



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

**“DETECCIÓN DE *Salmonella typhimurium* MEDIANTE UNA
TÉCNICA ENZIMÁTICA MOLECULAR RÁPIDA EN MUESTRA DE
CARNE DE RES”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

BACHILLER

Ponce Isidro, Elizabeth

ASESOR

Mg. Minaya Galarreta, Angélica

Lima-2016

Se dedica este trabajo a mis padres,
que han sido una inspiración y que
me han brindado su cariño y apoyo
durante toda la carrera profesional.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta tesis al Dr. Paul Mendoza Murillo, por el apoyo brindado antes, durante y después de la investigación.

RESUMEN

El estudio tiene como objetivo detectar *Salmonella typhimurium* mediante una técnica enzimática molecular rápida en muestra de carne de res, estandarizando este método y optimizando el tiempo y la sensibilidad con relación al método microbiológico; además se realizó el diagnóstico en estos tipos de carne para evaluar su calidad microbiológica. Un total de 30 muestras de carne, 15 inoculadas con *salmonella typhimurium* considerándose muestras positivas, y 15 muestras sin inocular considerándose muestras negativas. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar *Salmonella typhimurium*; asimismo, se validó esta técnica como punto de partida para futuras investigaciones y finalmente se realizó una observación cualitativa de ADN en gel de agarosa. El cálculo de sensibilidad y especificidad se realizó utilizando la tabla 2x2; El gen fliC reportó una especificidad del 100% y una sensibilidad del 86% revelado en la PCR. Un total de 13 muestras positivas se pudieron evidenciar con bandas de ADN, llegando a una conclusión que hubo presencia de ADN. El método desarrollado en el presente estudio demostró ser rápido y específico para la detección de *Salmonella typhimurium* para las carnes analizadas.

ABSTRACT

The study aims to detect *Salmonella typhimurium* by rapid enzymatic technique in molecular sample of beef, this method standardizing and optimizing time and sensitivity regarding the microbiological method; plus diagnosis was made in these type of meat to assess their microbiological quality. A total of 30 meat samples, 15 *Salmonella typhimurium* inoculated considered positive samples, and 15 samples inoculated negative samples considered. The sensitivity and specificity of PCR to detect *Salmonella typhimurium* was evaluated; Also, this technique was validated as a starting point for further research and finally a qualitative observation was performed on DNA agarose gel. The calculation of sensitivity and specificity was performed using 2x2 table; FLIC gene reported a specificity of 100% and a sensitivity of 86% revealed in the PCR. A total of 13 positive samples could show the DNA bands, reaching a conclusion that there was the presence of DNA. The method developed in this study proved to be rapid and specific for the detection of *Salmonella typhimurium* for meat analyzed.

INDICE

CÁRATULA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN	xii
CAPITULO I : PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	14
1.2 Formulación del Problema	15
1.3 Objetivos de la Investigación.....	15
1.3.1 Objetivo General	15
1.3.2 Objetivo Específico.....	15
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	16
1.4.1 Hipótesis General	16
1.4.2 Hipótesis Específico	16
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación	16
1.51 Justificación	16
1.5.2 Importancia.....	18

CAPITULO II : MARCO TEÓRICO	20
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	20
2.1.1 Antecedentes Nacionales.....	20
2.1.2 Antecedentes Internacionales	24
2.2 Bases Teóricas.....	29
2.2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	31
2.2.2 Aspectos Generales: <i>Salmonella sp</i>	32
2.2.3 Taxonomía	33
2.2.3.1 Clasificación clínica de <i>Salmonella sp</i>	34
2.2.3.2 Especie <i>Salmonella typhimurium</i>	35
2.2.4 Epidemiología	35
2.2.5 Microbiología.....	37
2.2.6 Genética.....	37
2.2.7 Patogenía.....	38
2.3 Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa(PCR)	38
2.3.1 Fundamento	38
2.3.2 Reactivos.....	40
2.3.3 Ciclos de Amplificación.....	42
2.3.3.1 Desnaturalización	43
2.3.3.2 Alineamiento.....	43
2.3.3.3 Extensión de la Cadena	43

2.3.4 Electroforesis.....	44
2.3.4.1 Aplicaciones en Acidos Nucleicos	45
2.3.4.2 Revelado y Visualización.....	45
2.3.5 Transiluminador.....	47
2.3.6 Tipos de PCR	48
2.4 Definición de términos Básicos	51
CAPITULO III : METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	53
3.1 Tipo de Investigación	53
3.1.1 Método.....	53
3.1.2 Técnica	53
3.1.3 Diseño.....	53
3.2 Población y Muestreo de la Investigación	53
3.2.1 Población	53
3.2.2 Muestra.....	54
3.3 Variables e Indicadores.....	55
3.3.1 Variable Independiente	55
3.3.2 Variable Dependiente	55
3.4 Técnica e Instrumento de Recolección de Datos	56
3.4.1 Técnica	56
3.4.2 Instrumento.....	58
3.5 Procedimiento	59

CAPITULO IV : PRESENTACIÓN,ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE	
RESULTADOS	67
4.1 Métodos Estadísticos Empleados	67
4.2 Análisis e Interpretación de Resultados	68
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIÓN	76
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	87

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Descripción de enfermedades transmitidas por alimentos.....	31
Tabla N° 2: Clasificación clínica y serológica de especies patógenas de <i>salmonella</i> de tipo tifoidea, No-tifoidea.....	34
Tabla N° 3: Primers del gen <i>fliC</i> para <i>Salmonella typhimurium</i>	61
Tabla N° 4: Cálculo de la preparación de MIX para PCR	62
Tabla N° 5: Tabla 2x2 para comparar los resultados.....	67
Tabla N° 6: Resultados en muestras no inoculadas	68
Tabla N° 7: Resultados en muestras contaminadas durante los 15 minutos...	70
Tabla N° 8: Resultados en muestras contaminadas durante los 30 minutos...	72

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Posibles causas de enfermedades transmitidas por alimentos.....	30
Figura N° 2: Inoculación de <i>Salmonella typhimurium</i> en muestras.....	60
Figura N° 3: Extracción de ADN mediante un Kit comercial.....	61
Figura N° 4: Preparación del MIX para PCR.....	62
Figura N° 5: Muestras en el Termociclador para la amplificación de ADN.....	63
Figura N° 6: Gel de agarosa.....	64
Figura N° 7: Corrida electroforética.....	65
Figura N° 8: Transiluminador.....	66
Figura N° 9: Gel de agarosa al 1.6%, en muestras negativas.....	69
Figura N° 10: Resultados en muestras positivas a los 15 minutos.....	71
Figura N° 11: Resultados en muestras positivas a los 30 minutos.....	73
Figura N° 12: Ciclos de ADN.....	87
Figura N° 13: Procedimiento.....	87

INTRODUCCIÓN

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 esto ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular **(5)**. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica in vitro utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas.

Las técnicas de PCR se han hecho indispensables para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal, y en la investigación de modelos de expresión de los genes. Más recientemente, la PCR ha permitido la investigación de nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica. Para comprender los principios de la PCR y sus aplicaciones, debe atenderse en primer lugar a la naturaleza de la molécula del ADN, su estructura y replicación sin embargo los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de estos patógenos, de origen alimentario, son laboriosos y consume mucho tiempo.

Esta situación, unida a la demanda por resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la plataforma más popular, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se

perfila como una técnica de gran aplicabilidad a futuro. Sin embargo, aun con todas las ventajas que ofrecen estas novedosas metodologías, no se deben pasar por alto sus limitaciones. Así, por ejemplo, los métodos moleculares no constituyen protocolos estandarizados, lo que dificulta su utilización en algunos casos. Por esta razón se debe trabajar arduamente para superar tales limitaciones y mejorar la aplicación de estas técnicas en matrices tan complejas como los sistemas alimenticios.(6)

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

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

Las condiciones actuales de mercados globalizados y la demanda de alimentos hacen necesario implementar técnicas rápidas y muy sensibles en el control de Enteropatógenos en los productos para consumo humano, antes de su liberación al mercado. La implementación de los métodos moleculares es necesaria, ya que las técnicas microbiológicas convencionales toman demasiado tiempo para la detección y la identificación de Salmonella (1). En este sentido, los métodos tradicionales resultan tardados y laboriosos para detectar e identificar cepas de Salmonella a través de procesos sucesivos que involucran caldos de enriquecimiento, cultivos en medios selectivos y por último el análisis de las propiedades metabólicas o serológicas de las colonias sospechosas, por esta razón esta técnica consume mucho tiempo y trabajo.

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos para la detección de Enteropatógenos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos; tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica molecular basada en la amplificación in vitro del DNA la cual ha demostrado alta sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos, incluyendo Salmonella en diferentes tipos de alimentos, y el tiempo requerido para obtener resultados pueden ser tan cortos como de 12 horas.(2)

Por estas consideraciones se desea estudiar la detección de *Salmonella typhimurium* mediante una técnica enzimática molecular rápida en muestras de carne de res.

1.2 Formulación del problema

¿Se podría detectar *Salmonella typhimurium* en carne de res mediante una técnica enzimática molecular rápida (PCR)?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar la detección de *Salmonella typhimurium* mediante una técnica enzimática molecular rápida (Reacción en cadena de la polimerasa) en muestras de carne de res.

1.3.2 Objetivos Específicos

✓ Objetivo Específico Primario

Determinar la especificidad de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestra de carne de res.

✓ Objetivo Específico Secundario

Determinar la sensibilidad de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella typhimurium* en muestra de carne de res.

1.4 Hipótesis de la Investigación

1.4.1 Hipótesis General

La técnica de PCR permitirá detectar *Salmonella typhimurium* en muestra de carne de res de manera rápida, sensible y específica.

1.4.2 Hipótesis Específicos

✓ Hipótesis Específico Primaria

La técnica de PCR será específica para *Salmonella typhimurium* en un 100%.

