sp. Por lo tanto, es muy importante realizar la vigilancia integral de toda la cadena de producción de alimentos, desde la producción primaria hasta el consumidor.

Los diferentes aspectos del control microbiológico de la producción de alimentos combinado con un sistema de HACCP es un modo de asegurar la calidad durante el proceso de elaboración de los alimentos. La detección, aislamiento y caracterización de *Salmonella* sp. en materia prima, ambiente, producto terminado, como también en las distintas etapas de elaboración es una forma de verificar la inocuidad de los alimentos que se producen.

2.2. Contaminación de los alimentos

La calidad de los alimentos es un factor de vital importancia para el desarrollo del ser humano, es por ello que el comer es una actividad básica para el hombre, la selección y el planeamiento de los alimentos se ven influidas por la historia, la cultura y el ambiente; además, de la disponibilidad y las preferencias personales. De este modo, la comida expendida y preparada en condiciones sanitarias, asociada a una correcta nutrición, resulta un factor esencial para la salud (Schinitman, 2005, pág.50).

En general la producción de alimentos libres de contaminantes no sólo depende del lugar de su producción sino también de los procesos de elaboración y de las personas que tienen contacto con ellos. La contaminación de los mismos puede producirse en cualquier momento desde su recolección, pasando por la elaboración a nivel industrial, hasta cuando se prepara la comida en el hogar (Ortiz y col., 2008).

Con frecuencia, la contaminación bacteriana de los alimentos es la principal causa de problemas de salud en relación con el consumo de alimentos. Las consecuencias de una contaminación bacteriana de alimentos más comunes incluyen gastroenteritis, diarreas, molestias gastrointestinales, entre otros. Por orden de importancia, las salmonelosis son la principal causa de problemas alimentarios, seguidas por los trastornos provocados por los estafilococos y los clostridios.

Debido a la importancia en la Salud Pública de las toxiinfecciones alimentarias, la labor del microbiólogo de alimentos se dirige, en muchos casos, al control destinado a evitar el consumo de productos elaborados en condiciones deficientes y que, por tanto, sean potencialmente peligrosos.

Los microorganismos presentes en los alimentos son muy preocupantes para la Salud Pública a escala mundial; actualmente se reconoce que más de 200 enfermedades son causadas por alimentos, donde los microorganismos comúnmente involucrados han sido *Salmonella* sp., *Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes y Staphylococus aureus*. La mayoría de las bacterias causantes de ETA's normalmente se destruyen por los procesos normales de cocción, aquellos alimentos mal cocidos o almacenados en condiciones inapropiadas, pueden originar casos de diarreas, colitis, gastroenteritis aguda, además de causar complicaciones a largo plazo como artritis reactiva (debida a *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*). Estas bacterias patógenas, se caracterizan por causar alta morbilidad en la población en general; no obstante, son los niños, ancianos, mujeres embarazadas y pacientes inmunocomprometidos quienes constituyen la población más susceptible, pudiendo sufrir consecuencias graves y hasta fatales (Arenas y col., 2009).

2.3. Cronómetro evolutivo ADNr 16S bacteriano

Los ácidos nucleicos y las proteínas son macromoléculas comunes en todos los seres vivos los cuales se encuentran cambiando con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva (Zuckerkandl & Pauling, 2007, pág. 100).

El ADNr 16S bacteriano es una herramienta ampliamente utilizada como un marcador housekeeping que se encuentra presente en todas las bacterias; se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y, actúa como un marcador eficiente de evolución debido a que tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis, a más de ser fácil de aislar y caracterizar (Clarridge, 2004, pág. 130).

Su aplicación como cronómetro evolutivo fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970, el ADNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias,

proporciona información rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas, que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ADNr 16S se fundamenta en su secuencia siendo comparable con otros organismos (Clarridge, 2004).

2.4. Métodos alternativos de detección de *Salmonella* y ADNr 16S bacteriano

2.4.1. Detección de *Salmonella* en alimentos:

En la actualidad existen numerosas metodologías para el aislamiento y caracterización de *Salmonella* sp. a partir de alimentos, entre las que se pueden citar las metodologías tradicionales que se encuentran basadas en pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, obtención de colonias aisladas y puras en medios de cultivo y caracterización de las colonias a través de pruebas bioquímicas y serológicas (Wilhelm,2003, pág. 1120).

Sin embargo, estas técnicas tradicionales de cultivo que aunque no demandan infraestructuras especialmente caras y los consumibles son baratos, estos resultan ser largos y laboriosos retrasando el tiempo de obtención de resultados, por lo que en los últimos años el interés ha recaído en métodos más rápidos, sensibles y específicos que resulten ser más eficientes debido a la sensibilidad que este representa al momento de detectar en el alimento *Salmonella* sp., a estos se les conoce como "métodos alternativos" los cuales facilitan una temprana detección de este bacteria en los alimentos en menor tiempo (Wilhelm,2003, pág. 1121).

2.4.2. Detección del ADNr 16S bacteriano en alimentos

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y distintas especies

bacterianas, constituyendo el análisis de ADNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa.

El análisis de la secuencia del ADNr 16S bacteriano constituye una herramienta muy útil en el estudio de la diversidad bacteriana en muestras clínicas, ambientales y de alimentos; debido a que resultan un método rápido y eficaz de caracterización bacteriana mediante el uso de técnicas moleculares que requieren de menos recursos y tiempo para su detección a diferencia del método tradicional (Clarridge, 2004, pág. 138).

La detección de ADNr 16S bacteriano va a depender de: (a) tipo de alimento, (b) método aplicado: con o sin pre enriquecimiento del alimento, (c) método de extracción del ADN, y (d) momento de extracción del ADN. Este método de detección mediante PCR en Tiempo Real adecuándola a cada tipo de alimento puede llegar a ser un método definitivo de identificación bacteriana, alcanzando un alto nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez en los resultados (Clarridge, 2004, pág. 138).

2.5. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares, son los métodos de laboratorio utilizados para llevar a cabo el estudio de la estructura y el funcionamiento de los genes a nivel molecular. Estas técnicas basan sus estudios en la detección de una secuencia específica de ADN o ARN. Los métodos más utilizados a nivel molecular son el Southern Blot, PCR, FISH, Secuenciación para ADN, el Northern Blot, RT- PCR y Microarray para ARN (Wilhelm,2003).

La RT- PCR o reacción en cadena de la polimersa es una de las técnicas que ha revolucionado la Biología Molecular y que ha impulsado enormemente el avance de la

investigación de la Biotecnología moderna. Esta técnica ha sido utilizada en Biotecnología Vegetal para el diágnostico de distintos patógenos (Fitopatología), el estudio de la evolución y desarrrollo de las especies (Filogenia) y el diagnóstico cualitativo de una secuencia determinada ADN (Caracterización génica), además de permitir la detección cuantitativa de genes (Expresión genética) (Jan y LeBorgne, 2001).

En los métodos moleculares son esenciales tanto la selección de una secuencia de ADN que sea específica, así como unas adecuadas condiciones de amplificación, éstas han permitido identificar nuevos microorganismos los cuales no habían sido posibles detectar por técnicas tradicionales (Jan y LeBorgne, 2001). Además; permiten estudiar las poblaciones microbianas sin realizar aislamientos evitando problemas de contaminación (Chan y col., 2002). La validación de estas técnicas depende de la alta calidad del ácido nucleico utilizado. Por lo que la extracción del ácido nucleico constituye el primer parámetro en optimizarse para un diagnóstico molecular exitoso.

2.5.1. PCR

2.5.1.1.Aspectos básicos de la PCR

En 1953 Watson y Crick, utilizando como base los estudios de equimolecularidad de Erwin Chargaff, deducen la estructura del ADN y proponen el modelo de la doble hélice tridimensional. Este último hecho dio la pauta para nuevos descubrimientos que conducirían a lo que se llama Tecnología del ADN recombinante, según el modelo de Watson y Crick, la molécula de ADN está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos con polaridad opuesta, unidas entre sí formando una doble hélice.

Adicionalmente, se sabe que las polimerasas son enzimas capaces de separar y sintetizar ADN "*in vitro*". La Taq polimerasa, es la enzima más utilizada por ser termoestable, es

obtenida a partir de un organismo conocido como *Thermophilus aquaticus*, una bacteria que vive en zonas cálidas.

