

**DETECCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR-TR)**

INGRID JOHANNA ROJAS GUEVARA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

BOGOTA D.C.

2005

**DETECCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR-TR)**

INGRID JOHANNA ROJAS GUEVARA

Trabajo de grado para optar al título de Maestría en Microbiología

DIRECTOR: Maria Consuelo Vanegas López.

CODIRECTOR: Maria Mercedes Torres.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ D.C.

2005

AGRADECIMIENTOS

A Consuelo Vanegas por la confianza que deposito en mi y por todo el apoyo que me brindo durante mi maestria.

A Maria Mercedes Torres por su ayuda y enseñanza en el área de biología molecular.

A Juan Camilo, Clemencia, Adriana y Janet quienes siempre me apoyaron durante la realización de este trabajo y quienes fueron una ayuda incondicional en el LEMA.

Al profesor Orlando Martinez por su asesoría en el análisis estadístico.

A Elizabeth Vásquez por su apoyo técnico en la técnica de PCR en tiempo real.

A Laboratorios Roche por el préstamo de sus equipos e instalaciones para la realización de las pruebas de PCR en tiempo real.

A la Facultad de Ciencias y al Departamento de Ciencias Biológicas por su apoyo financiero, sin el hubiese sido imposible la realización de mi maestría y la culminación de este trabajo.

A Viviana y a Camilo, por estar siempre conmigo y apoyarme en todo lo que hasta ahora he hecho.

DEDICATORIA

*A MI MADRE,
MIS HERMANOS,
A MI PAPA,
MIS ABUELOS,
Y A LA VIDA*

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. JUSTIFICACION	13
3. OBJETIVOS	15
4. MARCO TEORICO	16
4.1 <i>Salmonellosis</i>	16
4.1.1 Descripción.....	16
4.2 Agente causal, <i>Salmonella</i> spp.....	17
4.2.1 Taxonomía.....	18
4.2.2 Fisiología.....	19
4.2.3 Patogénesis.....	20
4.2.4 Ecología.....	24
4.2.5 Factores que afectan el crecimiento, muerte y supervivencia de <i>Salmonella</i>	29
4.3 Epidemiología.....	31
4.4 Técnicas de detección.....	35
4.4.1 Metodo tradicional Microbiología ISO6579/1993 para la búsqueda de <i>Salmonella</i> spp. a partir de muestras de alimentos.....	35
4.4.2 Análisis Molecular - PCR en Tiempo Real.....	38
5. MATERIALES Y METODOS	41
5.1 Estandarización de PCR en tiempo real para la identificación de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis.....	41
5.1.1 Cepas control.....	41
5.1.2 Extracción de ADN.....	41

5.1.3 Oligonucleotidos.....	42
5.1.4 Cido de amplificación.....	42
5.1.5 Curva de cloruro de magnesio.....	42
5.1.6 Especificidad.....	43
5.1.7 Sensibilidad.....	43
5.1.8 Comparación de métodos de extracción.....	43
5.2 Identificación serotipo S.Enteritidis de cepas aisladas previamente.....	44
5.3 Identificación del serotipo S.enteritidis en muestras de pollo crudo por pcr en tiempo real...l.....	45
5.4 Comparación entre PCR en tiempo real y el protocolo ISO6579/1993 para la búsqueda de <i>Salmonella</i> spp.....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
6. RESULTADOS.....	46
6.1 Resultados metodológicos.....	46
6.2 Resultados experimentales.....	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
7. CONCLUSIONES.....	66
8. RECOMENDACIONES.....	67
9. BIBLIOGRAFIA.....	69
ANEXOS.....	74

LISTADO DE TABLAS

TABLAS	PAG
<i>Tabla 1</i> Distribución de <i>Salmonella</i> spp por serotipo	34
<i>Tabla 2</i> Cantidades de reactivo en la mezcla de reacción para la amplificación	42
<i>Tabla 3</i> Estandarización de inóculos por microbiología tradicional	49
<i>Tabla 4</i> Identificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de diferentes fuentes usando ISO 6579/1993 Y API, e identificación del serotipo S. Enteritidis por PCR en tiempo real.	54
<i>Tabla 5</i> Detección del serotipo S. Enteritidis por PCR en tiempo real en muestras de pollo crudo.	56
<i>Tabla 6</i> Grado de recuperación de posibles Salmonellas y Coliformes en los aislamientos realizados en cada medio de cultivo según el enriquecimiento utilizado.	60
<i>Tabla 7</i> Reportes de posibles falsos positivos en las muestras de pollo analizadas para Salmonella por ISO 6579/1993	61
<i>Tabla 8</i> Comparación de los resultados obtenidos por Método tradicional vs. PCR en tiempo real para la detección de Salmonella	62

GRÁFICAS

Gráfica	Pag
<i>Gráfica 1</i> Curva de cloruro en la cepa control y pollo inoculado con 10 cd/ml de <i>S. Enteritidis</i>	46
<i>Gráfica 2</i> Resultados de Especificidad. Amplificación del control positivo y posibles interferentes.	47
<i>Gráfica 3</i> Amplificación para pdlo inoculado con <i>S. Enteritidis</i> con 1 y 10 cd/ml.	50
<i>Gráfica 4</i> Amplificación del control positivo extraído por el kit DNA2000-Carpogen y por lisis térmica	52
<i>Gráfica 5</i> Comparación de Tm del ADN de las cepas control extraído por dos métodos diferentes.	53

1. INTRODUCCIÓN

La Salmonelosis es una enteritis común causada por algunas especies del género *Salmonella*, el cual es uno de los principales microorganismos causantes de gastroenteritis transmitidas por alimentos y uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. **Daum et al (2002), Kimura et al (2004)**

Las diferentes especies de *Salmonella*, pueden hallarse en el tracto gastrointestinal de muchos animales, incluyendo pollos, pájaros y roedores. En estos animales, la bacteria puede causar enfermedad o simplemente encontrarse como flora normal y no generar síntomas de infección. Muchos de estos vehículos actúan como fuente de salmonelosis, pero en la mayoría de los casos se ha reportado que es transmitida por contaminación cruzada entre alimentos, principalmente huevos, carnes de aves y productos de consumo diario y por alimentos cocinados de forma inapropiada. **Edwards (1999), Santos et al (2003)**. Los signos y síntomas de la Salmonelosis incluyen dolor abdominal, fiebre y diarrea sanguinolenta, los cuales aparecen entre 8 y 48 horas después de la ingestión del alimento. **Daum et al (2002)**.