✓ Hipótesis Específico Secundario

La técnica de PCR será sensible para *Salmonella typhimurium* en un 98%.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

1.5.1 Justificación de la Investigación

Este proyecto se realiza debido a que la salmonelosis humana es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria tanto a nivel mundial como a nivel europeo y nacional y provoca graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias. Los huevos y los productos derivados del huevo constituyen el principal vehículo de las salmonelosis humanas, seguido de la carne y los productos lácteos. Aunque la venta de alimentos con presencia de *Salmonella* está prohibida es muy importante extremar las precauciones a la hora de manipular los alimentos en casa porque, como se ha comprobado en

este estudio, puede haber productos de venta al público con Salmonella. Los controles microbiológicos son imprescindibles para reducir el riesgo de contaminación de los consumidores por eso, es muy importante investigar métodos más eficaces. La PCR ha permitido la investigación de nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica.

La técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) ha revolucionado el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas. Este método, a diferencia de los métodos tradicionales que requieren 6 o 7 días para dar un resultado definitivo, permite obtener los resultados en sólo 1 a 3 días, dependiendo de diversas modificaciones en el protocolo de trabajo, permitiendo la detección e identificación rápida y precisa de Salmonella spp. Siendo una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación y servicios de Biología Molecular, para una gran variedad de aplicaciones como la clonación de ADN, la filogenia basada en ADN (determinación de la historia evolutiva de los organismos vivos), el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y pruebas de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas o virales, etc. Todas estas actividades requieren la comprensión adicional de conceptos relacionados con termoelectricidad, transferencia de calor y

procesos biológicos de PCR, que le dan un carácter multidisciplinario a este trabajo. El presente trabajo es el primero en su tipo en la unidad de detección de *Salmonella typhimurium* en muestra de carne y sentará las bases para la estandarización y prevalencia de este tipo de herramientas en investigación a futuras. Por lo cual se justifica la realización de este trabajo que facilitara en un futuro diseñar experimentos más confiables y evaluar los resultados efectivamente.

(16)

1.5.2 Importancia de la Investigación

La importancia de este proyecto es aplicar e informar este estudio a la población de que los avances tecnológicos, han desarrollado herramientas como la técnica de PCR, que permiten detectar con rapidez y sensibilidad la presencia de microorganismos contaminantes en carne y otros alimentos crudos o procesados.

En este sentido, la implementación y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de enteropatógenos como *Salmonella typhimurium* en carne de res que permitirá contar con una herramienta confiable y rápida, que permita contribuir a un control eficiente del proceso de producción, almacenamiento y venta, así como al monitoreo de las Buenas Prácticas de Manejo en la cadena productiva de la carne, y la toma de decisiones a corto Plazo a diferencia de las técnicas microbiológicas que actualmente se usan en los laboratorios autorizados, tardan de 5 a 10 días para conocer la presencia o ausencia de este microorganismo en los alimentos analizados. Estas

técnicas, basadas en el uso de medios de cultivos, consisten principalmente en el pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y la identificación serológica, con la que se concluye la identificación específica del patógeno, resultando en una desventaja cuando los resultados se necesitan rápidamente para la toma de decisiones es por ello la importancia de hoy en día la necesidad de optar un método de alta especificidad y sensibilidad de la detección y cuantificación de ADN específico de la bacteria blanco a partir de un número muy reducido de moléculas en la muestra y además de permitir la confirmación e identificación del diagnóstico bacteriológico.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.1.1 Antecedentes Nacionales

CAROLINA, PALOMINO CAMARGO, YUNIESKY GONZÁLEZ MUÑOZ, realizó una investigación sobre las técnicas moleculares para la Detección e identificación de patógenos en alimentos en el año 2010 Lima-Perú. Hace referencia a las desventajas y limitaciones de los principales métodos moleculares utilizados en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Para ello, se consideró la actualidad de la información consultada, el análisis objetivo de la temática y su alcance. La literatura reciente reporta un número significativo de técnicas moleculares, alternativas, sensibles y selectivas para la detección, enumeración e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la plataforma más popular, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se perfila como una técnica de gran aplicabilidad a futuro. Sin embargo, aun con todas las ventajas que ofrecen estas novedosas metodologías, no se deben pasar por alto sus limitaciones. Así, por ejemplo, los métodos moleculares no constituyen protocolos estandarizados, lo que dificulta su utilización en algunos casos. Por esta razón se debe trabajar arduamente para superar tales limitaciones y mejorar la aplicación de estas técnicas en matrices tan complejas

como los sistemas alimenticios. Por lo tanto, el desarrollo y la optimización de alternativas novedosas para el seguimiento, caracterización y enumeración de patógenos en alimentos es uno de los aspectos clave en la microbiología de alimentos (8), y se vuelve cada vez más importante para la agricultura, la industria alimentaria y los consumidores. Sin embargo el descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp, las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. Recientemente, se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación in vitro en tiempo real, biosensores y micro arreglos (9). Los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos.

Algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, además, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno, la segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR), la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros(10).

Enfocándonos a la PCR en cuanto a sus ventajas se concluye que son de mayor rapidez que los métodos basados en cultivos (4-24 h vs. 5-7 días), Alta especificidad y sensibilidad detecta varios patógenos al mismo tiempo, Automatizados. • Resultados precisos y exactos a partir de la detección genética específica, diferenciación de varios serotipos de microorganismos. Ejemplo: en el caso de *Salmonella* se pueden detectar 5-6 en una sola reacción por lo tanto en cuanto a las desventajas se concluye que existe una dificultad para distinguir entre células vivas y muertas, Técnicamente puede ser un reto optimizar las condiciones de PCR, Se requiere enriquecimiento para detectar células visibles, Se necesita procesamiento post-PCR de los productos electroforesis. (7)

LILIANA DEL POZO, NAZARIO SILVA, AUGUSTO VALENCIA, JAVIER SOTO, JUAN RIVEROS, ROSA SACSAQUISPE, ROGER CALDERÓN, VÍCTOR SUAREZ, realizaron estudios de un brote intrahospitalario por *salmonella typhimurium* identificado por PCR en el año 2006 en PERU. Hace referencia que las infecciones gastrointestinales siguen siendo un problema de salud pública mundial y entre los agentes patógenos responsables la *Salmonella* sp. es frecuente, este es un bacilo Gram negativo que causa enfermedad diarreica bacteriana, como resultado de ingerir alimentos

contaminados, particularmente los de origen animal. Aunque no es recomendable tratar con antibióticos las gastroenteritis producidas por este microorganismo, la medicación tiene indicaciones específicas para las complicaciones invasoras, tales como bacteriemias, sepsis, meningitis y otras. El uso inapropiado de antibióticos, de manera profiláctica, terapéutica y como promotores de crecimientos en granjas y alimentos de animales, es un factor importante en el desarrollo de resistencia bacteriana por patógenos. El constante uso inapropiado de antibióticos selecciona bacterias multirresistente, así como productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), lo cual facilita su transmisión entre pacientes hospitalizados. Así también, la detección de la BLEE en *Salmonella* es un fenómeno raro que se ha incrementado en los años recientes. En esta investigación, se ha analizado un brote intrahospitalario producido por *Salmonella typhimurium* productora de la BLEE, en la sala de lactantes del Hospital Nacional San Bartolomé, para determinar si los casos fueron contaminados e infectados por una única cepa que adquirió resistencia, dado que el primer aislamiento fue sensible a los antibióticos, mientras que los posteriores aislamiento del mismo paciente presentaron resistencia a los antibióticos probados. El ADN plasmídico fue aislado siguiendo un protocolo, en el cual las bacterias fueron sometidas a una lisis alcalina con NaOH-SDS y una precipitación con acetato de potasio. Posteriormente, el ADN fue precipitado con etanol y resuspendido en agua estéril. Los plásmidos extraídos fueron evaluados mediante electroforesis en agarosa al 1% y

registrados fotográficamente la técnica utilizada fue médiате mediante PCR. Se determinó que existen por lo menos dos genotipos entre los aislamientos de *Salmonella typhimurium* intrahospitalaria, siendo el aislamiento índice diferente a los otros casos. Se llega a la conclusión que la presencia de un brote intrahospitalario de diarrea aguda producida por *Salmonella typhimurium*, en el hospital, fue confirmado por medio de los hemocultivos y coprocultivos utilizando la técnica de PCR. (11)

2.1.2 Antecedentes Internacionales

LUZ CHACÓN, KENIA BARRANTES, CRISTINA GARCIA, ROSARIO ACHI, realizaron una investigación sobre, estandarización de una PCR para la detección de *salmonella spp.* En muestras de lechuga, en el año 2006 en Venezuela. Hace referencia que la *Salmonella spp.* Es un patógeno bacteriano muy importante causante de diarreas, que es transmitido tanto por la vía fecal-oral, como por alimentos y agua contaminados. En este trabajo se estandarizó una técnica de PCR en lechuga para la detección del gen *invA* de *Salmonella spp.*; dicho gen se relaciona con el proceso de invasión al epitelio intestinal. Con la PCR desarrollada en este trabajo se logró estandarizar un método que permite la amplificación del gen *invA* con una detección de 102 UFC para el procesamiento de las muestras de lechuga y la estandarización de la PCR se utilizó una cepa de *Salmonella* entérica serovariedades Enteritidis (ATCC 13076). Para las pruebas de especificidad de la PCR se utilizaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Shigella flexneri*. Se utilizaron 13 muestras. Las porciones de 25 g de lechuga fueron contaminadas intencionalmente con *Salmonella*, se incubaron por 24 horas a 35°C, para la extracción del ADN del sedimento de células. Para la extracción del ADN: Se separó una fracción de 1 ml del caldo de pre-enriquecimiento, tanto de las lechugas contaminadas con concentraciones conocidas de *Salmonella* spp., La extracción del ADN se realizó por choque térmico. Esta técnica de PCR mostró ser reproducible, específica y sensible para la detección de *Salmonella* spp. Es recomendable que la estandarización de una PCR se realice en cada laboratorio y para cada matriz utilizada; en nuestro caso, el protocolo original tuvo que modificarse considerablemente para que se adaptara a las condiciones del laboratorio. (manuscrito en preparación) utilizando como base el presente protocolo, uno de los más utilizados es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite la detección de microorganismos en los alimentos en menor tiempo si se compara con las técnicas de cultivo convencional. Entre los factores limitantes de la PCR están las numerosas sustancias inhibitorias que pueden encontrarse en la matriz del alimento (hemoglobina, lactoferrina, polisacáridos y grasas); además, la detección del ADN de un patógeno, no asegura la viabilidad del mismo en la muestra al momento del análisis, lo que representa una desventaja con respecto al cultivo convencional. Por otra parte, el aislamiento por cultivo en alimentos no asegura que el microorganismo aislado posea los determinantes de virulencia necesarios para producir infección y