La mayoría de las polimerasas necesitan un pequeño iniciador (cebador de extensión o "Primer"), complementario al ADN molde para iniciar la polimerización a partir de ese punto. El apareamiento de bases, es el proceso cuando los nucleótidos se enlazan de modo encadenado para formar los ácidos nucleicos (Mullis KB y Faloona FA, 2006). La Adenina (A) se complementa con la Timina (T) y la Guanina (G) se complementa con la Citosina (C). Esta combinación de pares de bases es mencionada como A-T y G-C; se muestra de forma gráfica en la siguiente figura:

Estructura química de las bases nitrogenadas

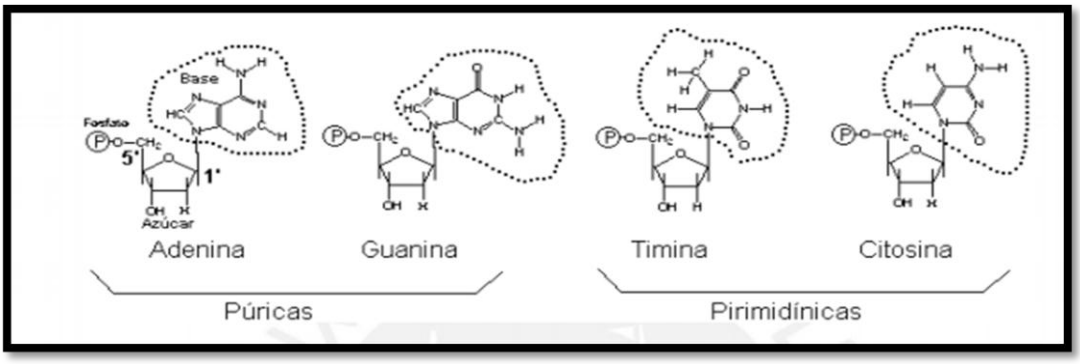


Figura 3 Estructura química de un nucleótido formado por las bases nitrogenadas
Fuente: Mullis KB y Faloona FA, 2006

2.5.1.2. La Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

A mediados del siglo XX aun conociendo la estructura de Watson y Francis Crick sobre el ADN se enfrentaba la dificultad de no poder realizar ninguna manipulación o análisis de ADN, porque se contaba siempre con una cantidad reducida de estas moléculas que no permitían ser detectadas, ni trabajadas aún con los instrumentos más modernos. No fue hasta 1983 cuando el Dr. Kary Mullis de la corporación CETUS logró concebir un proceso por el cual se podían producir millones de copias de una molécula de ADN

específica; éste es el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), trabajo por el cual ganó el Premio Nobel en el año 1993 (Mullis KB y Faloona FA, 2006). Este proceso se inicia mediante un desdoblamiento de la molécula de ADN a alta temperatura, usualmente menor a los 98ºC y mayor a los 88ºC, llamado desnaturalización, así como las reacciones de hibridación y extensión a temperaturas menores, muy precisas para garantizar que la molécula no se degenere y permita su replicación para su posterior secuenciación (Hanna SE et al., 2005).

Este esquema de temperaturas se grafica en la figura 4 a continuación y corresponde al patrón general de la PCR. El esquema con tres temperaturas corresponde a un ciclo, este ciclo se repite tantas veces sea necesario para obtener la multiplicación deseada -miles de millones de copias de cadenas de ADN- programándose generalmente más de 15 ciclos hasta finalizar el proceso.

El termociclador controla el número de los ciclos, la exactitud a la que se producen las etapas y la cantidad de tiempo en el que se mantiene la reacción a las diferentes temperaturas. Hoy en día no hay laboratorio de Biología Molecular, que no use la técnica de PCR (Mullis KB y Faloona FA, 2006, pág. 335).

Etapas de un ciclo de la PCR

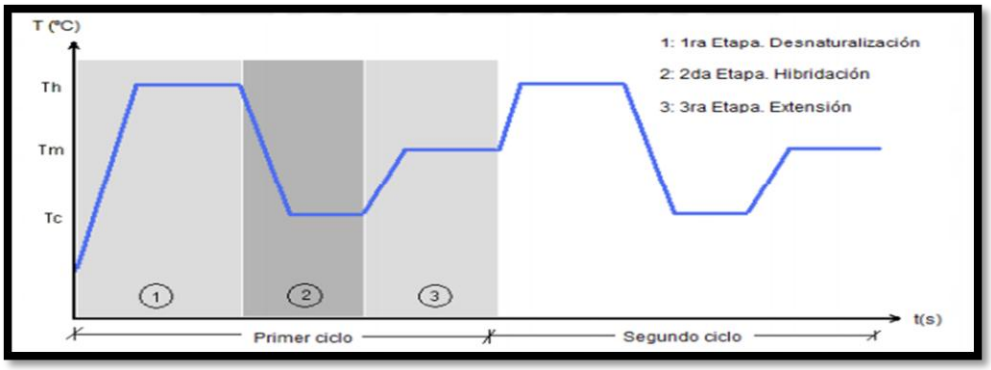


Figura 4.Tiempo vs. Temperatura en la que se muestran las 3 etapas de un ciclo PCR
Fuente: Mullis KB y Faloona FA, 2006

La facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de la PCR, la convierte especialmente en una poderosa herramienta para estudios genético - moleculares que incluyen gran número de individuos de cualquier organismo vivo. Muchos métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de polimorfismo de ADN fueron acelerados o sustituidos por el uso de numerosas derivaciones de la técnica de PCR; puesto a que resulta ser una técnica que comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa basándose en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos (pequeñas moléculas de ADN de cadena sencilla) utilizados como iniciadores "primers" que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, "blanco" de la amplificación. Estos Primers son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco (Hanna SE et al., 2005).

2.5.1.2.1. Etapas del PCR:

a) Primera etapa de la PCR: Desnaturalización o Melting.

Fase en la que se produce la separación de la doble hélice en dos hebras únicas como se esquematiza en la figura. Esto ocurre cuando se lleva la muestra a temperaturas mayores a 90 ºC. Se añaden dos componentes adicionales: primero la ya descrita Taq polimerasa que soporta altas temperaturas y segundo, el iniciador o cebador, también conocido como "Primer", que es una cadena corta de polinucleótidos que forma enlaces complementarios con la cadena ADN del sector que se quiere replicar y es el punto de partida del copiado de la cadena (Olsen JE et al., 2005).

Doble hélice de la molécula de ADN

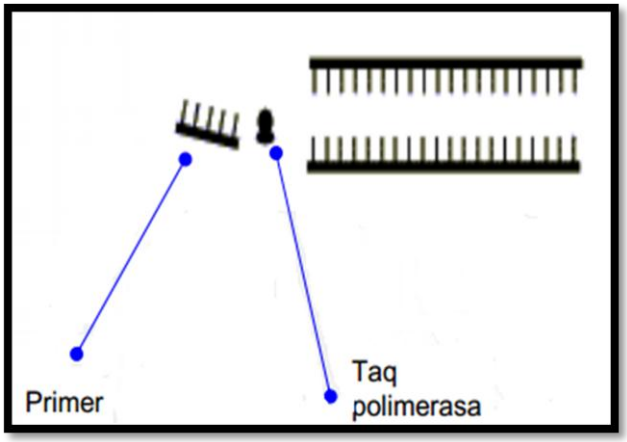


Figura 5.Desdoblamiento inicial de la doble hélice de la molécula de ADN a la que se añaden el Primer y la Taq polimerasa
Fuente: Olsen JE et al., 2005

b) Segunda etapa de la PCR: Hibridación o Annealing.

Los Primers inician la síntesis del ADN complementario en un determinado punto de los enlaces químicos de las hebras que se desdoblaron anteriormente. En esta fase, la temperatura debe bajar a un valor entre 40 ºC y 65 ºC para permitir que los primers hibriden con la secuencia complementaria (Olsen JE et al., 2005). La figura siguiente ilustra este efecto.

Hibridación o Annealing.

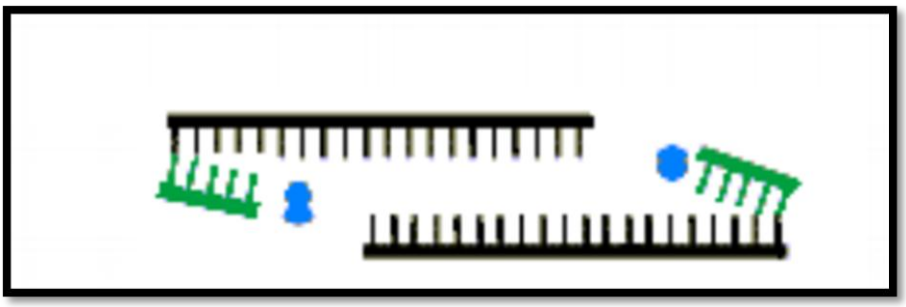


Figura 6. Los Primers inician la serie de enlaces químicos en cada una de las hebras únicas formadas en la primera etapa.
Fuente: Olsen JE et al., 2005

c) Tercera etapa de la PCR: Extensión

Una vez que los Primers han formado los primeros enlaces con la hebra de ADN complementaria, se lleva la muestra a una temperatura de alrededor de los 70 °C 72 ºC para permitir que la enzima Taq polimerasa replique la hebra de ADN. Esta enzima inicia el proceso de sintetización en la zona iniciada por los Primers facilitando la unión por enlaces químicos de los nucleótidos complementarios que se encuentran en la muestra (Olsen JE et al., 2005). Se gráfica en la figura siguiente.

Extensión

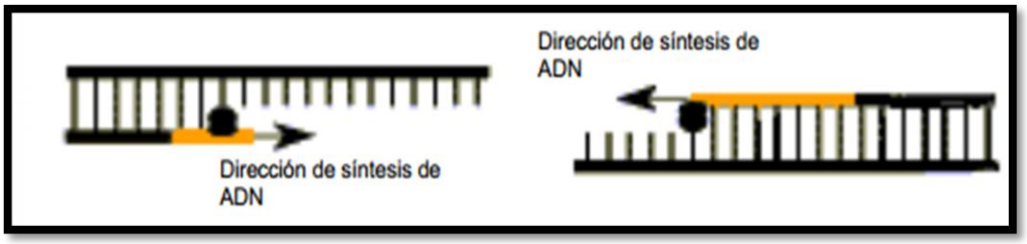


Figura 7. Copiado total de las dos hebras de la molécula de ADN
Fuente: Olsen JE et al., 2005

Estas tres etapas conforman un ciclo. Si se calienta y enfría nuevamente la muestra se desdoblarán las dos cadenas que se han obtenido duplicando al final de la síntesis las moléculas de ADN.

Si se repiten un promedio de 30 veces o más, aumentará de gran manera la proporción de copias de ADN. Debido a que cada ciclo tarda solo unos cuantos minutos, se puede llegar a obtener millones de copias del gen seleccionado en unas pocas horas. En cada ciclo se dobla la cantidad de ADN del ciclo anterior, según la fórmula 2n, donde " n" es el número de ciclos de tal manera que para “n” ciclos, se obtendrán copias de ADN (Mullis KB y Faloona FA, 2006).