La última clasificación de las salmonellas realizada por la OMS en 1997 reconoció 2 especies: 1. *Salmonella enterica* dentro de la cual se reportaron 2435 serovariedades, siendo el serotipo más común *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, con un total de 1435 (58.93%) serotipos y *Salmonella bongori* que reporta 20 serotipos **OMS (1997)**. El serotipo S. Enteritidis se ha convertido en una de las causas más frecuentes de infecciones en países Europeos y Estados Unidos, en los últimos años y generalmente se ha asociado al consumo de carne de pollo y huevos **De Medici et al (2003)**

La S. Enteritidis se aisló por primera vez en aves domésticas en 1935 pero fue a partir de 1986 cuando se reconoce que la S. Enteritidis es un microorganismo patógeno serio y frecuente en la avicultura de países Europeos como Gran Bretaña habiéndose aislado de broilers, reproductoras y ponedoras comerciales **Usera (2001), Garcia et al (2001)**. Los recientes hallazgos en USA y países latinoamericanos como Colombia, no difieren de la situación presentada en Inglaterra y aunque puede estar sobrestimando la incidencia de S. Enteritidis, el problema en la avicultura es real **Suárez y Mantilla (2000), Velilla et al (2004)**. El reporte presentado a finales de 1993, de la incidencia de Salmonelosis (Excluyendo Fiebre Tifoidea) en Estados Unidos asciende a casi 42.000 casos, pero informes recientes de los casos de infección por este patógeno en USA, muestran el constante aumento de diferentes serotipos en los alimentos **CDC (2004), Marcus et al (2004), Surveillance Center (1997)**.

En Colombia no se conocen con exactitud los datos correspondientes a la prevalencia de Salmonelosis, debido a que generalmente hay un bajo registro de las infecciones por este microorganismo, porque solo se genera un diagnóstico clínico y no se aísla ni se identifica el agente etiológico. Pero se sabe, que en nuestro país, el consumo de carne de pollo, huevos y sus subproductos como fuentes de proteínas, se ha incrementado considerablemente en los últimos años. La industria avícola en Colombia ha estado en continua expansión; para 2004 se reportó una producción de 707.903 toneladas de pollo y 7'490.131 unidades de huevos presentando un crecimiento del 4.4% para carne de pollo y 0.10% para producción de huevos, respecto al 2003. **FENAVI (2005)**

Respecto al consumo de carne de pollo a nivel mundial, se ha estimado que el Consumo per cápita en el año 2000 fue de 9.61 Kg., y que la Tasa de

crecimiento consumo per cápita en el mundo entre 1996 y 2000 fue de 3.5%. En Colombia, el Consumo per cápita para el año 2000 fue de 12.94 Kg. y la Tasa de crecimiento del consumo entre 1996-2000 alcanzó un 2.1%. **AGROCADENAS (2003)**. Estos datos son muy importantes teniendo en cuenta que estos alimentos transmiten la salmonelosis y que el apropiado seguimiento que se les realice podría evitar la contaminación con este patógeno. Además, con los cambios generados por la apertura económica, las grandes producciones nacionales y las importaciones, han aumentado el comercio y distribución de productos de origen avícola y por lo tanto, la posible transmisión de *Salmonella* spp; con todo esto, cobra mayor importancia el control de esta zoonosis y la higiene de los alimentos de origen animal relacionados con la salud pública, y se hace necesario desarrollar e implementar metodologías que permitan identificar *Salmonella* Enteritidis de forma rápida y eficaz en muestras de pollo crudo.

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones producidas por el consumo de alimentos contaminados con *S. Enteritidis* han sido una de las mayores causas de infección en varios países Europeos y en Estados Unidos, en los últimos 20 años. **Bennet et al (1998)**. Los alimentos principalmente implicados son huevos, pollo y productos derivados de estos. Adicionalmente, los costos por morbilidad, diagnóstico, y tratamiento causados por gastroenteritis o enterocolitis de origen alimentario producidas por *S. Enteritidis* son altos, y debido al aumento que se ha presentado a nivel mundial en la diseminación de este patógeno, se hace necesario realizar estudios de caracterización, control y prevención de este microorganismo en la industria, principalmente la avícola. **Edwards (1999)**.

En Colombia, los últimos reportes de SIVIGILA y el INVIMA nos muestran la incidencia de los diferentes serotipos de *Salmonella* hasta 2004, dentro de los cuales *S. Enteritidis* es uno de los más comunes con un 21.79% de un total de 73 *Salmonellas* aisladas a partir de productos alimenticios en el año 2004, principalmente carnes rojas, carnes de aves y huevos. **(Comunicación personal – INVIMA, SIVIGILA (2002))**. Estos datos reflejan la necesidad realizar estudios que permitan determinar la prevalencia actual de este patógeno en alimentos y que alerten a la población en el control y vigilancia del microorganismo en los productos para consumo humano y en la importancia de un adecuado diagnóstico clínico. Adicionalmente, para garantizar la inocuidad de los productos se requiere la implementación de métodos que generen resultados confiables y específicos, en un tiempo menor que el requerido por el Método horizontal para la búsqueda de *Salmonella* spp. (ISO 6579/1993) a partir de muestras de alimentos. **Fach et al (2001)**

En el caso particular del sector avícola, en donde se producen miles de toneladas de pollo crudo al año y para el cual la detección de *Salmonella* spp. es un análisis obligatorio el cual verifica la ausencia del patógeno, se hace indispensable contar con métodos rápidos y seguros que certifiquen la calidad del pollo.

PCR es una técnica que promete generación de resultados confiables en corto tiempo, y ahora con la introducción de PCR en tiempo real, se busca lograr la aplicación de esta técnica en productos alimenticios, con el fin de disminuir cada vez mas el tiempo de análisis en las industrias productoras de alimentos y lograr una mayor especificidad en los resultados. **Hoorfar et al (2000), Knutsson et al (2002).**

Recientemente, Roche Diagnostica desarrolló un kit de reacción en el que se incluye la extracción de ADN y la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de alimentos, dando así el primer paso para la implementación de técnicas de Biología Molecular en la industria alimenticia; sin embargo la necesidad de la industria avícola de detectar específicamente el serotipo *S.Enteritidis* en carne de pollo, hace necesario estandarizar esta técnica utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos que permitan diferenciar *S.Enteritidis* de otras especies y serotipos, y que a la vez permita obtener resultados de una manera rápida y confiable.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR-TR como un método sensible y específico para identificar Salmonella Enteritidis en muestras de pollo crudo

3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real usando oligonucleótidos específicos para la identificación de S. Enteritidis a partir de cepas puras.
2. Utilizar PCR en tiempo real para la identificación de S. Enteritidis a partir de muestras de pollo crudo
3. Comparar los resultados obtenidos por técnicas moleculares con el método Horizontal ISO 6579/1993

4. MARCO TEORICO

4.1 SALMONELOSIS

4.1.1 DESCRIPCIÓN

La salmonelosis producida por *S. Enteritidis* es una de las causas más importantes de gastroenteritis por toxoinfección alimentaria en humanos y por eso es prioritario su control en alimentos. Esta zoonosis se considera uno de los mayores problemas de salud pública en todo el Mundo, en 1990 Rodríguez y colaboradores reportaron un aumento de la incidencia de la enfermedad en América del Norte, América del Sur, Europa e incluso África. **Suárez y Mantilla (2000), Ferretti et al (2001).**