enfermedad en un hospedero susceptible. Teniendo como objetivo este estudio la obtención de un método de PCR capaz de identificar de forma directa genes asociados a la virulencia de *Salmonella spp.*, como herramienta adicional al diagnóstico tradicional de este patógeno, y que además brinde información importante en términos de salud pública en un corto plazo. Se concluye que la comparación cualitativa del método de PCR con el cultivo convencional, mostró una mayor eficiencia del PCR en cuanto a tiempo de procesamiento de muestra y obtención de resultados (36 a 48 horas), comparado con la técnica de cultivo (5-6 días). El nivel de detección fue el mismo para ambos métodos (10² UFC/25 g), marcando la diferencia básicamente el tiempo necesario para la obtención de resultados. Cabe destacar que la secuenciación del producto obtenido corrobora que el método de PCR detecta el gen *invA* de diferentes serovariedades de *Salmonella* entérica, lo cual garantiza la especificidad del método estandarizado y además es un requisito para la validación de cualquier método molecular para el diagnóstico de patógenos en alimentos, conforme a lo recomendado a nivel internacional.(3)

CM PÉREZ, MM SÁNCHEZ, S HENAO, realizaron una investigación de estandarización y evaluación de dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella* entérica subespecie entérica en huevos, En el año 2008 en Colombia. Hace referencia que la *Salmonella* infecta animales y humanos, siendo las aves de corral y sus derivados fuentes de transmisión; por lo tanto, la

detección de *Salmonella* es importante para evitar infección. Los cultivos microbiológicos son usados para identificar la bacteria pero presentan limitaciones, por esto se han desarrollado alternativas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para detectar rápida y específicamente *Salmonella*. El objetivo de este trabajo fue estandarizar en huevos una PCR para el género *Salmonella* y una PCR múltiple para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Se estudiaron 144 muestras de huevos: 36 lavados de cáscara externa, 36 de clara-yema, 36 clara-yema más agua peptonada y 36 lavados de cáscara interna. Adicionalmente, 24 muestras de clara-yema fueron infectadas independientemente con 4 serotipos de *Salmonella*. A todas las muestras se les realizó extracción de ADN, PCR para el gen *hilA* y PCR múltiple. Para el inóculo de 10^6 UFC/ml, la PCR para *hilA* mostró una sensibilidad de 70,83% y una especificidad de 100%. Para la PCR múltiple se obtuvo una sensibilidad de 75% y una especificidad de 98,4%. Ambas pruebas de PCR pueden detectar 0,27 μ g/ml de ADN. Estas pruebas presentan gran potencial para detectar y controlar las salmonelosis transmitidas por huevos. Se requieren estudios adicionales para aumentar la sensibilidad y aplicarlas en el campo avícola e industria alimenticia. **(4)**

MONZERRAT, ROSAS ESPEJEL, realizó una investigación de estandarización y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo. En el estado de México. En el año 2014. El estudio tuvo como objetivo estandarizar

y validar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Salmonella typhimurium* (St) en carne de cerdo, res y pollo, optimizando el tiempo y la sensibilidad con relación al método microbiológico; además se realizó el diagnóstico en estos tipos de carnes para evaluar su calidad microbiológica en la Ciudad de Texcoco. **(39)** Un total de 60 muestras de carne (20 de cerdo, 20 de res y 20 de pollo) de 250 g fueron recolectadas en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco. **(40)** Las muestras recolectadas procedían de carnicerías, tianguis y supermercados. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar St; asimismo, se validó esta técnica en relación al método microbiológico con base al nivel de concordancia y finalmente se realizó un diagnóstico de la incidencia de St. El cálculo de sensibilidad y especificidad se realizó utilizando la tabla 2x2; el nivel de concordancia se estableció utilizando la prueba de McNemar y el índice Kappa, y el nivel de incidencia de St. fue calculado con el uso de frecuencias y el porcentaje de muestras contaminadas. **(41)** La concentración mínima de detección de DNA fue de 0.310 ng μL^{-1} . El gen *InvA* y el gen *fliC* mostraron una sensibilidad y especificidad del 100% revelado en la PCR. Se obtuvo un nivel de concordancia entre la PCR y el método microbiológico del 88% para la carne en general. Un total de 10, 5 y 10% de carne de cerdo, res y pollo respectivamente, analizadas por PCR fueron positivas a St. Ninguna de las muestras de supermercado fue positiva a St. **(42)** El método desarrollado en el presente estudio demostró ser

rápido y específico para la detección de Salmonella typhimurium para los tipos de carnes analizadas. **(43)**

2.2. Bases Teóricas

2.2.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, toxinas, venenos naturales o sustancias químicas dañinas, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. **(17)**

Las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control.**(18)** Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunodeprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA. **(19)** Existen numerosos tipos de ETA que presentan sintomatologías variables, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas

neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto (*Listeria monocytogenes*) y en casos extremos, la muerte. Las causas más comunes son intoxicaciones e infecciones. En el siguiente esquema se muestran algunas de las posibles causas que contribuyen a la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos. **(20)**



Figura 1.- Posibles causas de enfermedades transmitidas por Alimentos (Cervantes 2008)

Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, las de mayor incidencia son las causadas por microorganismos. Siendo los principales agentes causales *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Escherichia coli*, las dos últimas se reportan principalmente en productos lácteos y cárnicos. En Tabla1. Se muestran las características de las principales enfermedades alimentarias. **(21)**

Enfermedades transmitidas por alimentos

BACTERIA	SINTOMAS	PRINCIPALES ALIMENTOS	INCUBACION
<i>Salmonella</i>	Dolor abdominal, diarrea, escalofríos, vomito frecuente y debilidad.	Lácteos, pollo, carnes, pescado, huevo	6 a 72 h
<i>E. Coli</i>	Dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, vomito.	Carne molida, agua contaminada, leche y alimentos preparados.	12 a 72 h
<i>Vibrio cholera</i>	Diarrea abundante y acuosa, vomito, deshidratación rápida que puede causar la muerte.	Agua contaminada, alimentos en contacto con agua contaminada, manos sucias y moscas.	24 a 28 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nausea, vomito dolor de cabeza, meningitis y abortos.	Lácteos, vegetales crudos, carne de res y cerdo mal cocido.	1 a 20 d

Tabla 1. Descripción de enfermedades transmitidas por alimentos, síntomas, bacterias e incubación (Gutiérrez, 2008)

Adicionalmente, se han presentado brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella enteritidis* en huevo, *Salmonella typhimurium* en alimentos de origen animal. **(22)**, *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC) en carnes y vegetales. **(23)**, *Listeria monocytogenes* en carne y quesos. **(24)**, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdos y aves, *Shigella dysenteriae* en agua y *Cronobacter sakazakii* en productos lácteos deshidratados. Entre los reemergentes

se encuentra *Vibrio cholerae* O1, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos de origen marino. (25)

Las ETA no solo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino que también imponen una carga sustancial en los sistemas de salud y reducen notablemente la productividad económica del país. Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados.

2.2.2 Aspectos generales: *Salmonella* sp.

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi* ni esporas). Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo. Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar; también por vía sexual. El hábitat natural de esta especie normalmente es en los intestinos de cualquier tipo de animal homeotermo (incluidos seres humanos). Se distinguen 7 distintos subgrupos, cada cual con su fenotipo definido y son serotipificados por antígeno O somático, Vi de superficie y antígenos flagelares fase I y II. Según última clasificación, se establece la

siguiente nomenclatura estimándose que el 99% de los aislamientos en clínica corresponde a al subgrupo. Los miembros del grupo *Salmonella* son gérmenes patógenos causantes de síntomas clínicos en humanos y en animales. No todos los serotipos son igualmente patógenos para humanos y animales por lo que desde el punto de vista de salud pública es importante su identificación final. La naturaleza de la enfermedad varía de acuerdo al serotipo y es así que *S.Typhi* y *S.Paratyphi* producen cuadros septicémicos y fiebres entéricas y otros serotipos producen síntomas como náuseas vómitos, dolor abdominal, fiebre y diarrea.(26)

2.2.3 Taxonomía

- Reino: Bacteria.
- Filo: Proteobacteria.
- Clase: Gammaproteobacteria.
- Orden: Enterobacteriales.
- Familia: Enterobacteriaceae
- Género: Salmonella.

Especies

- *S.bongori*
- *S. entérica*
- *S.choleraesuis*
- *S.enteridis*
- *S.nyansa*
- *S.paratyphi*

- *S. typhi*
- *S. typhimurium*
- *S. Virginia*

2.2.3.1 Clasificación clínica de especies de salmonella.

La clasificación más reciente de Salmonella, basada en la secuenciación de DNA, considera. Solamente 2 especies: *S. enteritica* y *S. bongori*, subdivididas en subespecies y serovares. *S. enteritica* serotipo *typhi* aún se identifica en algunos textos como *S. typhi*.