La temperatura correspondiente a cada paso del PCR debe ser mantenida un tiempo determinado, dependiendo del tipo de muestra a tratar.

Una vez que la cantidad de ADN de la secuencia blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que después de unos 20 ciclos, se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia blanco. Esta escala de amplificación permite por lo tanto iniciar con cantidades mínimas de ADN y terminar la reacción con grandes cantidades de ADN de la secuencia especifica de interés (Mullis KB y Faloona FA, 2006).

En los experimentos iniciales de PCR, se utilizó la enzima ADN polimerasa de *E.coli*, cuya temperatura óptima de polimerización es de 37°C. Esta era adicionada manualmente en cada ciclo de amplificación, ya que siendo térmicamente lábil, era destruida siempre que la temperatura se elevaba a 95°C para provocar la desnaturalización del ADN molde. El paso decisivo para la expansión de la técnica de PCR ocurrió cuando Saiki *et al,.* (1988) aislaron una ADN polimerasa de una bacteria que vive en fuentes térmicas, polimerasa a 72 °C y mantiene su actividad durante algunas horas a 95°C. Esto posibilitó la autorización completa del proceso de PCR.

Para ver los resultados de la PCR estos se detectan tradicionalmente (PCR convencional), por medio de electroforesis en geles de agarosa seguido de la tinción del gel con algún agente intercalante, como el bromuro de etidio, o mediante tinción fluorescente. Uno de los principales inconvenientes que tiene la técnica de PCR es que en ocasiones, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno y posiblemente puede ser cancerígeno o teratógeno, por lo que actualmente existen otros compuestos que cumplen con la función del bromuro de etidio pero que no tienen efecto mutagénico, como es el *sybr* que se utiliza en la técnica de RT-PCR (Hanna SE et al., 2005).

A su vez en condiciones poco estrictas pueden ocurrir amplificaciones no específicas, por la unión de los iniciadores a otras zonas del ADN problema. También se pueden formar dímeros de los iniciadores, que se detectan como productos no específicos. Por otro lado, al tener que visualizar los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa, pueden ocurrir contaminaciones entre los productos de PCR (Hanna SE et al., 2005).

Por la PCR también se pueden detectar los ácidos nucleicos de un único organismo, el volumen de 1-10 µl de muestra que normalmente se utiliza en la reacción restringe el límite de detección a 103 células/ml (Olsen JE et al., 2005).

Detectar normalmente patógenos alimentarios de manera directa es prácticamente imposible su detección por lo que están presentes en los alimentos a concentraciones muy bajas. Por eso, se realizan grandes esfuerzos en intentar desarrollar métodos de extracción capaces de concentrar los microorganismos diana, de separarlos de la matriz alimentaria y solucionar posibles inhibiciones de la reacción de PCR causadas por sustancias presentes en los alimentos.

2.5.1.3. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional. Es un método cuantitativo que detecta la presencia de uno o varios amplicones al finalizar cada ciclo. Las amplificaciones son analizadas y visualizadas mediante un software informático (Heid et al., 1996). El análisis génico mediante PCR en tiempo real es altamente específico, sensible y eficiente (Velayudhan et al., 2003).

La identificación de la expresión genética y de secuencias específicas de ADN o ARN es un factor crucial cuando se trabaja con técnicas de biología molecular. Las nuevas aplicaciones en la tecnología de la PCR hacen posible determinar la cantidad de producto que se obtiene durante un experimento mediante una técnica llamada PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, que permite a los investigadores cuantificar reacciones de amplificación a medida que ocurren en tiempo real (Valasek & Repa, 2005).

Esta técnica permite determinar los perfiles de expresión génica mediante el estudio de los transcritos (ARNm) de una muestra. Para el análisis es necesario transcribir el ARNm en ADN copia (ADNc) mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa, puesto que la PCR en tiempo real, al igual que la PCR convencional, basa sus análisis en ácidos nucleicos de doble cadena. La precisión cuantitativa de ésta técnica depende de la alta calidad del transcrito, en consonancia con el ADNc sintetizado. La contaminación de ADN genómico en las muestras de ADNc afecta tanto a la sensibilidad como a la especificidad del ensayo de PCR, su eliminación de las preparaciones de ARN con DNasa, se recomienda para evitar falsos positivos (Valasek & Repa, 2005).

El método utiliza reporteros fluorescentes que en base a la detección de su fluorescencia emitida por cada ciclo, refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de la reacción puede dividirse en 4 fases las cuales son: la fase inicial, la exponencial temprana, la exponencial y la de finalización o plateu. En la fase lineal, es el nivel basal o background de fluorescencia durante los primeros ciclos. En la fase exponencial temprana, la fluorescencia rebasa el umbral y el ciclo en el que se produce es denominado Ct (curve threshold) o CP (crossing point). Este valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana y es utilizado para realizar los cálculos de cuantificación respectivos. En la fase logarítmica lineal, se duplica exactamente el producto en cada ciclo (óptima amplificación). Finalmente, en la fase de plateau, los reactivos se consumen y la reacción se detiene (Wong & Medrano, 2005).

Curva de amplificación

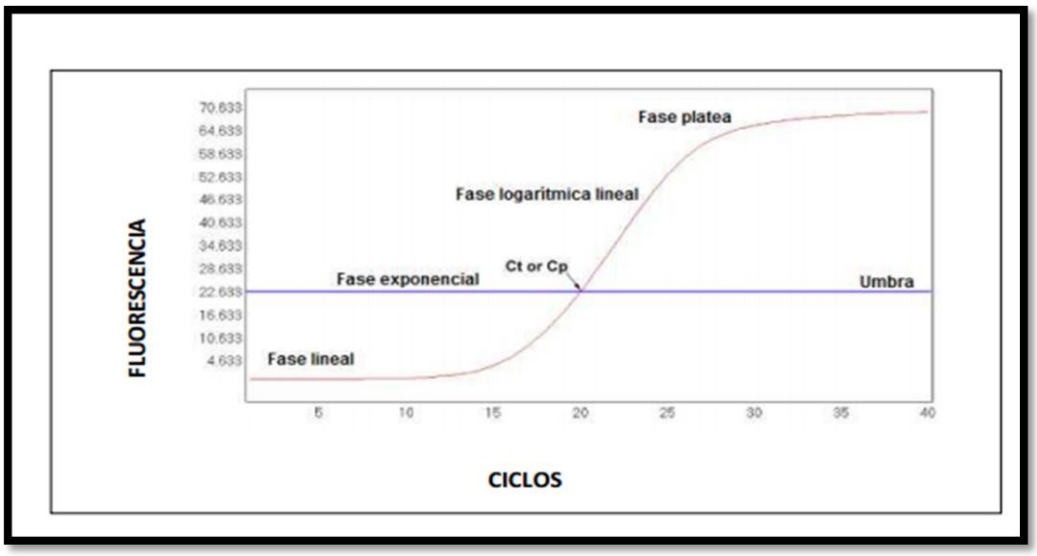


Figura 8. Fases de una curva de amplificación de qRT-PCR
Fuente: Wong & Medrano, 2005

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados pueden ser sondas específicamente marcadas con fluorocromos y agentes intercalantes de doble cadena.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas y de alimentos, todavía no se ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra.

Dos de los métodos que más se utilizan en la PCR en tiempo real implican el uso de un colorante llamado SYBR Green es el fluoróforo específico de ADN bicatenario más usado en la PCR en tiempo real, que se encarga de unir el ADN de doble cadena. Su

detección es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula, así como dímeros de primers y otros productos inespecíficos, resultando en una sobre estimación de la concentración del ADN diana. A medida que se copia más ADN de doble cadena con cada ciclo de PCR en tiempo real, hay más copias de ADN que se unen con SYBR Green, lo que aumenta la cantidad de luz fluorescente emitida (Kubista et al., 2006).

La amplificación de un producto específico se comprueba mediante un análisis de la curva de disociación. La temperatura de disociación de un producto específico depende del contenido de G - C, la longitud y secuencia nucleotídica del amplicón (Ririe et al., 1997), de tal manera que los productos no deseados pueden discriminarse de aquellos que son específicos, ya que estos últimos se disociarán a una temperatura de melting (Tm) más alta. La presencia de dos o más picos, sugiere que se ha obtenido más de un producto amplificado (dímeros de primers), lo que invalidan el ensayo (Kubista et al., 2006).

El valor umbral es un nivel de fluorescencia a partir del cual la señal alcanza un valor por encima del ruido de fondo, y el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral se conoce como ciclo umbral (Cp o Ct). Se considera que la amplificación es positiva si sobrepasa ese umbral, y que es negativa si la curva se mantiene por debajo de él (Hanna SE et al., 2005).

Fluorescencia con respecto al número de ciclos.