Existen tres cuadros clínicos causados por *Salmonella*: Gastroenteritis, que es la forma más común de salmonelosis producida por un gran número de serotipos principalmente *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*; Fiebre Entérica que puede ser tifoidea, producida por *S. Typhi*, y *S. Paratyphi A, B y C*, que solo afectan al humano y un tercer cuadro clínico originado por *S. Choleraesuis* que consiste en una infección sistémica. **IFT (2002).** En la mayoría de los casos, la enfermedad es la reacción del hospedero a los potentes factores pro inflamatorios liberados por la bacteria, como es el caso de la diarrea inflamatoria inducida por la liberación de los gránulos de los neutrófilos que posterior a la invasión de la mucosa son atraídos por el quimioatrayente epitelial que genera la producción de citoquinas proinflamatorias en las células de la mucosa. **Sánchez y Cardona (2003)**

La Infección tífica con frecuencia se adquiere por ingestión de comida o agua contaminada con heces humanas Aunque la transmisión directa de persona a

persona es rara, se ha demostrado plenamente la transmisión anal-oral del serotipo *S. Typhi*. **Restrepo et al (2003)**

A diferencia de las salmonellas tíficas, las salmonellas no tíficas están ampliamente diseminadas en la naturaleza, e íntimamente relacionadas con los animales. Por lo tanto, en ciertas regiones geográficas existe una estrecha correlación entre los serotipos presentes en animales y los encontrados en humanos. Diversos serotipos de Salmonellas no tíficas han sido implicados en brotes epidémicos relacionados con el consumo de huevos, carne y productos vegetales contaminados **Fernández (2000), Restrepo et al (2003)**

4.2 AGENTE CAUSAL, *Salmonella* spp.

Budd en 1874, fue quien primero dedujo que la fiebre tifoidea era transmitida por el agua y por los alimentos. *Salmonella Typhi*, el agente causal de la enfermedad tífica, fue descubierta en 1880 por Eberth y aislada en 1884 por Gaffky. El serotipo *S. Choleraesuis* fue aislado en cerdos en los que se diagnosticó clínicamente que padecían peste porcina. El primer brote de salmonelosis transmitida por alimentos y confirmado en el laboratorio implicó a 57 personas que comieron carne de una vaca enferma. Se aisló *S. Enteritidis* de los órganos de una víctima que no había sobrevivido y en la carne y sangre del animal.

Restrepo et al (2003)

El microorganismo está ampliamente diseminado en el ambiente incluyendo el suelo, el agua, las plantas, las heces de animales, las aguas residuales, los insectos, las instalaciones pecuarias, la carne de aves, bovinos y peces, entre otros. La *S. Enteritidis* usualmente no se multiplica significativamente en el ambiente, pero puede sobrevivir durante varias semanas en el agua y varios

años en el suelo, si las condiciones de pH y humedad son favorables. Un gran número de mamíferos, pájaros, reptiles y animales acuáticos son la causa de que se mantengan las cadenas de infección. **Suárez y Mantilla (2000), Ferretti et al (2001).**

4.2.1 TAXONOMIA

La difícil evolución de la nomenclatura y clasificación de este organismo, todavía está en proceso. El género fue llamado así, por D.E. Salmon, quien aisló por primera vez este microorganismo, el que ahora es llamado *S.Cholerae*, del intestino de un cerdo con cólera. Como esta, las primeras salmonellas fueron nombradas, basándose en el huésped o la condición clínica de la cual fue aislada. Posteriormente se encontró que varias cepas no tenían un huésped específico o no eran la causa de la enfermedad del huésped, por lo cual no se siguió utilizando este método para clasificar las cepas. **Edwards (1999)**

En 1960, Kaufmann, usando el esquema Kaufmann-White de modelos somáticos (O) y flagelares (H) o serotipos, dividió el género *Salmonella* en cuatro subgéneros. Los serotipos fueron usados como nombres de especies y fueron determinados por la localización de donde fueron aislados. En 1963, Ewing usando una base bioquímica, sugirió que debería clasificarse *Salmonella* en tres especies: *S.Typhi*, *S.cholerae* y *S.Enteritidis*. Las dos primeras fueron consideradas serovares simples y todas las otras Salmonellas, deberían ser serotipos de *S.Enteritidis*. **Wang and Yeh (2002).**

En 1973, se determinó por análisis de Homología de ADN, que todas las cepas pertenecientes a los géneros *Salmonella* y *Arizona*, podían ser agrupadas. En 1982, las especies del tipo *S.cholerae* fueron clasificadas en las siguientes

subespecies: I, *cholerae*; II, *salamae*; IIIa, *arizonae*; IIIb, *diarizonae*; IV, *houtenae*; V, *bongori*; y VI, *indica*. **Edwards (1999)**

Actualmente, según la clasificación de la OMS y el instituto Pasteur de 1997, se reconocen 2 especies: *S. enterica* con 2435 serotipos, agrupados en seis subespecies: I *enterica* (única asociada a infecciones humanas y animales) con 1435 serotipos, II *salamae* con 485 serotipos, IIIa *arizonae* con 94 serotipos, IIIb *diarizonae* con 321 serotipos, IV *houtenae* con 69 serotipos y V *indica* con 11 serotipos. La segunda especie es *S. bongori* en la que están incluidos 20 Serotipos. Esta clasificación se realizó en base al esquema de Kauffmann-White, en el que las serovariedades se definen por medio de una serie de números y letras que representan 64 antígenos O (somáticos), Vi (capsulares) y H (flagelares) diferentes **OMS (2001)**. Las determinantes genéticas de los factores antigénicos suelen ser estables y por esta razón, resultan útiles en las investigaciones epidemiológicas. Sin embargo, unas pocas son fago-dependientes o plásmido dependientes y son de menos valor epidemiológico. Las serovariedades se pueden subdividir por las características bioquímicas (biovariedades o biotipos), por la resistencia a los bacteriófagos (fagovariedades o lisotipos), a los antibióticos o los metales pesados y por la sensibilidad a las bacteriocinas o por la producción de estas. Estas características también pueden depender del ADN extracromosómico, pero suelen ser estables a lo largo de todo el tiempo que dura un brote transmitido por alimentos. **Fernández (2000), ICM SF (1996)**.