Clasificación clínica y serológica de especies patógenas de Salmonella. Ejemplo.			
Clínica	Serotipo	Nombre	Serogrupo
Tifoídica	Typhi	Salmonella enterica, subsp. enterica, serotipo Typhi	D
	Paratyphi A	S. enterica, subsp. enterica, serovar Paratyphi A	A
	Paratyphi B	S. enterica, subsp. enterica, serovar Paratyphi B	B
	Paratyphi C	S. enterica, subsp. enterica, serovar Paratyphi C	C
No-tifoídica	Typhimurium	S. enterica, subsp. enterica, serovar Typhimurium	B
	Enteritidis	S. enterica, subsp. enterica, serovar Enteritidis	D
	Newport	S. enterica, subsp. enterica, serovar Newport	C

Tabla 2. Clasificación clínica y serológica de especies patógenas de Salmonella de tipo tifoidea, No-tifoidea. (Saunders, 2013)

La fiebre tifoidea es una infección sistémica causada por *Salmonella enteritica* serovar *typhi* (*S. typhi*), la causa más común de fiebre entérica, que también incluye a la fiebre paratifoidea, ocasionada por *S. paratyphi* A, B y C. Los serotipos de *Salmonella typhi* y *paratyphi* son patógenos comunes en países en desarrollo. (27)

2.2.3.2 Especie de *Salmonella typhimurium*

Salmonella entérica, subgrupo *entérica* serotipo *typhimurium* (*Salmonella typhimurium*). El nombre *entérica* está asociado al intestino. La salmonella es un bacilo gramnegativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La causa más común del envenenamiento de comida por especies de *Salmonella* es la *S. typhimurium*. En humanos, *S. typhimurium* no causa una enfermedad tan severa como la *S. typhi* (otra variación de *Salmonella* que causa la fiebre tifoidea) y normalmente no es fatal. La enfermedad se caracteriza por causar diarreas, dolores abdominales, vómitos y náuseas, y suele durar unos siete días. Desafortunadamente, en personas cuyo sistema inmune esté comprometido, como es el caso de las personas de edad, jóvenes y personas con el sistema inmune deprimido, la infección por la salmonella termina siendo fatal si no se trata a tiempo con antibióticos.

2.2.4 Epidemiología

La salmonelosis es una enfermedad bacteriana que comúnmente se manifiesta por enterocolitis aguda, con la aparición repentina de cefalea, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómito. La deshidratación, especialmente en los lactantes y en los ancianos, puede ser grave. Casi siempre hay fiebre. Rara vez es mortal, excepto en los niños de muy corta edad, las personas de edad muy avanzada y los individuos debilitados o inmunodeprimidos. Sin embargo, la morbilidad y los costos derivados de la salmonelosis pueden ser altos.

La excreción del microorganismo por las heces suele persistir durante varios días o semanas después de la fase aguda. Agente infeccioso.- Numerosos serotipos de Salmonella son patógenos para los animales y las personas. Los dos microorganismos notificados con mayor frecuencia son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. La distribución es Mundial. Donde los sistemas de notificación son mejores, parece que la morbilidad es mayor. La salmonelosis se clasifica como una enfermedad de origen alimentario porque los alimentos contaminados, principalmente los de origen animal, constituyen el modo predominante de transmisión. Desde el punto de vista epidemiológico, la gastroenteritis por Salmonella puede presentarse en pequeños brotes en la población general; sin embargo, no es raro que aparezcan brotes en colectivos como hospitales, Guarderías o colegios, restaurantes, residencias de ancianos, etc.

El Reservorio son los animales domésticos y silvestres, entre ellos aves de corral; ganado porcino y bovino; roedores y mascotas tales como, perros y gatos; también el ser humano: pacientes, portadores convalecientes y, en especial, casos leves y no diagnosticados. Se transmite por ingestión de los microorganismos en un alimento derivado de animales infectados, o contaminado por las heces de un animal o persona infectados. Esto incluye huevos crudos o mal cocidos y sus derivados; agua contaminada; carne y sus derivados; aves de corral y productos avícolas. El origen de algunos brotes de salmonelosis se ha relacionado con el consumo de frutas y hortalizas

crudas que se contaminaron al cortarlas para servir las. La infección se transmite a los animales de granja a través de alimentos y fertilizantes preparados materias primas contaminadas Es importante la transmisión fecal oral de persona a persona, en especial cuando hay diarrea. El Periodo de incubación va desde 6 hasta 72 horas; por lo regular de 12 a 36 horas. La transmisibilidad abarca todo el curso de la infección; es sumamente variable, por lo común de varios días a varias semanas. A veces, el estado de portador temporal se prolonga varios meses, especialmente en los lactantes. La Susceptibilidad es general y suele acentuarse por la aclorhidria, el tratamiento con antiácidos. **(28)**

2.2.5 Microbiología

Salmonella crece con facilidad en agar macconkey formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología clínica se aísla con medios selectivos, Selenito, SS (*agar Salmonella-Shigella*) o XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato). **(29)**

2.2.6 Genética: Gen fliC para *Salmonella typhimurium*

El flagelo de *Salmonella entérica serovar typhimurium* se compone de un filamento rígido, helicoidal de aproximadamente 20.000 subunidades de flagelina idénticos que se extiende hasta 10 micrones de la célula **(34)**. El filamento está unido a un motor rotativo de iones impulsado por las estructuras de gancho y varilla del cuerpo de gancho basal flagelar. El gancho es una estructura flexible que actúa como una junta universal para transmitir energía de rotación desde el motor

hasta el filamento (35). La varilla actúa como el eje de accionamiento, que penetra a través de las capas de peptidoglicano y lipopolisacárido (36). Siendo el *fliC* gen flagelina codificador principal del flagelo de *Salmonella entérica serovar typhimurium*.

2.2.7 Patogenia

Produce salmonelosis con un período de incubación de entre 5 horas y 5 días, diarrea y dolor abdominal. A través de las heces (excremento) del enfermo se elimina gran cantidad de bacteria, y se presenta fiebre entérica con un periodo de incubación de 7 a 28 días, causante de dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y diarrea, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas y las personas curadas eliminan *Salmonella*. También puede ocasionar fiebres entéricas o infección intestinal por intoxicación con algunos alimentos.

2.3 Técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa

2.3.1 Fundamento

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. La reacción en cadena de

la polimerasa fue perfeccionada por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California, en la década de 1980.

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent). Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado Termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier (efecto termoeléctrico), que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los Termocicladores tienen un sistema

que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los termocicladores más antiguos carecían de este sistema y solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos. Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas.(31)

2.3.2 Reactivos

Para realizar la técnica se necesitan: (32)

- **Buffer de Amplificación:** Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂, el MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores. La concentración óptima de MgCl₂ depende de las concentraciones de los otros componentes (1.5 mM en 200 mM de dNTP), no obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

- **Oligonucleótidos Iniciadores – Cebadores-Primers.** A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir: la longitud de cada uno de los primers debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que cebadores de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad. Ambos primers deben tener una T_m (temperatura de desnaturalización) similar la diferencia máxima entre ambas temperatura debe ser de 5°C , la relación entre las bases púricas y las bases pirimidínicas debe ser 1:1 (por mucho 40-60%), la secuencia de los primers debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas. Para evitar la formación de dímeros de primers es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí.
- **Desoxinucleótidos Trifosfatos-dNTP** es el sustrato para polimerizar nuevo ADN, son los diferentes nucleótidos que utiliza la ADN polimerasa para copiar el fragmento de ADN que se va a amplificar, la concentración de dNTPs y de MgCl_2 van relacionadas ya que el Mg^+ se une a los dNTPs.
- **ADN Polimerasas y ADN molde las ADN polimerasas** son las enzimas que permiten la amplificación de los fragmentos de ADN, se caracterizan por ser termoestables, es decir, que mantienen su actividad enzimática aún en altas temperaturas (94°C), algunas polimerasas presentan actividad transferasa terminal en el extremo 3' de la cadena en donde agrega una adenina (A) si en este se

encuentra una citosina (C), la polimerasa más utilizada en PCR es la Taq polimerasa, proveniente de la especie *Thermus aquaticus*; la actividad de esta enzima se ve influida por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes, de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. Finalmente, El ADN molde, es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, por lo tanto, el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas, puede ser cadena simple (ssADN) o doble (dsADN).

- **Iones divalentes.** Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.

2.3.3 Ciclos de Amplificación

La PCR básica consta de un primer paso de calentamiento (94-95°C) durante 5-10 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa, posteriormente tiene tres pasos que se repiten, la unión de esos tres pasos se denomina Ciclos de Amplificación, un ciclo consiste de:

- Desnaturalización.
- Alineamiento - Unión del cebador.

- Extensión de la cadena.

2.3.3.1 Desnaturalización

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. Otros métodos, raramente empleados, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

2.3.3.2 Alineamiento

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda (generalmente, a 55 °C, aunque se puede variar según sea el caso entre 45°C y 65°C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

2.3.3.3 Extensión de la cadena

Por último actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. Se aumenta la temperatura hasta 72 °C, temperatura a la cual la ADN polimerasa presenta su máximo de actividad, produciéndose una copia del fragmento que se desea amplificar.

2.3.4 Electroforesis en gel de Agarosa

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas biomoléculas (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables que en solución presentan carga eléctrica y que se van a separar en función de dicha carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. Por lo tanto la electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar ácidos nucleicos. Los geles se colocan en una cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH ~8, de forma que las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa (grupos ionizables = grupos fosfato). Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. La movilidad electroforética de un fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (del número de pares de bases). Los polímeros más utilizados son poliacrilamida y agarosa. Se usan geles de poliacrilamida para separar fragmentos de hasta unos mil pares de bases, y geles más porosos, de agarosa, para resolver mezclas de fragmentos mayores. La agarosa es un polímero lineal, procedente de las algas rojas, en el que se alternan D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa.