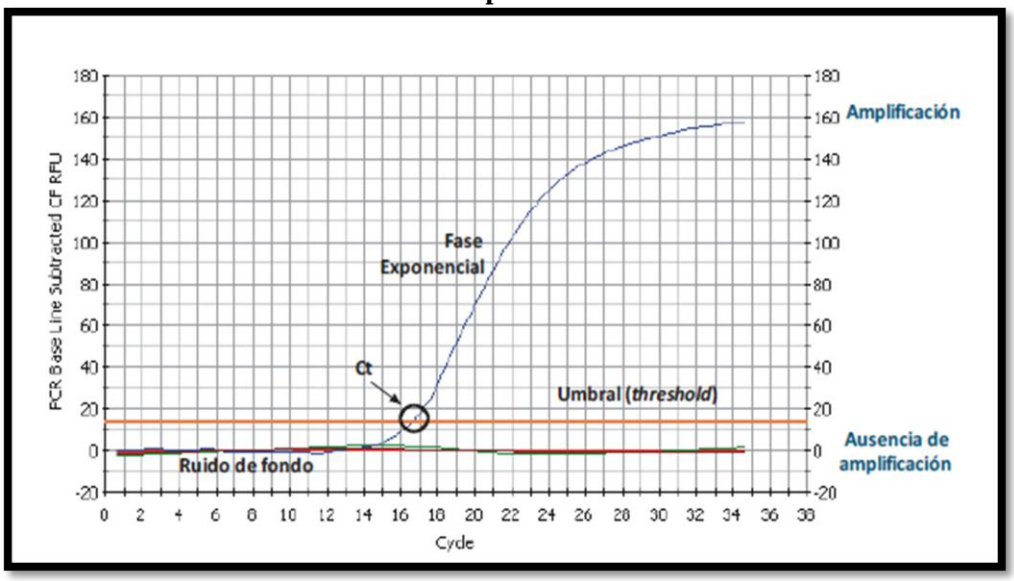


Figura 9. Curvas de amplificación (positiva y negativas) en una PCR a tiempo real
Fuente: Hanna SE et al., 2005

Después de la amplificación también se puede realizar un análisis de las curvas de disociación. Las secuencias amplificadas se pueden caracterizar y diferenciar con respecto a su temperatura de disociación (Tm), que varía dependiendo del tamaño del producto y de su composición de bases (Wilhelm J y Pingoud A, 2003).

Esta técnica molecular, se puede utilizar tanto para detección cualitativa como para cuantificación, cuanta más cantidad de ADN haya en la muestra, la fluorescencia alcanzará antes el nivel de ciclo umbral. El Cp obtenido en una muestra se puede comparar con el de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas con cantidades conocidas de ADN para la cuantificación la muestra (Hanna SE et al., 2005).

2.5.1.3.1. Optimización de la PCR en tiempo real

Para obtener resultados confiables en las pruebas realizadas con la PCR en tiempo real es necesario optimizar la reacción en el laboratorio. La optimización consiste en hacer que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Ct y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards, 2004).

Los factores que deben ser optimizados son las mezclas maestras de reactivos, la concentración de los primers, concentración de los marcadores fluorescentes y la concentración de la muestra. Las mejores concentraciones de reactivos y condiciones de la PCR son aquellas en las que se observa resultados óptimos en términos de la curva de fusión y de la eficiencia de la amplificación en reacciones llevadas a cabo con controles positivos o calibradores (Edwards, 2004).

También es útil realizar electroforesis en gel de agarosa cuando se optimiza una PCR en tiempo real. Los resultados de este análisis proporcionan datos para relacionar la longitud del producto con los picos del análisis de la curva de fusión y la posible presencia de artefactos como primer dimmers (Dussault & Pouliot, 2006, pág. 7).

2.6. Tendencia actual del uso de la PCR en tiempo real

En los métodos de PCR en Tiempo Real para detectar patógenos en alimentos se recomienda realizar una fase previa de enriquecimiento de entre 6h a 24h para aumentar el número de células diana, ya que en la extracción del ADN se utiliza un volumen pequeño de muestra. También se recomienda la utilización de un control interno en la reacción de PCR para descartar posibles inhibiciones (Malorny B et al., 2003). Los

métodos basados en PCR son muy útiles para realizar screening de muestras, pero en caso de obtener algún resultado positivo siempre se debe confirmar con el método tradicional de cultivo.

Hoy en día existen una gran variedad de kits comerciales validados para realizar la detección de *Salmonella* sp. en alimentos mediante PCR a tiempo real empleando tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos nuevas y más sensibles, con el propósito de lograr un diagnóstico más rápido. Cada vez son más las empresas biotecnológicas que comienzan a diseñar nuevas herramientas de diagnóstico basadas en técnicas de Biología Molecular (Mullis, K. B., and F. A. Faloona, 2006).

2.6.1. Aplicaciones de la PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real tiene amplias aplicaciones en investigación científica y como herramienta de diagnóstico. Vale la pena resaltar que se han hecho grandes logros en el estudio de virus que afectan al hombre y a los animales (Bustin, 2005), así como en la investigación de bacterias y hongos patogénicos, pues esta prueba ofrece una gran sensibilidad y especificidad en menor tiempo y a un menor costo.

Es muy utilizada a su vez en la identificación de ciertas mutaciones o polimorfismos genéticos a través de sondas específicas (Valasek & Repa, 2005), ayudando a obtener datos relevantes a la biodinámica de los organismos que producen cierto tipos de enfermedades.

Uno de los campos que presenta mayor aplicación de esta técnica es la investigación de cambios en la expresión genética de células a través de la cuantificación de su ADN,

permitiendo asociar dichos cambios a estados fisiológicos celulares, presencia de fármacos, agentes infecciosos, entre otros (Bustin, 2005).

La PCR en tiempo real también se está usando en otros campos como la investigación forense y la bioseguridad. En estos casos las investigaciones se basan en la identificación con una alta sensibilidad y especificidad de organismos patógenos difundidos en el medio ambiente. La caracterización de pequeñas cantidades de material genético procedente de tales organismos hace posible conocer su procedencia e identificar su dinámica (Johnson et al., 2005).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Localización y tamaño de muestra:

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito.

Las muestras de alimento que fueron analizadas se obtuvieron de diez establecimientos de comida rápida adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, sector El Girón, para su análisis.

Se determinaron los siguientes atributos para esta investigación:

- Intervalo de toma de muestras: 1 muestra alimento por cada establecimiento y por semana.
- Número de ensayos por muestra: 1 ensayo
- Número de análisis por ensayo: 1 análisis de *Salmonella* sp., y 1 análisis de ADNr 16S bacteriano.
- Número de repeticiones: 3 repeticiones por alimento en cada establecimiento.

3.1.2. Selección, obtención, y preparación de las muestras

Para la selección de las muestras en este caso se realizó previamente una encuesta verbal de los consumidores asiduos, puesto que estos alimentos resultan muy apetecibles por los estudiantes de las Universidades. Se tomaron en cuenta los establecimientos que comercializan el alimento que se desea investigar, en este caso la hamburguesa; la

misma que presenta los componentes necesarios para el análisis (lechuga, huevo, embutido, queso, pan, carne y aderezos) y carga bacteriana.

Para la obtención de las muestras de alimentos se designaron 10 establecimientos que se ubican 100 metros a la redonda, entre las calles 12 de Octubre - Toledo y Madrid, adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón; las mismas fueron adquiridas cada semana para su posterior análisis en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI).

Para la preparación de las muestras se pesó 25 g del alimento y se colocó en 225 ml de caldo peptonado para su enriquecimiento bacteriano, se incubó a 37ºC durante 24 horas, como se observa en el anexo 3c.

Materiales:

Materiales para la toma de muestras del alimento (hamburguesa)

- Fundas wirlpack estériles
- Guantes de látex
- Marcadores permanentes
- Registro de las muestras
- Esféro

Materiales para el estudio microbiológico

- Fundas wirlpack
- Frascos de vidrio autoclavables tapa azul de 500 ml.
- Probetas 1000 ml
- Mechero
- Balanza electrónica

- Incubadora
- Autoclave
- Destilador de agua
- Alcohol potable al 70%
- Toallas de papel desechables
- Guantes de látex

Medios y reactivos para el estudio microbiológico

- Agua Destilada Estéril
- Agua peptonada

3.1.3. Extracción de ácidos nucleicos

En los anexos 3, 5 y 6 se observa la utilización mediante el Kit de Preparación de Muestras de Alta Pureza para PCR (High Pure PCR Template Preparation Kit).

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo de Roche por lo que colocamos en un Tubo de micro centrífuga de 1,5 ml libre de nucleasas. Luego se agrego 200µl del material de muestra, 200 µl de Buffer de Unión, 40 µl de Proteinasa K. Se mezclo inmediatamente se incubó a 70ºC por 10 minutos.

Posterior a esto, se agregó 100 µl de Isopropanol y se mezcló completamente. Para transferir la muestra a un Tubo de Purificación (High Pure Tube) se insertó un tubo de filtración (High Filter Tube) en un Tubo de colecta (incluido en el kit); se pipeteó la muestra completa en la parte superior del depósito del buffer en el tubo de filtración. Se introdujo el conjunto del tubo de filtración en una centrífuga de sobremesa estándar; luego se realizó una centrifugación por un minuto a 8000 x *g* (9500 rpm en un rotor de 80 mm de diámetro).

Después de la centrifugación se procedió a retirar el tubo de filtración del tubo de colecta; se desecho el líquido presente y el tubo de colecta. Para la remoción de inhibidores se agregó 500 µl del Buffer removedor de Inhibidores (Inhibitor Renoval Buffer) sobre el depósito del conjunto del tubo de filtración. Se repitió la centrifugación a 8000 x g por 1 minuto y se desechó el líquido y el tubo de colecta.

Posteriormente, se reinsertó en el tubo de filtración un nuevo tubo de colecta, para el lavado de la muestra agregamos 500 µl de Buffer de lavado (Wash Buffer) sobre el depósito del tubo de filtrado y se repitió la centrifugación. Desechamos el tubo de colecta y se insertó el Tubo de filtración en un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml limpio y estéril.

Para eluir el ácido nucleico se agregó 200 µl de Buffer de elución precalentado (70ºC) al tubo de filtrado. Se centrifugó el conjunto por 1 minuto a 8000 x g. El tubo de microcentrífuga ahora contiene el ácido nucleico eluido; de éste se utilizó una alícuota para su proceso a la PCR o Almacenamiento de ácidos nucleicos a - 20ºC para análisis posteriores (Roche, 2010).