4.2.2 FISILOGIA

Las *Salmonella* spp., miembro de la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram- negativos no encapsulados que no forman esporas. Producen ácido por la

fermentación de la glucosa, reducen nitratos a nitritos y no producen citocromo oxidasa. Todas las especies de *Salmonella*, excepto *S.gallinarum* y *S.pullorum* son mótils por flagelos peritricos y sólo un 1% de las especies fermentan la lactosa. **Edwards (1999)**

La mayoría de las cepas utilizan el citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno. La reacción de rojo de metilo es positiva, VP negativa y la prueba de indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNAsas ni lipasas. Sin embargo, la real clasificación de las salmonellas esta dada por sus antígenos y aunque una cepa presente las características fisiológicas mencionadas anteriormente, se requiere siempre de una verificación por análisis antigénico y tipificación con bacteriófagos para objetivos epidemiológicos. El contenido de G + C del ADN es de 50 – 53 moles %. Las salmonellas pueden albergar fagos atenuados o plásmidos que codifican los caracteres metabólicos que se utilizan en la identificación. **Restrepo et al (2003)**

4.2.3 PATOGÉNESIS

Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, se requiere de un inóculo de aproximadamente 10^6 - 10^8 bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática, en cualquiera de los serotipos; otros factores como el tipo de cepa, el vehículo de transmisión y el estado fisiológico del hospedero, también favorecen o no el desarrollo de la enfermedad. **Sánchez y Cardona (2003), Edwards (1999)**. Sin embargo, las investigaciones han sugerido que en algunos casos, especialmente cuando el vehículo ha sido el agua o alimentos grasos, se

han encontrado pequeñas cantidades de salmonellas ((100/g.) Parece ser que la diferencia en cuanto a la dosis infecciosa está relacionada con la supervivencia de la bacteria durante el tránsito a través del estómago, ya que al ingerir alimentos grasos, estos protegen a los microorganismos de la acción de los ácidos del estómago. **Restrepo et al (2003)**

Después de la ingestión, la bacteria resiste el ambiente ácido del estómago y coloniza el intestino delgado, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfóide presentándose hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Los polimorfonucleares neutrófilos son estimulados y la infección se limita, en el caso de enteritis, a nivel del tracto gastrointestinal. Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática. La respuesta inflamatoria media también la liberación de prostaglandina, estimula la producción de AMP cíclico y la secreción activa de líquidos, produciendo diarrea en el caso específico de la enteritis. **Sánchez y Cardona (2003)**

Las diferentes especies de *Salmonella*, poseen un mecanismo de patogénesis similar, el cual ha sido estudiado solamente a partir de *S.typhimurium*, utilizando modelos en ratones y que se ha extendido a los otros serotipos, asumiendo que el comportamiento del patógeno es igual. Varios investigadores han estudiado la patogénesis de esta especie, ya que produce fácilmente los síntomas en animales, siendo similar su comportamiento en la infección a humanos. Antes de invadir cualquier tipo de célula, el patógeno debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal. Se ha demostrado que las fimbrias están involucradas en este proceso de colonización y adherencia al huésped en

los estados iniciales de la infección. La presencia de sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente, ya que ésta responde a factores del medio como pH y osmolaridad. **D'aost (1991), Rajashekara et al (2000).**

Salmonella establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal mediante sus fimbrias, pero antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado ruffling (rizado). **Sánchez y Cardona (2003)** En *S. Enteritidis* se producen por lo menos 5 tipos diferentes de fimbrias, codificadas por los genes *SEF14*, *SEF17*, *SEF21*, *LPF* y *PEF*. De todas las fimbrias del serovar *Enteritidis*, *SEF14* ha sido el más estudiado, demostrándose que contribuye a la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del hospedero. **Collighan et al (2001)**

Una vez se ha dado el contacto inicial, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión. Posterior a esto, se activa el sistema de secreción reportado para *Salmonella*, que es la única bacteria en la que se ha descrito que contiene dos sistemas de secreción tipo III; estos son maquinarias dedicadas a la translocación que permiten a las proteínas bacterianas de patogenicidad ser liberadas directamente en el citosol de células hospederas eucarióticas. Esta interacción bacteria - hospedero conduce a la remodelación de la bioquímica de la célula hospedera y a generar

vías de transducción de señales para facilitar la infección bacteriana, colonización y replicación dentro del hospedero. **Sánchez y Cardona (2003), Marcus et al (2000), Rajashekara et al (2000), Santos et al (2003).**

Los dos sistemas de secreción tipo III de *Salmonella* son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI 1 y SPI 2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica. **Collighan et al (2001), D'aoust (1991), Marcus et al (2000), Sánchez y Cardona (2003)**

Los genes de SPI 1 son expresados en forma máxima a 37°C y bajo condiciones de oxígeno limitado, además la expresión es óptima a pH neutro, a alta osmolaridad, y durante la última fase de crecimiento logarítmico. La expresión de los genes de invasión también requiere la proteína reguladora central *HIA*, la cual es codificada por el gen *hilA* en SPI 1. El gen *hilA* es un regulador transcripcional de genes de invasión, su expresión es activada por la proteína *SirA* que es codificado por el gen *sirA*; la proteína se cree que es estimulada por dos vías independientes: la activación por la proteína *BarA* que es una sensor quinasa que tiene como blanco a *SirA* o la fosforilación de *SirA* dada por la intervención del intermediario metabólico, acetilfosfato. Actualmente se conoce que el gen *hilD* también reprime la expresión de *hilA* cuando las condiciones ambientales no son favorables para la invasión. La expresión de *hilA* también es regulada por PhoP - PhoQ un sistema de dos componentes que gobierna la virulencia, mediante la adaptación a medios ambientes limitados en magnesio y regula numerosas actividades celulares en varias especies de gram negativos entre ellos *Salmonella*. **Wang and Yeh (2002).**

4.2.4 ECOLOGIA

Las salmonellas se encuentran en todas partes y están reconocidas universalmente como agentes zoonóticos. Algunos alimentos, especialmente los de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, han sido identificados como vehículos para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos en ambientes de elaboración de alimentos o cocinas **ICSMF (1996)**

Las salmonellas se alojan en el tracto gastrointestinal de los animales infectados, se eliminan en las heces y pueden ser transmitidas por contacto a las manos de los seres humanos como consecuencia de los movimientos del intestino y por contacto con patas, pelo y piel de los animales que han entrado en contacto con el suelo contaminado. Los vehículos principales son los animales, los piensos y el agua. La mayoría de los individuos colonizados se convierten en excretores sanos, ocasionando la contaminación del ambiente. Los alimentos de origen animal se contaminan como consecuencia de la contaminación fecal del ambiente. La contaminación cruzada es producida por alimentos crudos contaminados durante su preparación. Las salmonellas también se pueden multiplicar en el ambiente y material de las instalaciones de elaboración de alimentos. **ICSMF (1996)**

HOMBRE

Algunas serovariedades de Salmonella como S. Typhi y S. Paratyphi están adaptadas al hombre como hospedero y generalmente causan un síndrome septicémico – tifoideo en los seres humanos. Las demás serovariedades, que causan gastroenteritis en el hombre se adquieren por ingestión de alimentos contaminados. Adicionalmente, los portadores asintomáticos excretan

salmonellas en las heces, ya que estas suelen estar localizadas en el tracto alimentario, pero se pueden encontrar en los ganglios linfáticos, en el hígado, en la vesícula biliar, en los riñones, en el bazo y en el ovario. **ICM SF (1996), Restrepo et al (2003).**