2.3.4.1 Aplicaciones en Acido Nucleicos

En los ácidos nucleicos la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo, y esto es debido a la carga negativa presente en el esqueleto azúcar-fosfato. En los fragmentos de ADN dobles (con estructura de doble hélice) la velocidad de migración es inversamente proporcional a su tamaño. En fragmentos simples de ADN y ARN (una sola cadena), dichas moléculas tienden a plegarse de forma compleja y a migrar de forma más complicada, según la estructura terciaria formada tras el plegamiento. Sin embargo, compuestos que puedan romper los enlaces de puente de hidrógeno, como el hidróxido de sodio o la forma mida, son empleados para 'desplegar' las moléculas plegadas y permitir que la velocidad de migración dependa únicamente y exclusivamente del tamaño y no de la estructura formada tras el plegamiento.(37)

2.3.4.2 Revelado y visualización

Cuando se ha completado la electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo. Entonces se pueden 'revelar' mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Se emplean compuestos como el bromuro de etidio, para los ácidos nucleicos, o tinción de plata, azul de coomassie o tinción fluorescente, para las proteínas. Asimismo se emplean otros métodos para visualizar la

separación de la mezcla en el gel. Si el reactivo es fluorescente bajo la luz UV, se puede simplemente hacer una fotografía de la placa bajo dicha luz. También, si las moléculas contienen átomos radiactivos se puede efectuar una autorradiografía. Si se han inyectado varias mezclas una junto a otra en la placa, se producirán separaciones paralelas (carriles). Cada carril mostrará distintas bandas correspondientes a cada componente de la mezcla. Si dos componentes poseen la misma masa las separaciones serán incompletas, por lo cual ambas bandas se verán solapadas. Las bandas en Cuando se ha completado la electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo. Entonces se pueden 'revelar' mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Se emplean compuestos como el bromuro de etidio, para los ácidos nucleicos, o tinción de plata, azul de coomassie o tinción fluorescente, para las proteínas. Asimismo se emplean otros métodos para visualizar la separación de la mezcla en el gel. Si el reactivo es fluorescente bajo la luz UV, se puede simplemente hacer una fotografía de la placa bajo dicha luz. También, si las moléculas contienen átomos radiactivos se puede efectuar una autorradiografía. Si se han inyectado varias mezclas una junto a otra en la placa, se producirán separaciones paralelas (carriles). Cada carril mostrará distintas bandas correspondientes a cada componente de la

mezcla. Si dos componentes poseen la misma masa las separaciones serán incompletas, por lo cual ambas bandas se verán solapadas. Las bandas en diferentes carriles que se encuentran a la misma altura contienen moléculas que han atravesado el gel a la misma velocidad. Existen marcadores especiales que contienen una mezcla de moléculas de tamaño conocido. Si se hace una electroforesis de una mezcla desconocida y se agrega un carril con un determinado marcador, las bandas observadas en el marcador pueden ser comparadas con las obtenidas en la mezcla desconocida para determinar su tamaño o punto isoeléctrico. Sabiendo que el desplazamiento de las moléculas es proporcional al logaritmo de la masa, se puede estimar el peso molecular de una molécula de interés comparándola con el patrón de migración de los marcadores. Esto se realiza construyendo una curva con los valores del marcador, donde el eje (y) representa el logaritmo del peso molecular y el eje (x) representa el R_f de cada banda. Luego, se calcula el R_f de la molécula incógnita y se extrapola en la curva el logaritmo del peso molecular. Aplicando el antilogaritmo se obtiene el peso molecular de la proteína incógnita.

2.3.5 Transiluminador

El Transiluminador sirve para la visualización de bandas fluorescentes de proteína y *DNA* en geles electroforético. Para la visualización y fotografía de bandas fluorescentes de proteína y *DNA* en geles

electroforéticos comprende por lo menos una fuente de luz, un filtro de excitación sobre el que se coloca un *gel* electroforético a analizar que contiene bandas de proteína o DNA teñidas con colorantes fluorescentes, y por lo menos un filtro de detección, que se caracteriza por el hecho de que dicha fuente de luz emite radiación visible, dicho filtro de excitación seleccionan un intervalo de longitudes de onda comprendido dentro de la región visible y dicho *filtro* de detección presentan transmisión a longitudes de onda superiores a las de dicho intervalo. En conclusión el Transiluminador es un equipo necesario que usa en principio luz UV con diferentes longitudes de onda como recurso para observar, analizar y tomar fotografías de proteínas, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos en geles de agarosa con colorantes como el bromuro de etidio.

2.3.6 Tipos de PCR

- PCR anidada

Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es muy específica.

- PCR Multiplex

Es un tipo de PCR en el cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción, en este tipo de PCR se utilizan múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos, los amplificados pueden verse como múltiples

bandas en un gel, este tipo de PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico.

□ PCR in situ

Es una PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos, consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. En la técnica de in PCR-in situ se realiza primero amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación in situ convencional con sondas ADN/ARN. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma.

□ PCR tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR)

Permite cuantificar, la cantidad de ADN o ARN amplificado en cada momento. Para la detección de la cantidad de ADN específico se emplea una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorear el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés melting temperature). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas. En las técnicas basadas en fluorocromos el ADN, que se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el Termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización. Es mucho más económica que la que usa sondas específicas. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen. La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la

PCR realizada en tiempo real (Q-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación del ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con Q-PCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (Termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado.

2.4 Definición de Términos Básicos

- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- **Especificidad:** se refiere a la obtención de un solo producto amplificado. Viene determinada por los oligos y la especificidad con la que se unen al ADN molde. De esta forma, si los oligos tienen más de un sitio al que se pueden unir aparecerá más de un producto amplificado.
- **Sensibilidad:** se refiere a la cantidad mínima de ADN necesaria para que se produzca la amplificación, es decir, para obtener una banda. Se relaciona con los falsos negativos, ya que puede que una muestra sea positiva pero sea dada como negativa porque no se ha amplificado por no tener suficiente cantidad de ADN.
- **Inhibición de la PCR:** puede haber agentes que interfieran en el correcto transcurso de la PCR. Requerirá un procesamiento adicional de la muestra para eliminar estos compuestos del medio antes de preparar la

mezcla de PCR. Tanto la sangre como el semen contienen este tipo de inhibidores, por lo que es necesario una purificación previa.

- **Polimerasa *Taq***: es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq).
- **Primers**: Un partidor, cebador, iniciador o *primer*, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.
- **Fuente de Poder**: se hace referencia al sistema que otorga la electricidad imprescindible para alimentar a equipos como ordenadores o computadoras.

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de Investigación

Descriptiva

Debido a que se describe las características y fenómenos que ocurren en la investigación.

3.1.1 Método

Inductivo

Debido a que se elabora resultados y conclusiones a partir de hechos observados.

3.1.2 Técnica

Prospectiva-Transversal

Prospectiva: Debido a que este estudio se utilizara en investigaciones futuras

Transversal: Debido a que se recolectan datos en una sola observación en un determinado tiempo(Es como tomar una fotografía a algo que sucede).

3.1.3 Diseño

No experimental

3.2 Población y muestreo de la investigación

3.2.1 Población

Carne de res que se expende en el “mercado de las brisas “del distrito de Ceres-Ate.

3.2.2 Muestra

Formula

$$n = \frac{T^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

n = Tamaño de la muestra

t = Valor estándar

p = Prevalencia estimada de la *Salmonella typhimurium* 0.02%

m = error (valor estándar 0.05)

Reemplazando valores

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.02(1-0.02)}{(0.05)^2}$$

$$n = \frac{0.07526}{0.0025}$$

$$n = 30$$

30 muestras carne, 15 muestras como positivas inoculadas con *Salmonella typhimurium* y 15 muestras como negativas las no inoculadas.

3.3 Variables e Indicadores

Variable Independiente (X):

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella entérica</i> Género: Salmonella	Especie: <i>S. typhimurium</i>
	Produce gastroenteritis en los seres humanos, referida como Una salmonelosis.	Los síntomas principales son diarrea, vómito, dolor abdominal y calambres.

Variable Dependiente (y):

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES
Técnica enzimática molecular rápida (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	Se determinara la sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i>	Concentración mínima de detección.
	Se determinara la especificidad de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella typhimurium</i>	Diseño o conteo de Cebadores –Primers.
		No detecta otras especies de <i>Salmonella spp.</i> U otras especies enteropatógenos.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Técnica

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La utilización del método Molecular es un gran apoyo para obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor tiempo posible. La técnica llamada Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) inventada por Kary Mullis a mediados de la década de 1980, es una nueva técnica que se emplea para amplificar fragmentos específicos de ADN sin la necesidad de células bacterianas, tomando como base el mecanismo de replicación in vivo del ADN. **(13)**

La reacción consiste en la amplificación o replicación enzimática in vitro de un fragmento de ADN. En el procedimiento básico del PCR, la muestra de ADN se mezcla con una alícuota de polimerasa Taq y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de dos fragmentos sintéticos cortos de ADN (oligonucleótidos) que son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que va a amplificarse. Los oligonucleótidos o primers sirven como cebadores a los que se agregan los nucleótidos durante los pasos siguientes de replicación. Luego la mezcla se calienta a unos 93°C, que es lo bastante caliente para hacer que las moléculas de ADN de la muestra se separen en sus dos cadenas componentes. A continuación la mezcla se enfría a unos 60°C para permitir que los cebadores se unan a las cadenas de ADN blanco y la temperatura se

eleva a 72° C para que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3' de los cebadores. **(13)**

De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy baja cantidad de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica sencilla empleada de forma rutinaria en laboratorio para separar moléculas biológicas especialmente ADN, ARN y proteínas.

La electroforesis es una técnica habitual en el laboratorio clínico. Permite separar especies químicas (ácidos nucleicos o proteínas) a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica. Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, tienen por naturaleza carga negativa. Si ponemos fragmentos del ADN extraído de una muestra biológica sobre un soporte poroso (gel) y aplicamos un campo eléctrico, se producirá la migración diferencial de los fragmentos a través de los poros de la matriz. La tinción del gel con bromuro de etidio, que es una sustancia fluorescente que se intercala en la molécula de ADN, y la exposición con luz ultravioleta, permite observar el resultado de ésta migración. El tamaño de los fragmentos de ADN se puede estimar comparándolos con el patrón de bandas que se obtiene de marcadores comerciales de peso molecular conocido. La electroforesis de ADN es útil para comparar patrones de bandas de diferentes muestras biológicas. Así por ejemplo

se puede usar para comparar muestras de individuo sano frente a individuo enfermo, para la identificación de ácidos nucleicos de agentes infecciosos o para la obtención de un fragmento determinado de ADN que, una vez localizado en el gel, puede ser extraído para análisis posteriores.