Extracción de ácidos nucleicos

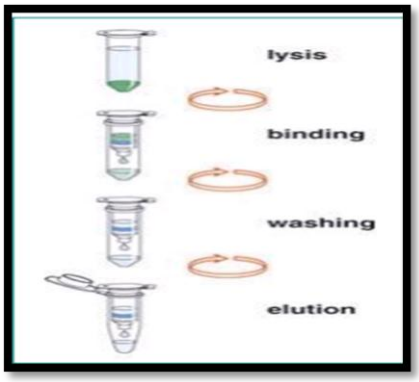


Figura 10. Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos
Fuente: Roche, 2010

3.1.4. Aplicación de la técnica de PCR en tiempo real.

3.1.4.1. Curva estándar:

Para cuantificar ácidos nucleicos se utilizaron diluciones seriadas de ADN de una cepa certificada que fueron previamente cuantificadas con un espectrofotómetro, se observa detalladamente en el anexo 4.

Para la calibración del equipo se tomó 5 µl del sobrenadante anterior, y se adicionó 10,2 µl de Agua grado Biología Molecular, 0,8 µl del Primer FW y Primer RW, luego se adicionó 4µl del Máster Plus Hybprobe, en cada capilar con capacidad de 20 µl para realizar la prueba del PCR en tiempo real como se observa en el anexo 7; se recomienda el uso de un control interno en la reacción de PCR tiempo real para descartar posibles inhibiciones (Roche, 2010).

La técnica de PCR en tiempo real se lleva a cabo según el protocolo de LC FS DNA Master^PLUS HY-Pb, 96 react. *LightCycler* (Roche Diagnostics), el cual consiste en 40 ciclos compuestos por cuatro pasos: Denaturación: 95ºC, 10 min; Alineamiento: 62ºC, 10sg; Melting: 95ºC, 0; Enfriado: 40ºC, 30sg, se observa en el anexo 8.

3.1.5. Diseño experimental:

Tipo de muestreo: Selección aleatoria de las hamburguesas de los establecimientos determinados.

Selección del tamaño de muestra: Para calcular el tamaño de muestra se tomaron los siguientes parámetros:

A) Número de establecimientos: Diez establecimientos de comida rápida adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, sector El Girón.

B) Número de muestras por establecimiento: Se recolectaron de cada lugar una muestra de alimento (hamburguesa).

C) Número de análisis por ensayo: 1 análisis de *Salmonella* sp., y 1 análisis de ADNr 16S bacteriano.

D) Intervalo de toma de muestras: 1 muestra alimento por cada establecimiento y por semana

Se empleó un muestreo no probabilístico, conformado por un total de diez muestras de alimento (hamburguesa), con tres repeticiones tomadas de diferentes sitios de venta de comida rápida tanto en locales como en la vía pública.

Periodo de estudio: Las muestras de alimento se recolectaron y procesaron entre mayo y julio del 2014.

3.1.6. Análisis estadístico

El método utilizado para detectar estos patógenos tanto de *Salmonella* sp. y ADNr 16s bacteriano, fue de un análisis estadístico no paramétrico utilizando herramientas de análisis de datos a través del programa Infostat para elaborar la estadística descriptiva con la prueba de Kruskall- Wallis, la cual consiste en probar si un grupo de datos proviene de la misma población. También es adecuado cuando las desviaciones típicas de los diferentes grupos no son iguales entre sí.

Este estadístico de la Prueba H se calcula de la siguiente manera:

Prueba H de Kruskall- Wallis

$$H = \frac{12}{n(n+1)}\left(\frac{R_1^2}{n_1}+\frac{R_2^2}{n_2}+\frac{R_3^2}{n_3}+\ldots+\frac{R_k^2}{n_k}\right) - 3(N+1)$$

Figura 11. Fórmula para determinar datos que poseen medianas similares o no
Fuente: Yánez, 2007

Donde:

N= Total de observaciones

R_i = Sumatoria de los rangos de la muestra

n_1 = total de observaciones de la muestra

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados mediante PCR –RT de ADNr 16S bacteriano

Se logró extraer ADNr 16S bacteriano de las muestras del alimento (Hamburguesa) de los distintos establecimientos de comida rápida, tanto ambulantes como de restaurantes, obteniéndose como resultado de la corrida de las muestras lo siguiente:

4.1.1. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno

La obtención de la curva estándar se realizó con el objetivo de conseguir un control interno que permitió validar la precisión del test, para distinguir los resultados positivos y negativos de cada una de las muestras a analizarse. Se obtuvo a través de una disolución decimal seriada de un estándar con 10^{-5} copias /ul.

Curva estándar

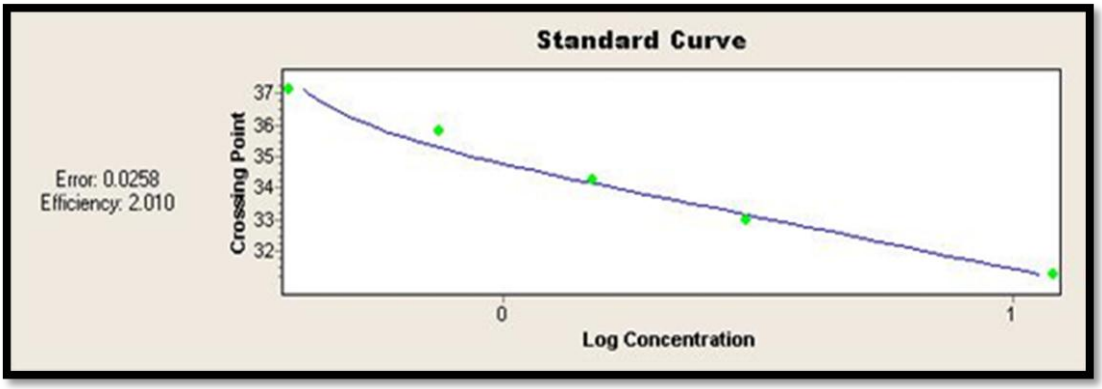


Figura 12. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno
Elaborado por: Echeverría, 2014

En la Figura 12 se observa la curva estándar con la que se trabajó la cuantificación del control interno la que presentó una eficiencia de 2 y un error muy bajo de 0,0258 que significa que los ensayos fueron certeros de acuerdo a los procedimientos descritos en el protocolo del equipo LightCycler 2,0, proporcionándonos así las condiciones necesarias para conseguir los resultados esperados para este análisis de investigación.

4.1.2. Curva estándar obtenida para la cuantificación de ADNr 16s Bacteriano en la muestra de alimento

Una vez obtenida la curva estándar del control interno a partir de concentraciones conocidas nos permitió calcular la relación entre la cantidad de la secuencia analizada y de la secuencia de referencia comparando dicha relación entre las muestras. Presenta una eficiencia de 1,757 y un error de 0,0361 que significa que el ensayo es certero, y de esta manera permitió determinar si las muestras fueron positivas o negativas para ADNr 16S bacteriano.

Curva estándar de ADNr 16S bacteriano

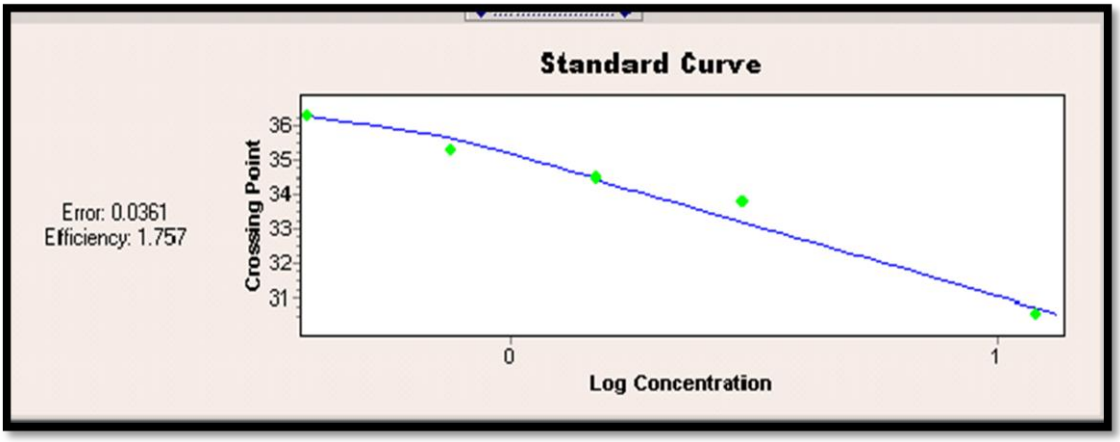


Figura 13. Curva estándar obtenida para la cuantificación de ADNr 16S bacteriano en la muestra de alimento
Elaborado por: Echeverría, 2014

4.1.3. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de ADNr 16S bacteriano en las muestras de alimento

Para determinar la concentración de ADNr 16S bacteriano en las muestras de alimento desconocida se realizó una corrida junto al estándar. En la Tabla 1 se muestran los rangos promedios de la concentración de ADNr 16S bacteriano (ug/ml) por cada de los establecimientos:

Tabla 1. Distribución de los establecimientos por el alimento con sus respectivas concentraciones promedio de casos positivos de ADNr 16S bacteriano ug/ml

Establecimientos	Rango promedio de casos positivos de la concentración de ADNr 16S bacteriano ug/ml	Repeticiones
A	2,41	1
A	1,56	2
B	1,56	1
B	9,73	2
C	1,56	1
D	1,09	1
E	1,51	1
E	0,52	2
F	1,53	1
F	0,15	2
G	0,08	1
G	11,8	2
H	1,98	1
I	0,15	1
J	41	1
J	61	2

Notas: Echeverría, 2014

La Tabla 1 muestra los casos positivos de ADNr 16S bacteriano del alimento analizado con el promedio de sus respectivas concentraciones en ug/ml, en cada uno de los establecimientos se logró determinar a través del método mediante PCR en Tiempo Real un total de 100 % de casos positivos en una población de varias muestras de alimento, el establecimiento J presentó la mayor cantidad de concentración de ADNr 16S bacteriano frente a los otros lugares de comida, esto se debió a que el lugar de expendió se ubicaba en un sitio inapropiado en la vía pública siendo así vulnerable a los patógenos, toxinas o sustancias químicas a más del inadecuado aseo de los manipuladores, la limpieza y la desinfección de equipos y materiales empleados en la preparación de los alimentos, constituyeron factores determinantes que generaron en este análisis un escenario propicio para la contaminación y la propagación de ADNr 16S bacteriano en alimento.