AVES DE CORRAL

En las gallinas, la gastroenteritis aguda acompañada de una elevada mortalidad ha sido causada por *S.pulloium* y *S.gallinarum* organismos oportunistas que están adaptados a las aves de corral como hospederos y son de escasa patogenicidad en humanos. Las aves de corral, sin embargo, han sido afectadas por varias serovariedades de Salmonellas, que aunque no producen enfermedad se diseminan en las heces y por esta razón son fuentes de contaminación de los alimentos. **Fernández (2000), ICM SF (1996).**

CERDOS

Las *Salmonellas*, especialmente *S.Cholerasuis* y *S.Typhisuis*, causan gastroenteritis en los lechones. El hábito de revolcarse y de introducir las patas en los comederos facilita la contaminación del pelo y la piel. De modo igual que en la mayoría de los animales domésticos, el estrés de los cerdos durante el transporte incrementa la excreción de *Salmonella*. Este hecho puede originar una extensa infección cruzada mientras los animales aguardan el sacrificio. **Fernandez (2000), ICM SF (1996)**

GANADO VACUNO

Los terneros son especialmente sensibles a la invasión por *Salmonella* durante algunas de las primeras semanas de vida; sin embargo, en el ganado vacuno adulto las manifestaciones clínicas son raras. Las Salmonellas son eliminadas en

las heces de los animales infectados y contaminan el terreno, los de los pastos y las salas de ordeño, donde la bacteria puede permanecer viable durante algunos meses. El predominio de la infección en el ganado vacuno aumenta durante el transporte y con cada día de permanencia en los centros de reunión antes del sacrificio. **ICMSF (1996)**

OTROS ANIMALES

Se han aislado salmonellas de muchos animales mamíferos, aves, anfibios, artrópodos, peces e insectos. Los animales terrestres se contaminan de varias formas parecidas a las descritas en las aves de corral, en los cerdos y en el ganado vacuno. Los peces de los ríos y de los lagos, por aguas contaminadas con materia fecal, las que generalmente son vehículos de brotes de Salmonellosis. Los peces de aguas marinas, aunque originalmente no están infectados, se contaminan al almacenarse en bodegas o en contenedores inadecuados y mientras se transportan a la plantas de tratamiento, especialmente cuando se utiliza agua de las zonas de los muelles para enviar el pescado a la plantas de tratamiento. **ICM SF (1996)**

MEDIO AMBIENTE

Las salmonellas existentes en los efluentes de aguas residuales y en las heces secas de los animales, llegan a los arroyos, ríos y aguas costeras. El lodo de las aguas residuales puede contener grandes cantidades de salmonellas, por lo que si se utiliza con finalidades agrícolas diseminará la bacteria. Una vez introducidas en el medio ambiente, las salmonellas pueden permanecer viables durante meses. Las salmonellas también pueden diseminarse en el polvo y en los aerosoles que se generan durante el manejo y tratamiento de los animales.

Diferentes circunstancias como estas, generan una contaminación medioambiental acumulativa. **Fernández (2000), ICMSF (1996)**

ALIMENTOS Y PIENSOS

Algunos alimentos, especialmente los de origen animal, han actuado como vehículos de transmisión en algunos brotes de salmonelosis. Los alimentos más comúnmente implicados han sido:

Carne

En contadas ocasiones, las Salmonellas se pueden hallar presentes en la carne de los animales que padecen septicemia inducida por *Salmonella*, pero corrientemente llegan a las superficies de la carne desde el contenido intestinal y desde las heces que se adhieren en el pelo, en la piel y en las patas de los animales cuando llegan para el sacrificio. Una importante contaminación de las canales de cerdo tienen lugar durante las operaciones de escaldado y pelado. Las bacterias son transferidas con facilidad de una canal a otra y desde las canales contaminadas a los utensilios, a las superficies de trabajo, y desde las manos de los operarios que manipulan la carne, a los tajos de carne y a la carne picada. En los brotes de Salmonelosis, la carne de vacuno y la carne de cerdo son identificadas corrientemente como vehículos de *Salmonella*. En Estados Unidos, el roast beef insuficientemente cocido fue implicado como vehículo de transmisión corriente. En Inglaterra y en el país de Gales, los datos relativos a la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos han implicado frecuentemente a la carne de cerdo, la carne picada y a los embutidos, como vehículos de transmisión. **ICMSF (1996)**

Aves de corral

Las canales y las porciones de pavo y de pollo están con frecuencia contaminados con salmonellas que llegan a las canales desde el tracto intestinal o desde la materia fecal existente en las patas y en las plumas. La contaminación cruzada es un problema especial, siendo a este respecto operaciones decisivas el desplumado y la evisceración de las aves y el enfriamiento de las canales. La contaminación cruzada de las manos de los operarios y la del material y utensilios puede diseminar la bacteria a las canales y porciones no contaminadas, continuando con la contaminación durante las operaciones subsiguientes de tratamiento, troceado y preparación. **ICMSF (1996)**

Huevos

Los huevos se pueden contaminar con salmonellas o por vía transovárica en las ponedoras infectadas o como consecuencia de la penetración de la cáscara y de las membranas. La inyección transovárica puede tener importancia en la propagación de *S. Enteritidis*, lo mismo que ocurre con *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*. La superficie de la cáscara de los huevos se puede contaminar durante su tránsito a través de la cloaca o cuando se halla expuesta a un ambiente contaminado con materia fecal. *Salmonella* puede penetrar en el huevo, especialmente cuando este se enfría o si se lava inadecuadamente. **ICMSF (1996)**

Leche

La leche fresca está implicada corrientemente como vehículo de transmisión en los brotes de salmonelosis. La *Salmonella* llega a la leche por medio de la contaminación de la ubre y de los pezones, menos

corrientemente durante las infecciones septicémicas de las vacas y posiblemente desde los operarios que manipulan la leche. Los productos lácteos como la leche en polvo, el queso, los helados y algunas ocasiones la mantequilla, han sido reportados como vehículos de *Salmonella*. **ICMSF (1996)**

Otros alimentos

Otro tipo de alimentos también han sido reportados como vehículos de *Salmonella*, como el coco, la cebada, los cereales en polvo, la levadura, bombones de chocolate, salsa de soya, la pimienta y colorante de carmín entre otros. Sin embargo, es posible que estos alimentos hayan sido contaminados por fuentes animales **ICMSF (1996)**

Piensos

Los piensos de animales están frecuentemente contaminados con *Salmonella*. Aunque las harinas de carne, huesos, plumas y de pescado se deben fabricar a temperaturas letales para las salmonellas, estos materiales con frecuencia están contaminados, de modo que los piensos pueden ser una fuente importante de salmonellas tanto para los animales como para el ambiente de la granja. **Fernández (2000), ICM SF (1996)**

4.2.5 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO, MUERTE Y SUPERVIVENCIA DE *Salmonella*