3.4.2 Instrumentos

- Centrifuga
- Cámara de Electroforesis horizontal
- Fuente Poder
- Tubos Eppendorf
- Transiluminador ultravioleta
- Congelador 4° C y -20°C
- Baño María – Vortex
- Micropipetas P10, P50, P200
- Balanza
- Incubadora
- Autoclave
- Tubos de microcentrifugas
- Tips para reactivos
- Cocinilla de laboratorio

3.4.3 Reactivos e Insumos

- Agar macconkey
- Caldo nutritivo
- Cepas de *Salmonella typhimurium*
- Enzima proteinasa K
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Taq ADN polimerasa
- Agua para PCR
- Buffer Electroforesis TBE 1X
- Kit comercial para extracción de ADN ((kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification)
- Primer de *Salmonella typhimurium*
5'CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT3'
5' ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT3'

3.5 Procedimiento

- **Activación de Cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028**

Se utilizaron cepas puras de *Salmonella typhimurium*, ATCC 14028, para su activación cada cepa fue sembrada en Caldo Soya Nutritivo e incubada a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se tomó 3mL de cultivo y se colocó tubos de ensayo, previamente esterilizados. Finalmente cada tubo fue identificado con el nombre de la cepa, y fecha de preparación, y colocados a -20 °C, para preservar las cepas. Para la obtención de las

cepas de trabajo, se tomó uno de los tubos preservado a -20 °C, los cuales se incubaron a 35°C por 24 horas, posteriormente se realizó la siembra por estría en placa en medio sólido (Agar Macconkey) para *Salmonella typhimurium*, las placas Petri fueron identificadas con el nombre del microorganismo estriado y la fecha de siembra, y se colocaron en refrigeración a -4°C. (46)

- **Inoculación de *Salmonella typhimurium* en carne de res**

Las muestras de carne escogidas para la inoculación artificial se confirmaron negativas para *Salmonella typhimurium*. Se procedió a la inoculación de la carne con un inóculo de 10⁶ UFC mL⁻¹ a partir del caldo nutritivo con *Salmonella typhimurium*, se añadió 1ml de caldo a cada muestra y se vertió durante 30 segundos a las 15 muestras.



Figura 2. Inoculación de muestras de carne de res

- **Extracción de ADN utilizando un kit moderno**

- Pipetear 180uL de reactivo de digestión, agregar 20 uL de proteinasa ,mezclar e incubar a baño maría a una temperatura de 60°C Agregar 20 uL de ARNsa

- Adicionar 200uL de lisis solución Mezclar cada tubo en el Vortex por 15 segundos ,agregar 400uL de etanol al 50%
- Nuevamente agitar cada tubo en el Vortex por 15 segundos, proceder a colocar el líquido en las columnas
- Colocar en la centrifuga las columnas a 9000 RPM por minuto
- Desechar el residuo restante que queda en las columnas
- Agregar 500uL de buffer lavado I,Colocar a la centrifuga 8000 RPM x minuto, agregar 500uL de buffer lavado II,colocar a la centrifuga 1000 RPM x 3 minutos, Transferir la columna al tubo epperfor de 1,5 ml, agregar 200 uL de elution buffer, Incubar 2 minutos a temperatura ambiente, centrifugar a 9000 RPM x1minuto,eliminar la columna y rotular.



Figura 3.Extracción de ADN mediante un kit comercial.

- **Preparación de Mix de PCR**

- **Hidratamos los PRIMERS:**

Iniciadores	Secuencia	Gen	pb
S139-F	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	InvA	284
S141-R	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C		
Fli15-F	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	fliC	559
Tym-R	ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACT T		

Tabla 3.Primers del gen fliC para *Salmonella typhimurium*

- 40 ul de buffer
- 4 ul de primer F y R



Figura 4.preparacion del mix

**Cálculos para pruebas de ensayo en la preparación de mix para pcr en
cuatro muestras**

	MIX 1	X4	MIX 2	X4	MIX 3	X4
Buffer	10ul	40ul	10ul	40ul	10ul	40ul
Agua	0,4ul	1.6ul	0.8ul	3.2ul	1.2ul	4.8ul
Primers F	0.4ul	1.6ul	0.8ul	3.2ul	1.2ul	4.8ul
Primers R	6.2ul	24.8ul	5.2ul	21.6ul	4.6ul	18.4ul
ADN	3ul		3ul		3ul	

Tabla 4.Calculo de la preparación de MIX para PCR

- **Ciclos en el Termociclador**

El programa de amplificación consistió en: un ciclo a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación-extensión a 60 °C y un ciclo final de extensión de 1 min a 72 °C. Finalmente se realizó una rampa de disociación desde 55 °C a 95 °C, 30 seg. El tiempo de análisis total fue de 2 h, 25 min 42 seg.



Figura 5.Muestras en el Termociclador para la amplificación de ADN

- **Corrida electroforética en gel de agarosa**

Preparación del GEL al 1.6% Pesar la agarosa 1.6 g

- En una probeta agregar agua destilada 72ml
- En la misma probeta completar a 80ml con TBE (Tris-Borato EDTA)
- En un matraz adicionar la agarosa 1.6g y el preparado de 80ml de TBE con agua destilada.
- Llevar a calentamiento en una cocinilla hasta la aparición de burbujas.
- Dejar enfriar la solución de agarosa.

- Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta Making, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.
- Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.



Figura 6. Gel de Agarosa

Preparación de buffer

- 160ml de TBE
- Agregar 160 ml de TBE en 1600 ml de agua destilada
- Agitar en 15 segundos
- Vaciar el preparado en la cámara electroforética

Preparación de muestras para la corrida electroforética

- Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 μ l.

- Carga de las muestras y corrida del gel
- Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
- Añadir buffer de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.
- Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
- Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon.

Nota: Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.

Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos).



Figura 7.Corrida electroforética

- **Lectura en el Transiluminador**

Transiluminador que le permitirá la visualización de las bandas de DNA en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Sobre su base, dispone de una campana de observación que hace de cámara oscura ofreciendo protección frente a los rayos UV y eliminando interferencias y aumentando el contraste. Dicha campana de observación está equipada con una puerta frontal para manipular el gel cómodamente y una amplia ventana de observación que reduce la fatiga ocular. Además, dispone también de lámparas de luz blanca para iluminación del recinto interior.



Figura 8.Transiluminador

CAPITULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Métodos Estadísticos Empleados

Cálculo de especificidad y sensibilidad relativa

El cálculo de especificidad (E) y sensibilidad (S) se realizó utilizando la tabla 2x2, que compara los resultados de la prueba en las muestras inoculadas y muestras no inoculadas.

		Muestras probadas		
		Inoculada	No inoculada	Total
Resultado de PCR	Positiva	a	b	a+b
	Negativa	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	n

Tabla 5.Tabla 2x2 para comparar los resultados en muestra inoculadas con *salmonella typhimurium* y las muestras no inoculadas. Lopez y Fernández 2008.

En donde:

- **E**=Especificidad
- **S**=Sensibilidad

$$E = \frac{d}{(b + d)}$$
$$S = \frac{a}{(a + c)}$$

4.2. Análisis e Interpretación de Resultados

OBSERVACIÓN CUALITATIVA DE ADN DE *Salmonella typhimurium* EN 30 MUESTRAS DE CARNE DE RES

Resultados de 15 Muestras Negativas

Tabla 6. Resultados de la observación cualitativa de ADN en 15 muestras de carne de res no inoculadas.

MUESTRAS NO INOCULADAS CON <i>Salmonella typhimurium</i>		ADN
Muestra 1	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 2	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 3	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 4	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 5	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 6	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 7	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 8	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 9	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 10	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 11	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 12	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 13	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 14	NEGATIVO	Ausencia
Muestra 15	NEGATIVO	Ausencia

Figura 9. Gel de agarosa al 1.6% con bromuro de etidio, en muestras negativas.



Análisis de resultados

En la tabla 6 percibe que todas las muestras que no fueron inoculadas con *Salmonella typhimurum* fueron negativas a la presencia de ADN. Siendo la figura 9 el gel obtenido en este ensayo, podemos observar que no evidencia ningún fragmento de ADN en las 15 muestras negativas.

Resultados de 15 Muestras Positivas a los 15 minutos

Tabla 7. Resultados de la observación cualitativa de ADN en 15 muestras de carne de res contaminada con *Salmonella typhimurium* a los 15 minutos durante la corrida electroforética.

Resultados a los 15 minutos		
MUESTRAS INOCULADAS CON <i>Salmonella typhimurium</i>		ADN
Muestra 1	POSITIVO	Presencia
Muestra 2	POSITIVO	Presencia
Muestra 3	POSITIVO	Presencia
Muestra 4	POSITIVO	Presencia
Muestra 5	POSITIVO	Ausencia
Muestra 6	POSITIVO	Ausencia
Muestra 7	POSITIVO	Presencia
Muestra 8	POSITIVO	Presencia
Muestra 9	POSITIVO	Ausencia
Muestra 10	POSITIVO	Ausencia
Muestra 11	POSITIVO	Presencia
Muestra 12	POSITIVO	Presencia
Muestra 13	POSITIVO	Ausencia
Muestra 14	POSITIVO	Ausencia
Muestra 15	POSITIVO	Presencia

Figura 10. Gel de agarosa al 1.6% con bromuro de etidio, en muestras positivas a los 15 minutos.