Los datos obtenidos de la concentración promedio de ADNr 16S bacteriano fueron analizados mediante el programa estadístico Infostat arrojándonos un resultado positivo utilizando la prueba estadística de Kruskall- Wallis se determinó un H igual a 10,05 lo que determina que si existen diferencias significativas, lo cual nos permitió aceptar la hipótesis en el que se esperaba que en al menos uno de los establecimientos hay mayor número de casos de bacterias presentes en el alimento.

la pcr en tiempo real para la detección y cuantificación de bacterias causantes de enfermedades trasmitidas por alimentos está tomando mucha fuerza en el campo molecular en diversos países, entre estos podemos citar un caso de córdova, españa en donde varios investigadores lograron determinar que se puede encontrar mayor presencia bacteriana en alimentos que contengan carne de res, carne molida, embutidos y verduras; mucho más aún, si las mismas no son desinfectadas adecuadamente como se presentó en el caso de hamburguesa en este estudio al momento de preparar el alimento, representando un problema de salud pública para los consumidores asiduos (yánez e, máttar s, durando A, 2008).

Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) para alimentos preparados el límite permisible para identificar el nivel aceptable de buena calidad del alimento, la carga microbiana debe ser < 3 ufc/g de alimento (INEN, 2014). Sin embargo no todos los establecimientos de comida rápida cumplen con esta normativa, como lo menciona (Chiluisa-Utreras V., J. Coba y A. Echeverría. 2014), en donde se realizó un estudió microbiológico y molecular constatando la alta carga microbiana en los alimentos analizados. La falta de higiene en la manipulación de los ingredientes del alimento al momento de su preparación, además de ser un alimento que presenta producto cárnico, lácteos y ovoproducto por lo que resulta la hamburguesa vulnerable a la contaminación bacteriana desencadenando en los consumidores un alto riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales.

4.1.4. Amplificación de ADN 16S Bacteriano: fluorescencia vs ciclos

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en tiempo real en el eje de las abscisas. En la Figura 14 es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial.

Fluorescencia vs ciclos

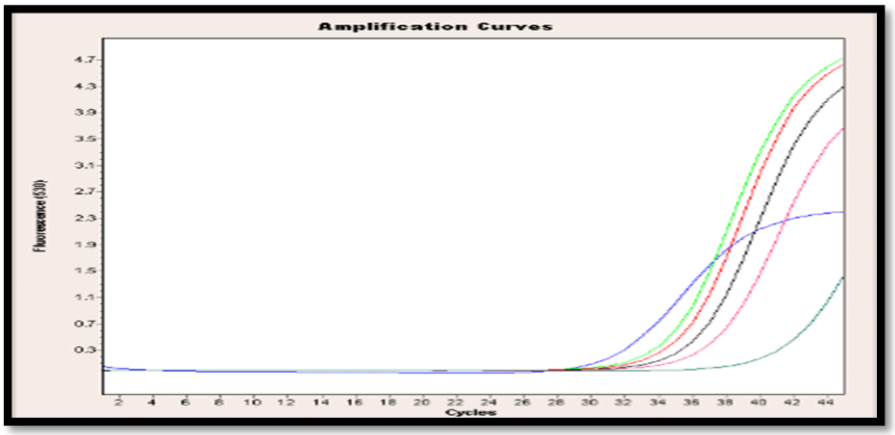


Figura 14. Curvas de amplificación de ADN 16S bacteriano: fluorescencia vs ciclos
Elaborado por: Echeverría, 2014

Tras el análisis de varias muestras de alimento, se detectaron que existen muestras positivas, como muestra la figura 14 la interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante la curva de amplificación, en la que se observa tanto un eje «Y» que muestra la cantidad de fluorescencia que se detectó en este análisis, y un eje «X» el cual determinó los ciclos llevados en esta reacción. EL ciclo umbral también denominado Ct, indicó el ciclo en el que la fluorescencia alcanzó el valor del umbral presentando picos como fragmentos distintos de ADN que se habían producido en la reacción. Así, podemos identificar algunas de las curvas obtenidas de cada una de las muestras del alimento para la detección y cuantificación de ADNr 16S bacteriano, en donde la fluorescencia es detectada desde el ciclo 25 los valores de Cp, con lo que se afirma que se tiene una carga bacteriana importante debido a que la relación de los ciclos y la carga bacteriana es inversamente proporcional determinándose de esta manera la presencia/ausencia del patógeno.

Del análisis de las curvas se observa que el Cp es inversamente proporcional a la concentración. Por lo que mientras más alto el valor de Cp menor es la cantidad de concentración, y cuando menor sea el valor de Cp mayor es la cantidad de concentración en la muestra permitiéndonos así identificar esa muestra como positiva, como determinó el resultado en la detección de ADNr 16S bacteriano en la muestra de alimento analizada.

4.2. Resultados mediante PCR –RT de *Salmonella* sp.

4.2.1. Análisis inicial en el alimento

Tras la adquisición de las muestras de alimentos de los distintos establecimientos de comida rápida tanto ambulantes como de restaurantes, se encontraron dos muestras con contaminación de *Salmonella* sp. Los datos específicos para cada una de las muestras de alimento se muestran a continuación:

4.2.2. Curva estándar obtenida para la cuantificación a partir del control interno

La curva estándar se realizó con el objetivo de obtener un control interno de amplificación, en este caso se utilizó una cepa certificada de *Salmonella* sp., que permitió validar la precisión del test, reconociendo los resultados positivos y negativos de cada una de las muestras a analizarse. Se obtuvo por una disolución decimal seriada de un estándar con 10^{-5} copias /ul. En base a estos resultados, se decidió utilizar una concentración inferior (dilución 10^{-4}) del control interno en las posteriores reacciones de PCR en tiempo real.

Curva estándar de *Salmonella* sp.

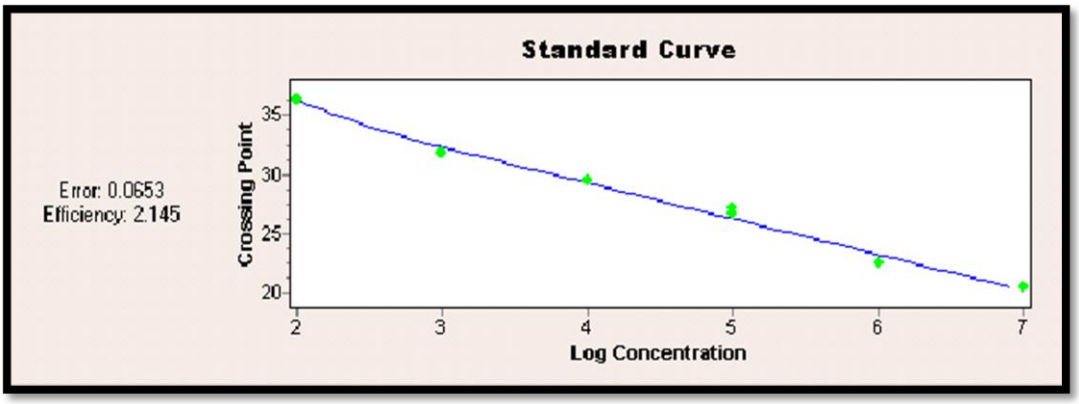


Figura 15. Curva estándar obtenida para la cuantificación de *Salmonella* sp. en la muestra de alimento
Elaborado por: Echeverría, 2014

Una vez obtenida la curva estándar del control interno a partir de concentraciones conocidas nos permitió calcular la relación entre la cantidad del gen analizado y el gen de referencia comparando dicha relación entre las muestras. Se determinó la eficiencia que fue realizada anteriormente con diluciones seriadas de una concentración de ADN conocida. Dicha eficiencia dada por el Light Cycler debe ser cercana a 2 y un error cercano a 0 (Roche, 2010), por lo que los valores obtenidos después de realizar la corrida fueron 2,145 y un error muy bajo de 0,0653 que significa este ensayo es certero,

y de esta manera nos permitió determinar si las muestras fueron positivas o negativas para *Salmonella* sp.