TEMPERATURA

Se ha informado de la capacidad de las salmonellas para crecer a temperaturas menores de 5°C, pero en algunos casos no ha sido

confirmada excepto por la observación de colonias en los medios selectivos **D'aoust (1991)**. La temperatura máxima de crecimiento, es de 49.5° C, dato importante como el valor por encima del cual deben ser mantenidos los alimentos almacenados en caliente para impedir el crecimiento de las *Salmonella*. Aunque 55°C serían suficientes, en las disposiciones con frecuencia se especifican 63°C y aunque la congelación puede resultar perjudicial para *Salmonella*, no garantiza su destrucción en los alimentos **ICM SF (1996)**

pH

El pH señalado como mínimo para el crecimiento es 3.8. A medida que el pH sobrepasa el óptimo, que es de 7.0, o desciende por debajo de él, el ritmo de crecimiento de las salmonellas disminuye. Cuando se sobrepasan los valores extremos para el crecimiento, puede tener lugar la muerte de las *Salmonella*. **ICM SF (1996)**

IRRADIACIÓN

La supervivencia está influida en gran manera por el sustrato en el que son irradiadas las células. La presencia de oxígeno durante el tratamiento con radiación aumenta el efecto letal y *Salmonella* es destruida más rápidamente mediante irradiación a temperaturas elevadas, pero subletales entre 45 – 55°C. A temperaturas reducidas, las bacterias son menos sensibles a la radiación ionizante. La resistencia a la radiación aumenta en el estado de congelación. Las condiciones y las dosis de radiación necesarias para eliminar las salmonellas de los alimentos no congelados, congelados o desecados, están perfectamente determinadas y los tratamientos están admitidos por muchas autoridades sanitarias.

ICM SF (1996)

4.3 EPIDEMIOLOGIA

De los agentes etiológicos productores de ETAs, hasta hace algunos años *S. Typhimurium* era el principal agente causal de enfermedad en pollos y de toxoinfección alimentaria en humanos; en los años 70 lo fue *S.hadar*, pero el incremento que se presentó para *S.Enteritidis* fue masivo desde el año 1980 en el Reino Unido, el noroccidente de Europa, EE.UU y otros países del mundo, la cual se ha constituido en una de las más comunes serovariedades causantes de morbimortalidad en humanos. **Suárez y Mantilla (2000), Bennet (1998).**

La Organización Mundial De La Salud (OMS) considera a la diarrea por infección de origen alimentario como la enfermedad más común y más ampliamente diseminada en poblaciones humanas en el mundo; para 1999 se estimaron 1.500 millones de casos al año y 3 millones de muertes de niños. Los alimentos contaminados se consideran un factor de riesgo para la presentación de diarrea asociada a mal nutrición en menores de cinco años. Entre 12 y 13 millones de muertes se producen al año por el efecto combinado de la malnutrición y la infección. Para América latina la OMS reconoce que la enfermedad por toxoinfección alimentaria es importante y requiere el establecimiento de esquemas de vigilancia epidemiológica encaminados a determinar el número de casos y sus causas. Aunque no está descrita la incidencia real de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), ya que se requiere la mejora de sistemas de información y por la subnotificación en muchos países, principalmente en los que están en vías de desarrollo, el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) a través del Sistema de Información para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVE-ETA) reportó en 1996 la ocurrencia de 1.049 brotes con 35.700 casos; en 24.787 de estos casos (69,4%) se desconoció o no se informó

el agente etiológico; estos casos correspondieron a 541 brotes (51.1%). De los brotes en los cuales se conoció la causa, 161 con 7.750 enfermos correspondieron a ETAS de tipo bacteriano, y entre ellos la causa predominante fue *Salmonella* spp. con 6.494 afectados (83.7%). **Suárez y Mantilla (2000)**

Para USA, la FOODNET reportó en el 2003, un total de 6.017 casos de *Salmonella* dentro 15.600 casos totales de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos, siendo el serotipo S. Typhimurium el más común con un 20% de aislamientos, seguido por S. Enteritidis con 14%. **OMS (2001).**

En Colombia, en el contexto de la vigilancia en salud pública (VSP), las toxoinfecciones alimentarias y las fiebres tíficas, como enfermedades transmisibles de notificación obligatoria se captan como casos individuales a través del sistema SIS12. A partir de 1996, adicionalmente, se empezaron a captar las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) a través del Sistema Alerta Acción (SAA). Sin embargo, el sistema de vigilancia en salud pública aún no permite caracterizar el comportamiento de las enfermedades transmitidas por alimentos de acuerdo con su agente etiológico, salvo en los casos de cólera y brucelosis. **Ministerio (1998)**

En 1996 se notificaron en Colombia 818.235 casos de diarrea y 19.926 infecciones alimentarias de causa desconocida. La Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, entre los años 1991 y 1998 reportó tasas de incidencia para enfermedades transmitidas por alimentos que fluctuaron entre 38.4 y 62.9 casos/100.000 habitantes y en 1999 reportó los cárnicos crudos como el alimento que más frecuentemente es positivo para *Salmonella* spp. **Secretaría Distrital De Salud (1999).**

Aunque los aislamientos de *Salmonella* spp, usualmente no son caracterizados para conocer la distribución de las serovariedades, entre noviembre de 1996 y diciembre de 1997 de un total de 92 aislamientos de *Salmonella* spp. recibidos por el Laboratorio de Referencia de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, el 47.8% (44 aislamientos) fueron de *Salmonella Enteritidis*; el 27.1% (25) de *Salmonella Typhimurium* el 17.4% (16) pertenecían al grupo E1 (*S.anatum*, *S.meleagridis*, *S.give*, entre, otras); el 2.2% (2) eran *Salmonella Typhi* y el 5.5% (5) restante otras serovariedades **SIVIGILA (2002)**.

Durante el año de 1999 el Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos, INVIMA, detectó algo más de 100 toneladas de pasta de pollo importada de Estados Unidos y positiva para *Salmonella* spp. e informó al Ministerio de Salud acerca del riesgo inminente de que se presentaran brotes de salmonelosis El Ministerio, a través de su Oficina de epidemiología en el Informe Ejecutivo Semanal (semana epidemiológica Nº 34, Agosto 24 al 28 de 1999), alertó a las autoridades sanitarias de vigilancia y control sobre este riesgo sanitario. **Ministerio (1998)**.