Análisis de Resultados

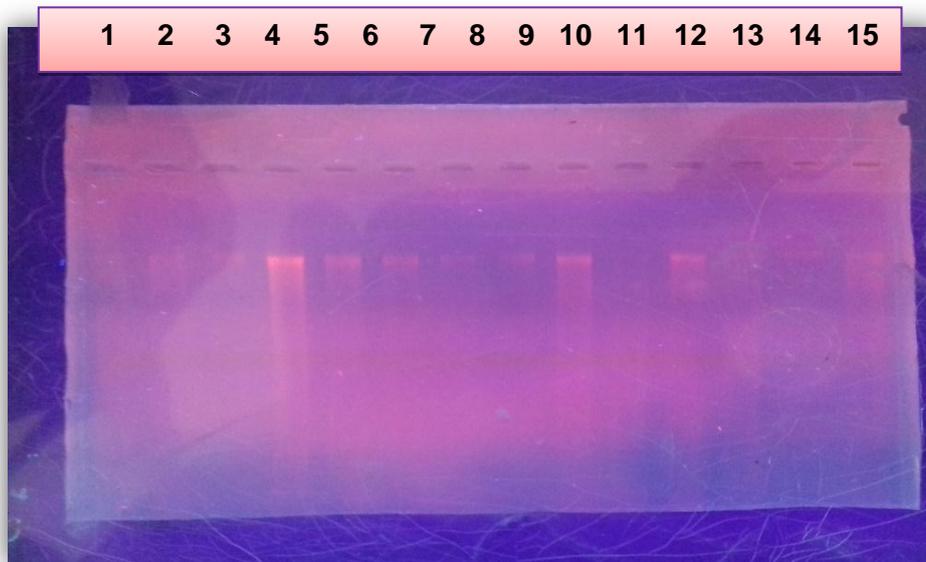
En la tabla 6 hace referencia de las 15 muestras positivas contaminadas con *Salmonella typhimurium* solo en 9 muestras (1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12,15) se pudieron evidenciar la presencia de ADN y en las 6 muestras restantes no se pudo presenciar las bandas de ADN debido al tiempo de la corrida electroforetica.Por lo tanto en la figura 9 se puede observar las bandas de ADN en el gel de agarosa a los 15 minutos durante la corrida electroforética.

Resultados de 15 Muestras Positivas a los 30 minutos

Tabla 8. Resultados de la observación cualitativa de ADN en 15 muestras de carne de res contaminada con *Salmonella typhimurium* a los 30 minutos durante la corrida electroforética.

Resultados a los 30 minutos		
MUESTRAS INOCULADAS CON <i>Salmonella typhimurium</i>		ADN
Muestra 1	POSITIVO	Presencia
Muestra 2	POSITIVO	Presencia
Muestra 3	POSITIVO	Presencia
Muestra 4	POSITIVO	Presencia
Muestra 5	POSITIVO	Presencia
Muestra 6	POSITIVO	Presencia
Muestra 7	POSITIVO	Presencia
Muestra 8	POSITIVO	Presencia
Muestra 9	POSITIVO	Presencia
Muestra 10	POSITIVO	Presencia
Muestra 11	POSITIVO	Presencia
Muestra 12	POSITIVO	Presencia
Muestra 13	POSITIVO	Ausencia
Muestra 14	POSITIVO	Ausencia
Muestra 15	POSITIVO	Presencia

Figura 11.-Gel de agarosa al 1.6% con bromuro de etidio, en muestras positivas a los 30 minutos.



Análisis de Resultados

En la tabla 8 hace referencia de 15 muestras positivas contaminadas con salmonella typhimurium se pudo observar 13 bandas de ADN (muestras 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,15)en el tiempo de 30 minutos de la corrida electroforética, sin embargo en las muestras 13 y 14 no se pudo observar ninguna banda de ADN a pesar del tiempo transcurrido.

Tabla 9. Especificidad y Sensibilidad por electroforesis en gel de agarosa al 1.6% para detección de *Salmonella typhimurium*.

<i>Salmonella typhimurium</i>				
Resultados de la corrida electroforética		Inoculada	No inoculada	Total
	Presencia	a = 13	b = 0	a+b = 13
	Ausencia	c = 2	d = 15	c+d = 17
	Total	a+c = 5	b+d = 15	30

En donde:

E=Especificidad

$$E = \frac{d}{(b+d)} \Rightarrow E = \frac{15}{(0+15)} = 1 \Rightarrow E = 100\%$$

S=Sensibilidad

$$S = \frac{a}{(a+c)} \Rightarrow S = \frac{13}{(13+2)} = 0.86 \Rightarrow S = 86\%$$

El análisis de resultados

El análisis de estos resultados que se aprecia en la tabla 9, que según los datos obtenidos por la observación cualitativa de la corrida electroforética al 1.6% reporta que tiene una sensibilidad 86%, y especificidad 100%.

DISCUSIÓN

- La validez de una prueba diagnóstica, como la técnica de PCR consta de dos aspectos como la sensibilidad y la especificidad, en la evaluación de nuestros resultados se obtuvo una especificidad del 100% y una sensibilidad del 86 %,sin embargo; en una investigación realizada por MONZERRAT,ROSAS ESPEJEL sobre el diagnóstico de *salmonella typhimurium* en muestras de carne por la técnica de la PCR, obtuvo un especificidad y sensibilidad del 100% esto quiere decir, que la técnica, nos muestra un gran potencial para el diagnóstico de *salmonella* en carne, ya que, según los resultados comparados, nos ofrece valores altos, cuanto más alto sea el valor número, existe mejor capacidad ,lo cual nos garantiza la validación de este método molecular para el diagnóstico de patógenos en alimentos.
- Aun con todas las ventajas que nos ofrecen estas novedosas metodologías, no se debe pasar por alto sus limitaciones. Así por ejemplo, los métodos moleculares, no constituyen protocolos estandarizados, lo que dificulta su utilización, por esta razón se debe superar tales limitaciones y mejorar la aplicación de esta técnica en los sistemas alimenticios, para ello se consideró la investigación de CAROLINA, PALOMINO CAMARGO, LILIANA DEL POZO, LUZ CHACÓN para optimizar las condiciones de la PCR y obtener mejores resultados.

CONCLUSIÓN

- El método desarrollado en el presente estudio demostró ser rápido y específico para la detección de *salmonella typhimurium* para el tipo de carne analizado.
- El presente estudio demostró una sensibilidad alta 86% de la técnica de PCR con una concentración mínima detectable de 0.3 ng μL^{-1} , y también la especificidad de los primers utilizados fue del 100%, indicando el potencial de detección de *Salmonella typhimurium*.
- Los resultados también pueden variar de acuerdo al Termociclador que se emplee, ya sea por marca o incluso entre modelos de la misma marca, por lo que es necesario ajustar el programa de temperaturas y componentes de la PCR antes de establecer una metodología.
- La sensibilidad y la especificidad varía dependiendo del tipo de alimento analizado, presencia de inhibidores del tipo de pre-enriquecimiento aplicado, de un trabajo adecuado y la fuente de extracción de ADN.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudios adicionales para aumentar la sensibilidad y aplicarlas en el campo de la industria alimentaria.
- Se recomienda utilizar este trabajo como en el punto de partida para realizar más investigaciones, para profundizar en el tema. A futuro se planea desarrollar un estudio de aplicación de estas pruebas en un mayor número de muestras de diferentes distribuidoras cárnicas de la ciudad, mejorando procedimientos como la extracción y purificación de ADN.
- Se recomienda tener una capacitación y conocimiento previo de los usos adecuados de instrumentos como la centrifuga, la electroforesis, el Transiluminador y el Termociclador para realizar el método de la PCR. Ya que pueden generar diferentes resultados entre laboratorios debido a la falta de validación de protocolo estandarizados, a la variabilidad de equipos y reactivos.
- Se recomienda usar kit modernos para la extracción de ADN con el fin de extraer ADN de manera rápida y confiable.

BIBLIOGRAFIA

1. Schneider, Gronewald, Fandke, Kurth, Barkowsk, y Berghof-Jager. Real time detection of the genus with the Light Cycler System. Biochemical.pag.19-21.2007.
2. Salehi, M. Mahzounieh, y A. Saeedzadeh. Detection of InvA Gene in Isolated Salmonella from Broilers by PCR Method. International J. of Poultry Science.pag.557-559.2005.
3. Luz Chacón, Kenia Barrantes, Cristina Garcia, Rosario Achi. Estandarización de una pcr para la detección del gen inv. De *salmonella* spp. En lechuga. (2010).Venezuela. Revista de la sociedad venezolana de microbiología. Disponible en:<http://163.178.170.21/bitstream/handle/10669/8937/2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. CM Pérez, MM Sánchez, NM Cardona-Castro. Estandarización y evaluación de dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *salmonella* entérica subespecie entérica en huevos. (2008).Colombia. Artículo de medicina veterinaria.20 de octubre del 2015.Disponible en:http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2008000300003&script=sci_arttext

5. Saiki, R, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, K, Horn, G, Erlich, H. and Arnheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350. (1985).
6. González Muñoz Y, Palomino Camargo C. Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con servicio bufet. Rev Gerenc Polit Salud. 2012.
7. Carolina Palomino-Camargo, Yuniesky González Muñoz. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y desventajas. Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública vol.31 no.3 Lima julio/setiembre.2014.29 de octubre del 2015 disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342014000300020&script=sci_arttext
8. Stewart GS. Challenging food microbiology from a molecular perspective. Microbiology. 1997; 143:2099-108.
9. Glynn B, Lahiff S, Wernecke M, Barry T, Smith T, Maher M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. Int J Dairy Technol. 2006 May.
10. Ward P, Roy D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Lait. Pag.23-32. 2005.

11. Liliana Del Pozo, Nazario Silva, Augusto Valencia, Javier Soto, Juan C Riveros, Rosa Sacsquispe, Roger Calderón, Víctor Suarez, estudios de un brote intrahospitalario por *salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasas de espectro extendido shv-5. (2006).lima-Perú. Fac. Med. v.67 n.4 Lima oct.-dic 2006.29 de octubre del 2015.Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832006000400006
12. Fueyo Mendoza j. Frecuencia y tipos de toxinas superantigenos *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.2005
13. ICMSF, Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos – Microorganismos de los Alimentos 2: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2da. Edición. Ed. Acribia. Zaragoza. España.año.2000
14. Mehrotra, Wang, Johnson. Multiplex pcr for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, pag.1032-1035.2000.
15. WONG, Identification and Purification of a new *Staphylococcal* Enterotoxin, H. *Applied and Enviromental Microbiology*. Vol.61, Nro. 4. pp1438-1441. April 1995.