4.2.3. Cuantificación mediante PCR en tiempo real de *Salmonella* sp. en la muestra de alimento

Para determinar la concentración de las muestras de alimento desconocida se realiza una corrida junto al estándar. La cuantificación de ADN de *Salmonella* sp. por medio de PCR en tiempo real por la curva de calibración nos permitió determinar la concentración de ADN en la muestra analizada. En la Tabla 2 se muestran los rangos promedios de la concentración de *Salmonella* sp. ug/ml por cada uno de los establecimientos:

Tabla 2. Distribución de los establecimientos por el alimento con sus respectivas concentraciones promedio de *Salmonella* sp. en ug/ml

Establecimientos	Rango promedio de la concentración de *Salmonella* sp. ug/ml		
	R1	R2	R3
A	0	0	0
B	0	0	0
C	0	0	0
D	0	0,76600	0
E	0	0,00170	0
F	0	0	0
G	0	0	0
H	0	0	0
I	0	0	0
J	0	0	0

Notas: Echeverría, 2014

El resultado para las concentraciones de *Salmonella* sp. que se muestran en la Tabla 2 son negativas para la mayoría de los establecimientos analizados de la muestras de alimento, sin embargo 1 repetición de los establecimientos D y E, presentaron resultados positivos con una concentración de 0,76600 y 0,00170 ug/ml; por lo que se logró determinar a través del método PCR en tiempo real un total del 6,7 % de casos positivos en una población de varias muestras de alimento encontrados en dos de los establecimientos, que analizados mediante el programa estadístico Infostat nos arroja un resultado negativo utilizando la prueba estadística de Kruskall- Wallis se determinó un H igual a 1,56 que determina que no existe diferencia significativa, lo cual nos permitió aceptar la hipótesis nula en el que ningún establecimiento presenta patógenos, como la *Salmonella* sp. en el alimento.

La *Salmonella* sp. se considera una bacteria patógena que puede causar enfermedades gastrointestinales, su presencia en alimentos debe ser nula, sin embargo la mala manipulación de alimentos y la poca higiene de los establecimientos de comida rápida son factores que favorecen la presencia de ésta bacteria, es importante tener en cuenta que la *Salmonella* sp. suele presentarse en alimentos que contengan huevo mal cocido, por lo tanto la hamburguesa al contener este ovoproducto es vulnerable a contener estos bacilos Gram-negativos. Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) para alimentos preparados el límite permisible para identificar el nivel aceptable de *Salmonella* sp. es de 0 ufc/g de alimento, es decir debe haber ausencia total de este patógeno (INEN, 2014).

Harris *et al*. (2002), señalan que los riesgos de contaminación de los productos expendidos en la vía pública son contaminados por patógenos debido a la utilización de agua de lavado contaminada, exposición a gotas o salpicadura de pisos contaminados, desagües, tuberías aéreas o sistemas de enfriamiento, manejo del producto en superficies de contacto sucias y por trabajadores con precaria higiene personal. Asimismo, Castillo *et al*. (2004), reportaron que las superficies sucias y la falta de higiene de los

trabajadores en contacto con el alimento son las principales fuentes de contaminación por patógenos de humanos, desencadenando que existan enfermedades entre los consumidores asiduos, convirtiéndose uno de los principales problemas reportados en el Ecuador la Salmonelosis como una de las principales causantes de infecciones alimentarias.

Según un estudio realizado (Yánez, Máttar, Durando, 2008), se han logrado realizar grandes esfuerzos en materia de prevención para el control de enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y las entidades encargadas del control. Muchos países como, Estados Unidos, Canadá, Colombia y Ecuador, tienen establecidos dentro de su legislación "cero tolerancia" para este patógeno.

La PCR en tiempo real al ser una técnica sensible y rápida para la identificación de *Salmonella* sp. en alimentos nos permitió obtener resultados en 28 horas, incluido el preenrriquecimiento, lo que permitió una rápido análisis del alimento. En este sentido esta investigación demostró una alta especificidad y excelente rapidez debido al corto tiempo utilizado para la detección de este patógeno.

4.2.4. Amplificación de *Salmonella* sp: fluorescencia vs ciclos

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En este caso el resultado de amplificación de las corridas de las muestras de alimento la mayoría dieron negativas lo que quiere decir que el valor del umbral no fue superado respecto al control interno.

Existen diferentes sistemas de detección en la PCR en tiempo real. En esta investigación se utilizó el SYBR Green I para evaluar su capacidad de detección que se baso en la

emisión de fluorescencia en presencia del fragmento diana, por eso, tras la reacción de amplificación se suele añadir un protocolo de disociación para aumentar la especificidad mediante el cual se generan curvas de disociación específicas de cada fragmento. En caso de haber más de un amplicón en la muestra, estos fueron diferenciados por sus curvas de disociación.

Si bien en la actualidad se han desarrollado nuevos métodos y combinaciones de técnicas que hacen del proceso de detección un procedimiento menos complejo, rápido, sensible y específico; utilizando la tecnología del LightCycler proporcionó una herramienta muy útil al momento de detectar *Salmonella* sp. en alimentos mediante la PCR en tiempo real demostró mayor eficiencia y rapidez que el método tradicional, constituyéndose como una herramienta alterna de diagnostico disponiendo de cantidades muy limitadas de material experimental.

Una de las principales ventajas de la PCR en tiempo real es la de no requerir ningún tipo de manipulación de las muestras disminuyendo en su mayor parte notablemente el riesgo de contaminación con el fin de observar y obtener resultados fiables tras el proceso de amplificación. En la PCR convencional se debe realizar un análisis post-PCR mediante electroforesis para confirmar la presencia de la diana, mientras que en la PCR en tiempo real el resultado de la amplificación se obtiene mediante un incremento de la fluorescencia que indica la presencia de la diana y es monitorizado a lo largo de todo el proceso de PCR (Hein I et al., 2006). Si, a la baja probabilidad de contaminación le sumamos que los resultados se obtienen antes que en una PCR convencional, que la sensibilidad y la especificidad que se logran con la PCR en tiempo real son realmente buenas, y que además es una técnica muy sencilla de realizar, la PCR en Tiempo Real se convierte en una buena alternativa a otros métodos utilizados en microbiología para la identificación de patógenos alimentarios constituyendo un trabajo pionero y de gran originalidad que serviría de complemento a las técnicas de PCR convencional.

Aunque resulte todavía novedosa y cara su implantación progresiva en los laboratorios de análisis permitirá desarrollar un gran número de aplicaciones potenciales en el análisis de los alimentos (Espy MJ et al., 2006).

Por último, otro aspecto importante a la hora de detectar patógenos en alimentos es la elección del método de extracción más adecuado. Hay que optimizar cada método teniendo en cuenta el tipo de alimento que se vaya a analizar y el patógeno que se quiera detectar. Por eso mismo, debe elegirse el método más adecuado esto debe hacerse no solo con el método de extracción de ácidos nucleicos, sino debe adecuar todo el proceso, desde la recepción de la muestra hasta la obtención de los resultados.

CONCLUSIONES:

- El presente estudio logró determinar mediante el uso de la PCR en tiempo real, que el alimento analizado en varios establecimientos de comida rápida tanto ambulante como de restaurantes, presentaron en su totalidad casos positivos para ADNr 16S bacteriano, y una concentración mínima de ADN para *Salmonella* sp. por lo que éste método resulta más completo, presentando resultados más rápidos y fiables ante otros métodos de análisis de microorganismos en alimentos.

- Se logró establecer una curva estándar inicial de las concentraciones de ácidos nucleicos tanto para *Salmonella* sp. como para ADN 16S bacteriano que nos ayudó a determinar la cantidad de concentración de ADN presente en cada una de las muestras con la finalidad de comprobar la presencia o ausencia de estos patógenos en el alimento.

- Los resultados de esta investigación confirman un alto índice de patógenos en el alimento el cual corresponde a varios establecimientos tanto ambulantes como restaurantes, demostrando que estos lugares no cuentan con una norma de higiene establecida que les permita tener noción de la inocuidad que se necesita para expender un alimento saludable al consumidor.

- El desarrollo de métodos moleculares tanto para la detección e identificación de microorganismos patógenos han proporcionado nuevas herramientas confiables para determinar en menor tiempo el riesgo de infección por patógenos en alimentos, por lo que es considerada un instrumento poderoso en el diagnóstico microbiológico.

- Las investigaciones basadas en el campo de la biología molecular se encuentran abriendo una inmensa oportunidad para un mejor entendimiento de los fenómenos biológicos que nos rodean. Las implicaciones que tiene este nuevo conocimiento abarcan campos tan diversos como la medicina, la conservación medio ambiental y la industria.

- La preparación de la muestra o la extracción del ADN, es un punto crítico del proceso de detección de los patógenos en alimentos puesto a que estos procesos deben ser adaptados al tipo de alimento que se desea analizar y al microorganismo que se debe detectar.

- Es importante que los organismos de control sanitario realicen inspecciones periódicas a los establecimientos tanto ambulantes como restaurantes con la finalidad de prevenir enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por patógenos puesto a que los mismos están dirigidos a personas que buscan alimentos de rápido acceso y consumo.

RECOMENDACIONES:

- Impulsar investigaciones futuras sobre el análisis de enfermedades transmitidas por alimentos a través del uso de tecnologías utilizando la PCR en tiempo real en pruebas diagnósticas moleculares obteniendo un gran flujo de datos fiables y precisos sobre los organismos estudiados.

- El consumo de alimentos de comida rápida debe poseer un monitoreo continuo del lugar de expendio desde su preparación hasta llegar al consumidor, debido a que los mismos pueden ser una de las causas principales de ciertas patologías que ponen en riesgo la salud.

- La alta especificidad y sensibilidad demostrada por la técnica molecular PCR en tiempo real utilizada en esta investigación, permite recomendar la utilización como estrategia de control, no solo de patógenos alimentarios sino en otras evaluaciones basadas en la identificación de ADN y ARN.

- En cada uno de los procesos mediante la utilización de la PCR en tiempo real como en cualquier otro método molecular es muy importante realizar cada paso con mucha precaución teniendo un adecuado y cuidadoso tratamiento de las muestras con la finalidad de obtener resultados fiables.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Albo, G., Apraiz, P., & Bedin, C. (2011). *Portafolio educativo en temas clave en Control de la Inocuidad de los Alimentos.* Buenos Aires: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) a través del Instituto Nacional de Alimentos (INAL). Organización Panamericana de la Salud.