Debido a la carencia de datos concretos respecto a la prevalencia de este patógeno en nuestro país y el impacto en la tasa de mortalidad causado por la enfermedad diarreica aguda (EDA), especialmente en la población de niños menores de 5 años y el alto costo que genera para los sistemas de salud, hacen que la prevención y el control de la EDA sea una prioridad de salud pública. Por esta razón, el grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) organizó a partir de 1997, un sistema de vigilancia con los Laboratorios de Salud Pública (LSP) y los laboratorios clínicos del país para los principales patógenos bacterianos causantes de EDA. Esta vigilancia permitió señalar en un primer

informe de los datos obtenidos de 1997 a 1999, la distribución de los serotipos prevalentes de *Salmonella* spp., el cual resaltó la importancia de mantener la vigilancia por el laboratorio y ampliar la cobertura en el país, con el fin de que los datos obtenidos tengan una mayor representatividad. **SIVIGILA (2002).**

De la organización de este sistema de vigilancia, surgieron los siguientes datos: Durante el periodo de enero de 2000 a diciembre de 2001 recibieron 780 aislamientos, 389 (49,9%) fueron remitidos como *Salmonella* spp. y 391 (50,1%) como *Shigella* sp. Los aislamientos fueron enviados por 18 LSP y 56 laboratorios clínicos de entidades hospitalarias, de los departamentos de Amazonas, Antioquia, Arauca, Atlántico, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Risaralda, Santander, Tolima, Valle y Bogotá. **SIVIGILA (2002). Tabla 1.**

Tabla 1. Distribución de *Salmonella* spp por serotipo. FUENTE: SIVIGILA (2002)

Serotipo	Humanos	Alimentos	Total
	n=295 (%)	n=41 (%)	n=336(%)
Enteritidis	120 (40,6)	12 (29,3)	132 (39,4)
Typhimurium	78 (26,4)	8 (19,5)	86 (25,7)
Typhi	21 (7,1)		21 (6,3)
Derby	7 (2,1)	2 (4,9)	9 (2,7)
Infantis	6 (2,0)		6 (1,8)
Anatum	1 (0,3)	4 (9,8)	5 (1,5)
Muenchen	5 (1,7)		5 (1,5)
Muenster	4 (1,4)	1 (2,4)	5 (1,5)
Panama	4 (1,4)	1 (2,4)	5 (1,5)
Sairpaul	5 (1,7)		5 (1,5)
Uganda	1 (0,3)	3 (7,3)	4 (1,2)
Otras (31)	43 (15,0)	10 (24,4)	53 (15,4)

Los aislamientos de *S. Enterica*, fueron remitidos por Bogotá y 17 departamentos; 153 de Bogotá, 95 de Antioquia, 24 de Santander y 21 del Valle (87,2 %); los restantes aislamientos fueron 9 del Huila, 9 de Risaralda, 6 de Putumayo, 3 del Tolima, 3 del César, 3 del Atlántico, 2 de Caldas, 2 de Nariño y 1 aislamiento de Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Guainía, Meta y Arauca respectivamente. De los 336 aislamientos de *Salmonella* 294 (87,5%) fueron de material clínico humano y 41 (12,2%) de alimentos. El serotipo más frecuente fue *S. Enteritidis* con 132 (39,3%) aislamientos, seguido de *S. Typhimurium* con 85 (25,7%) y *S. Typhi* 21 (6,3%) (Tabla 1). **SIVIGILA (2002).**

4.4 TECNICAS DE DETECCION

4.4.1 METODO TRADICIONAL MICROBIOLOGIA ISO 6579/1993 PARA LA BUSQUEDA DE *Salmonella* spp. A PARTIR DE MUESTRAS DE ALIMENTOS.

Los métodos para aislamiento e identificación de *Salmonella* a partir de alimentos pueden considerarse en 6 etapas sucesivas:

- Enriquecimiento no Selectivo: tiene como fin la revitalización de las bacterias de *Salmonella* sp. dañadas por las diferentes condiciones de tratamientos industriales o de almacenamiento. Se realiza en caldos ricos en nutrientes como peptona o bilis verde brillante.
- Enriquecimiento Selectivo: sirve para favorecer el crecimiento de las bacterias de *Salmonella* sp. en un ambiente que puede contener gran número de microorganismos diferentes a ella.
- Siembra en Placa de medios Sólidos Selectivos y Diferenciales: permite la visualización de las colonias sospechosas por su aspecto característico.

- Estudio de las Características Bioquímicas de las Colonias Sospechosas en Medios Adecuados y Análisis Antigénico.

Vandenne and Ribes (2002), Velilla et al (2004)

El pre-enriquecimiento se puede llevar a cabo o no, dependiendo del grado de probabilidad de que en el alimento existan células dañadas. Se utiliza cuando se analizan alimentos que han sido calentados, congelados y desecados y en aquellos alimentos en los que es de esperar que se encuentren células de salmonellas en escaso número. Los medios líquidos de pre-enriquecimiento no son inhibidores y permiten el crecimiento de la flora natural del alimento incluyendo las *Salmonella* **ICM SF (1996), Panglioli et al (2003), Velilla et al (2004).**

El enriquecimiento selectivo tiene por finalidad inhibir el crecimiento de otros microorganismos permitiendo la proliferación de *Salmonella*. Se consigue mediante el empleo de compuestos químicos inhibidores como colorantes, tetracionato y selenito; con el uso de temperatura óptimo y tiempo de incubación adecuada, permitiendo que la proporción de salmonellas con respecto a los demás microorganismos aumente de modo que puedan ser identificadas en placas de medios selectivo-diferenciales o mediante otras técnicas de identificación. Los tiempos de incubación suelen ser de 16 – 24 horas y las temperaturas varían entre 35 y 43° C. **ICM SF (1996), Panglioli et al (2003).**

La presencia de salmonellas se determina sembrando muestras de los caldos de enriquecimiento en placas de medios selectivos. Como agentes selectivos se emplean las sales biliares, el desoxicolato, el verde brillante, el sulfito bismuto y los antibióticos. La diferenciación de las salmonellas de otros microorganismos

se suele conseguir mediante los cambios de color que presentan los indicadores de pH que responden a la fermentación de la lactosa o de la sacarosa, pero también se basa en la producción de H₂S o en la descarboxilación de la lisina. Para la identificación, la primera selección se realiza en medios diferenciales como el TSI o la lisina-hierro agar. La identificación definitiva se realiza mediante pruebas bioquímicas de cultivos puros, que diferencian las salmonellas de microorganismos de otros géneros. Finalmente podría realizarse serotipificación, pero esta información, realmente es útil en investigaciones epidemiológicas. Sin embargo, las pruebas serológicas se utilizan con mayor frecuencia que las bioquímicas en industrias de alimentos como un método más rápido y específico para confirmar la presencia de *Salmonella*. **ICMSF (1996), Pangloli et al (2003)**

Sin embargo, el tiempo que requiere este protocolo para la identificación presuntiva de *Salmonella* que es de 3 – 5 días y la baja sensibilidad y especificidad en los resultados finales, ha hecho que se investigue en métodos de detección más eficaces como los basados en anticuerpos fluorescentes, las pruebas de hibridación DNA/DNA, la serología de enriquecimiento, la prueba de la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), la inmunoinmovilización en disco con filtro de membrana y las pruebas con fagos de *Salmonella*. **ICMSF (1996), Jothikumar et al (2003).**