16. José Luis Ponce Canto. David Alberto Zegarra Ríos. Diseño e implementación de un módulo para procesos de reacción en cadena de la polimerasa (pcr) en la replicación de adn.Potifica Universidad Católica del Perú. Lima, abril del 2012.20 de noviembre del 2015 Disponible en:

[http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1326/PONCE
_JOSE Y ZEGARRA DAVID PROCESOS REACCION CADENA ADN.pdf
?sequence=1](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1326/PONCE_JOSE_Y_ZEGARRA_DAVID_PROCESOS_REACCION_CADENA_ADN.pdf?sequence=1)
17. Elley, A. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pag.17.2008
18. Gurtler, J.Kornacki, y L.Beuchat. Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to Infante health. International J. Food Microbiology. 104: 21-34. 2005.
19. Álvarez, M. N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de Salmonella entérica. Tesis doctoral. Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España.pag.107.2007.
20. Cervantes, T. K. Tapia. 2008. Enfermedades transmitidas por Alimentos. 2008. Capacitación para el Servicio de Alimentación. Secretaria de Educación Pública.22 de noviembre del 2015.Disponible en:

[http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs_SEP_2008.
pdf \(Consulta: mayo 2012\)](http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs_SEP_2008.pdf)

21. Gutiérrez, C. S. Diagnóstico de las enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal. *Bacteriología Médica diagnóstica*. México.pag.79-81. 2008.
22. Popen. Smart, R.Khakhria, W. Johnson, J. Spika, y J. Prescott. *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *J. Can. Vet.* 39 (9).pag.559-565. 1998.
23. Masana, M. O. 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina.24 de noviembre del 2015.Disponible en:
[Http: //www.faqs.org/periodicals](http://www.faqs.org/periodicals) (Consulta: enero 2014).
24. Copes, J.Pellicer, G. Echeverría, N. Stanchi, C. Martínez, y L. Leardini. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. *Revista Argentina de Microbiología*.pag.49–52. 2000.
25. Gonzáles, F, Villagrán, M. Pichel, S. Figueroa, G. Merletti, y M. I. Caffer. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* asociados a cuadros de diarrea. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009.
26. *Salmonella* sp. Aspectos generales.24 de noviembre del 2015.Disponible en:
<https://es.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

27. Crump JA, Karl M, Gordon A, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. Clin Microbiol Rev. Oct; 28(4). 2015
28. Consuelo I.M.Publicado el 29 de julio 2007.Epidemiologia de *Salmonella typhimurium*.26 de noviembre del 2015.Disponible en:
http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2007/07/29/70802
29. Microbiología de Salmonella sp.23 de noviembre del 2015.Disponible en:
<http://www.bvsops.org.uy/pdf/salmonella.pdf>
30. Profilaxis de *Salmonella* sp.18 de noviembre del 2015.Disponible en:https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/ToxAlim/ToxAlim_L19d.pdf
31. Scott L. Butler, Mark S.T. Hansen & Frederic D. Bushman vivo. Nature Medicine (7).pag.631–634. 2007
32. Joseph Sam brook and David W. Russel Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

33. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility". *Nature Immunology*. 2003.
34. Minamino, T y K. Namba. . Auto ensamblaje y tipo III proteína de exportación del flagelo bacteriano. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 7: 5 -17. 2004
35. Berg, H, y Anderson. Las bacterias nadan haciendo girar sus filamentos flagelares *Naturaleza* 245.pag.380 -382. 2008
36. Macnab, RM. El flagelo bacteriano. Propulsor rotatorio reversible y un aparato de exportación de tipo III *J.Bacteriol*.pag.149 -153. 1999
37. Bandow J, Baker JD, Bertha M, Painter C.Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies - COPD biomarker discovery study. *Proteomics* 2008.
38. Berth M, Moser FM, Kolbe M.The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* (Licencia Springer Open Access.) 2007
39. Hofer J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A et al. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2003.
40. Lee CA, Jones BD, Falkow S. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci* 1992.

41. Isenberg HD. Clinical Microbiology procederes handbook. Washington, D.C.: American Society for Microbiologypag.5-19; 1992.
42. Haque A, Ahmed J, Qureshi J. Early detection of typhoid by Polymerase Chain Reaction. Ann Saudí Med.pag.337-40. 1999
43. Monserrat, Rosas Espejel, estandarización y validación de la técnica de pcr para el diagnóstico de *salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo. Montecillo, Texcoco, estado de méxico.2014.Disponible en:
http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2388/1/Rosas_Espejel_M_Ganaderia_MC_2014.pdf
44. Lucía Morales Hernández, Ana Hernández. Detección de *salmonella spp.* En melón Cantaloupe en unidades de producción y unidades de empaque. (2009) .mexico.26 de noviembre del 2015.disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S056825172009000200001&script=sci_arttext
45. Elizabeth Barreiro Zambrano, Fabricio Armendáriz Toral. Detección de *salmonella spp.* Mediante pcr en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. (2013), Guayaquil-Ecuador. Dispoble en:
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21709/1/TESIS%20PCR%20IAN-PIERINA.pdf>

46. Lim, Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for selective detection of Salmonella enteric serovar typhimurium. Japón. J. Infect. Dis.pag.151-155. 2003.

47. Rahm, K.Grandis.R, Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probe.pag.271-279. 1992.

ANEXOS

Figura 12. Ciclos de ADN

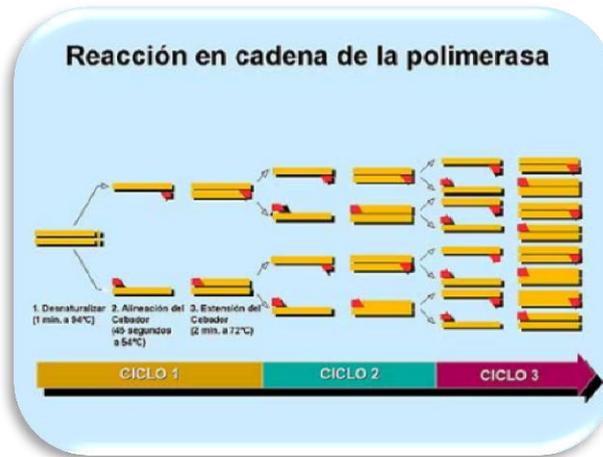
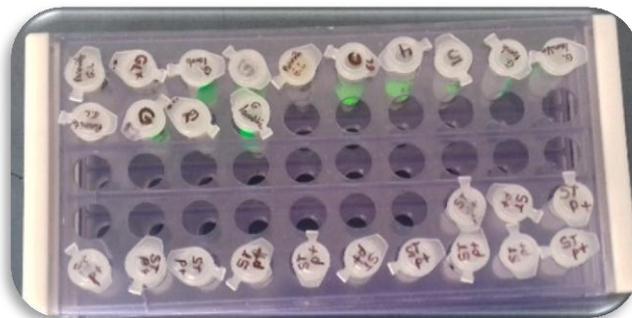


Figura 13. Procedimiento

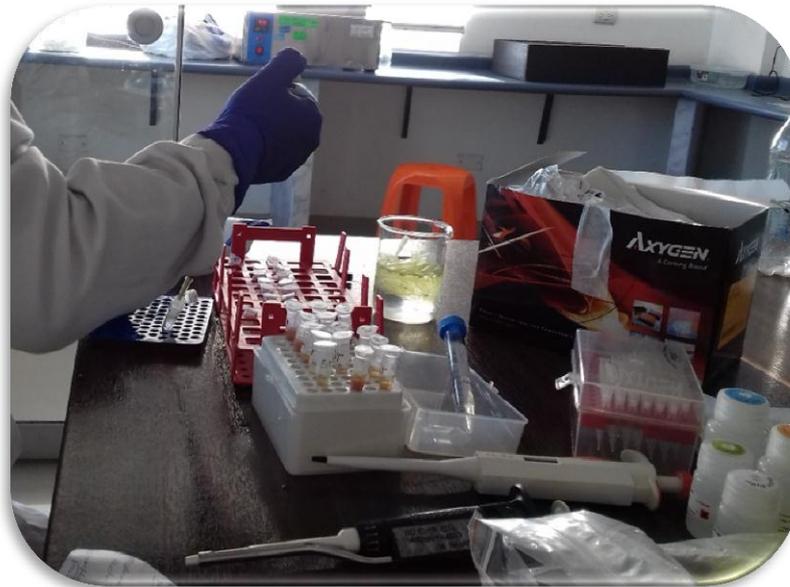
A. Muestras de carne en los tubos Eppendorf.



B.-Contaminación de *Salmonella typhimurium* en 15 muestras de carne.



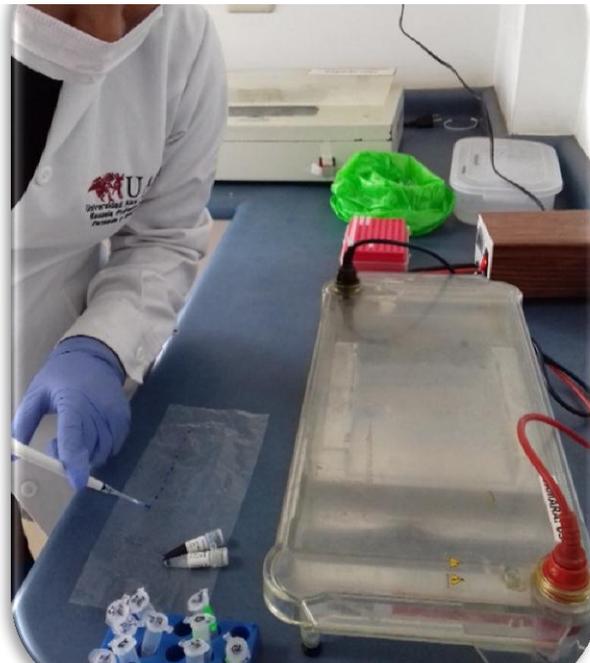
C.- Extracción de ADN a partir de muestras de carne con un kit comercial.



D.- Preparación de MIX para PCR.



E.- Cámara electroforética.



F.-Muestras llevadas al Termociclador.



G.-Geles de agarosa obtenido como ensayos de prueba.