2. Arenas, L.; Rodas, A.; Narváez, C.; Jerez, N.; Huerta, N.; Giuffrida, M. y Uzcátegui, S. (2009). *calidad microbiológica de las carnes y de los alimentos*. AGROTECNICO No. 25. Pág. 44.

3. Bustin,S.A. (2005). *Real-Time PCR. In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker.New York, p. 1131-1135

4. Castillo, A.; Mercado, I.; Lucia, M. L.; Martínez, R. Y.; De León, P. J.; Murano, A. E. and Acuff, R. G. (2004).*Salmonella contamination during production of cantaloupe: a binational study*. J. Food Prot. (USA). 67(4):713–720.

5. Chan, O, Wolf, M., Hepperle, D. and Casper, P. (2002). M*olecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria.* African J. of Biotechnology 2(12):710-713.

6. Chiluisa Utreras, V. (septiembre de 2006). *Determinación por PCR-ELISA de la reducción de la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de Onchocerca Volvulus,* l*uego de la distribución masiva de Ivermectina* (Mectizan®) *en las comunidades centinela del foco endémico principal del Río Cayapas en la provincia de Esmeraldas*, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.

7. Chiluisa-Utreras V., J. Coba y A. Echeverría. (2014). D*eterminación por PCR en Tiempo Real de Escherichia coli* en muestras de comida rápida. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 19(1): 44-50. ISSN: 1390-3799.

8. Clarridge JE. (2004).I*mpact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Clin Microbiol.

9. D´Aoust, J-Y. (2007). *Especies de Salmonella,* p. 133-163. En Doyle, M. P., L. R. Beuchart, and T. J. Montville (ed.) Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza

10. Dirección Provincial de Salud de Pichincha. (2012). *Reporte de los casos de Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos en la Provincia de Pichincha durante 2011 y 2012.* Quito.

11. Dussault,A.A. & Pouliot,M. (2006). Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. Biological Procedures Online 8: 1-10.

12. Edwards,K.J. (2004). *Performing Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; An Essential Guide.* K.J.Edwards et al., editors. Horizon Bioscience.Wymondham, p. 71-84.

13. Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. C. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill III, and T. F. Smith.(2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1): 165-256.

14. Hanna, S. E., C J. Connor, and H. H. Wang. (2005). *Real-time polymerase chainreaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations*. Journal of Food Science 70(3): 49-53.

15. Harris, L. J.; Zagory, D. and Gorny, R. J. (2002). Safety factors. *In*: Kader, A. (ed.). Postharvest technology of ovoproduct. Third Edition. University of California. Oakland, California, USA. p. 301–314.

16. Heid CA, Stevens J, Livak KL, Williams PM (1996) *Real time quantitative PCR. Genome Methods* 6:986–994.

17. Hein, I., G. Flekna, M. Krassnig, and M. Wagner. (2006). *Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested* by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods* 66: 538-547.

18. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) *Límite permisibles para alimentos de Salmonella spp. y carga microbiana* En Línea: http://www.normalizacion.gob.ec/ _ Consulta 12 de Septiembre 2014.

19. Jan, J. y LeBorgne, S. (2001). *Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana*. BioTecnologia 5(3):103-109.

20. Jiménez, J., Muñoz, A., & Delgado, D. (2010). *Fiebre tifoidea y otras infecciones por Salmonella.* México: Facultad de Medicina Universidad Autónoma de México.

21. Johnson,M., Petrauskene,O., Brzoska.P & Melancon.C. (2005). *Using Real-Time PCR for Pathogen Detection. Genetic Engineering* News 25. - Lee,M.A., Squirrell,D.J., Leslie,D.L. & Brown,T. 2004. Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: Real-Time PCR; An Essential Guide.

22. Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R.,Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthåhlberg, A., Zoric, N.,

2006), The real-timepolymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, Vol 27, pg: 95-125.

23. Lupien, J., & Flores, M. (2002). *Sistemas de Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).* Roma: Grupo Editorial, Dirección de Información de la FAO.

24. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. & Helmuth, R. (2003).Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 69, 290–296.

25. Mullis, K. B., and F. A. Faloona. (2006). S*pecific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology 155: 335-350.

26. Ortiz, R.; Gutiérrez, R.; Vega, S.; Díaz, G. y Schettino, B. (2008). C*ontaminación de los alimentos.* Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México. Pág. 7. Publicado en revista virtual RECITELA - v.8 n.1.

27. Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, et al. (1997). *"Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction."* Anal Biochem245(2): 154-160.

28. Roche Diagnosticsn (2010). LightCycler® foodproof *Salmonella spp. detection kit.* GmbH, Mannheim, Germany.

29. Rodriguez, R. (2011). *Programa Nacional para la Vigilancia, Control y Erradicación de Salmonella en Aves de Ecuador.* Quito: Editorial Universitaria.

30. Romo, L. (1973). *Estadística Descriptiva* .Quito: Editorial Universitaria.

31. Schinitman, N. (2005). *alimentos: prevención de su contaminación* (31/03/05). www.ecoportal.net/content/view/full/43716.

32. Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O´Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley. (2004). I*solation, characterization, and UVI-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and UVI-contaminated subsurface sediment and description of Salmonella subterranea sp.* nov. Applied and Environmental Microbiology 70(5): 2959-2965.

33. Valasek, M. A. and J. J. Repa (2005). *"The power of real-time PCR."* Adv Physiol Educ29(3): 151-159.

34. Wilhelm, J., and A. Pingoud. (2003). *Real-time polymerase chain reaction*. ChemBioChem 4: 1120-1128.

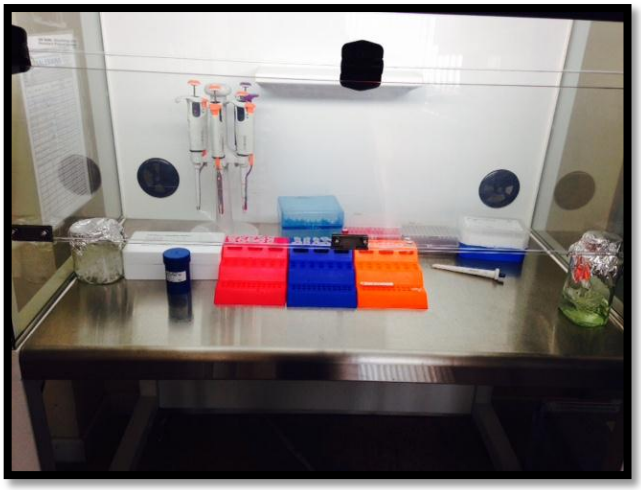
35. Wong, M., Medrano, J., (2005), Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*Vol 39, pg: 1-11

36. Yánez, E., Máttar, S., & Durango, A. (2008). *Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba.* Bogotá: Biblioteca Nacional de Salud "José Celestino Mutis".

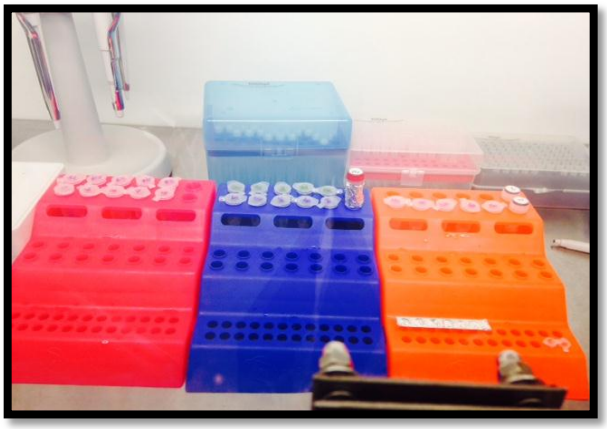
37. Zuckerkandl E, Pauling L. (2007).*Molecules as documents of evolutionary history*. J Theor Biol 1965;8:357-6 6

ANEXOS

Extracción de ácidos nucleicos



Anexo 1. Materiales y reactivos para la extracción de los ácidos nucleicos



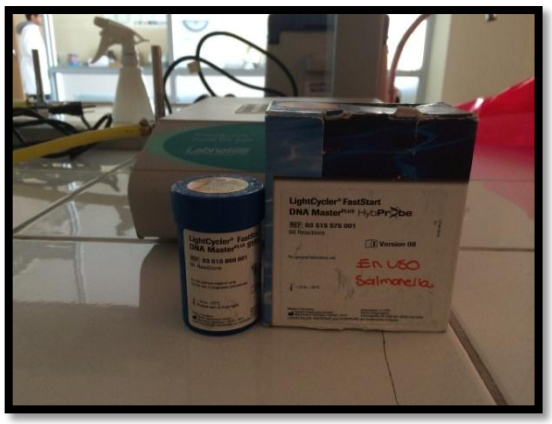
Anexo 2. Muestras de ADNr de 16S bacteriano y ADN de Salmonella sp.

Anexo 3. Kit de Preparación de muestras de alta pureza para PCR

Aplicación de la técnica de PCR en tiempo real

Curva estándar

Anexo 4. Diluciones seriadas de ADN de una cepa certificada (control interno)



Anexo 5. Master Mix Salmonella sp. (Master Plus Hybpobe)

Anexo 6. Master Mix ADNr 16S bacteriano (Master Plus Sbyr Green)

Anexo 7. Capilares de 20 µl

Equipos utilizados para la investigación

Anexo 8. PCR en tiempo real

Anexo 9. Ensamblaje de los capilares en el equipo

Anexo 10. Termobloque

Anexo 11. Aire acondicionado

Anexo 12. Termociclador

Anexo 13. Cámara de flujo laminar