Otra metodología está basada en PCR, la cual ha venido reemplazando paulatinamente las pruebas bioquímicas y de aglutinación. Sin embargo, este método incluye una fase final confirmatoria, como la electroforesis, que requiere un cierto nivel de habilidades para realizarse, ya que es laboriosa y consume

tiempo, a la vez que limita el número de muestras a analizar. **De Medici et al (2003)**

Adicionalmente, es necesario aclarar que en diferentes normas descritas por los organismos de control, tanto a nivel Nacional (INVIMA) como Internacional (USDA) se ha declarado que el límite de detección de *Salmonella* en productos cárnicos, avícolas y huevos debe ser menor de 1 ufc en 25 g. **USDA, TERRAGNO.**

4.4.2 ANÁLISIS MOLECULAR - PCR EN TIEMPO REAL

La técnica de PCR revolucionó la industria de la biología molecular a comienzos de la década de los 80 y desde entonces se ha convertido en una herramienta vital para la investigación biológica. Uno de los objetivos de este tipo de técnicas es lograr una reducción en los tiempos de reacción y en los ciclos, valores que se consideran una ventaja en la PCR con la demanda de una mayor resolución y la necesidad de lograr ciclos de mayor velocidad. La técnica de PCR ha sido ampliamente utilizada para la detección de patógenos en alimentos con el fin de disminuir el tiempo de análisis en el laboratorio, pero se obtenían resultados cualitativos y no cuantitativos respecto a la presencia del patógeno en el alimento. **Bennet (1998), Ferreti (2001), Hill (1996), Wang et al (1997).**

Recientemente, se presentó la última de las variantes de PCR, la PCR en tiempo real que genera resultados en un menor tiempo adicionalmente evita la fase confirmatoria final que se realiza con electroforesis. El sistema de PCR en tiempo real está basado en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente. Esta señal incrementa en proporción directa a la cantidad del

producto de PCR en una reacción. **Hoorfar et al (2000), Knutsson et al (2002), McAvin et al (2001), Reischl et al (2002), Sails et al (2003).**

Una de las formas de realizarla, es con las pruebas TaqMan que utilizan la actividad exonucleasa fluorogénica 5' de la Taq polimerasa para medir la cantidad de secuencias blanco en las muestras de cADN. Los TaqMan son oligonucleótidos mas largos que los primers que contienen un tinte fluorescente usualmente en la base 5' y una señal de paro en la base 3'. Cuando se irradia, la señal fluorescente excitada transfiere energía a la señal de paro mas cercana; entonces la proximidad cercana del reportero y el extintor previene la emisión de cualquier fluorescencia mientras la fluorescencia está intacta. Las pruebas TaqMan están diseñadas para anillar a una región interna del producto de la PCR. Cuando la polimerasa replica un templado en el cual la prueba de TaqMan está unida, su actividad exonucleasa 5' diva la prueba. Esto finaliza la actividad del extintor y el reportero empieza a emitir florescencia, la cual incrementa en cada ciclo, proporcional a la tasa de clivaje de la prueba. La acumulación de producto de PCR es detectada por el monitoreo del incremento en la fluorescencia del reportero. El ensayo de TaqMan utiliza los parámetros térmicos y las condiciones de PCR universales. Debido a que el clivaje ocurre solamente si la prueba hibridiza al blanco, la fluorescencia detectada se origina desde la amplificación específica. **Ambion (2004), Dorak (2004), De Medici et al (2003), Hoorfar et al (2000), Knutsson et al (2002).**

Sin embargo, la alternativa mas económica es la unión del marcador a ADN de doble cadena, lo cual detecta la producción de amplicones, incluyendo amplificaciones no específicas y dimeros de primer, por el uso de un agente fluorescente intercalante como el SYBR-green o el bromuro de etidio. El SYBR

green se une al surco menor del ADN y nunca se une a ADN de cadena sencilla. El uso del marcador SYBR green para la detección de los productos de PCR ha sido una buena alternativa a los problemas presentados con la Taqman, por la necesidad de presentarse pruebas de unión a moléculas fluorescentes. En este caso, la especificidad de la reacción se da por la Temperatura de fusión (T_m) del amplicon obtenido, definido como la temperatura a la cual el 50% del amplicon obtenido esta en configuración de doble cadena. La T_m depende de varios factores, incluyendo la concentración de ADN de doble cadena, el largo del amplicon y la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, la efectividad de este método depende del procedimiento de extracción y purificación para remover de los alimentos las sustancias que inhiben la actividad de la DNA polimerasa. **Ambion (2004), De Medici et al (2003), Dorak (2004), Jothikumar et al (2003), Ponchel et al (2003).**

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 ESTANDARIZACION DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACION DE *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis

5.1.1 CEPAS CONTROL

- ✓ *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis ATCC 13076
- ✓ *Salmonella choleraesuis* ATCC 10398
- ✓ *Salmonella typhi* ATCC 6539
- ✓ *Citrobacter freundii*
- ✓ *Proteus mirabilis*

Todas las cepas fueron crecidas en Agar nutritivo a 37°C x 24-48 hr y mantenidas en congelación a -20°C en glicerol al 50%.

5.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN

A. Lisistémica (**Ausubel et al (2002), Wang et al (1997)**)

- ✓ Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos 3 ml de un cultivo Overnight en caldo BHI de cada una de las cepas control. (5.1.1)
- ✓ Resuspender el pellet en 200µl de Agua destilada estéril.
- ✓ Calentar en baño de agua a 100°C por 10 minutos y enfriar inmediatamente a 0°C por 5 minutos.
- ✓ Congelar a -20°C hasta su uso.

B. Extracción con proDNA 2000 (Corpogen-Biotecnología de Colombia).

- ✓ La extracción se realiza a partir de 1 ml de un cultivo ON de cada cepa control (5.1.1), centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos siguiendo las indicaciones del proveedor.

5.1.3 OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos iniciadores de la reacción corresponden al gen SEFA, presente en *S. Enteritidis* (**De Medici et al (2003)**):

SEFA-1: 5'GCAGCGGTTACTATTGCAGC3'

SEFA-2: 5'CTGTGACAGGGACATTTAGCG3'

5.1.4 CICLO DE AMPLIFICACIÓN

La amplificación se realiza en el equipo LightCycler System (Roche Molecular Biochemicals, Germany).

- ✓ Denaturación a 95°C x 30s.
- ✓ 35 ciclos de Amplificación de 95°C x 10s, 55°C x 5s y 72°C x 10s.
- ✓ 1 ciclo de fusión de 95°C x 0s, 65°C x 15s y 95°C x 0s.
- ✓ Enfriamiento final a 40°C x 30s. (**De Medici et al (2003)**)

5.1.5 CURVA DE CLORURO DE MAGNESIO

Las concentraciones de cada reactivo y la concentración óptima de MgCl₂ para determinar la amplificación están indicadas en la **Tabla 2**.

TABLA 2 Cantidades de cada reactivo en la mezcla de reacción para la amplificación.

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	CANTIDAD USADA	CONCENTRACION FINAL
SYBR GREEN	10X	2 µL	1X
SEFA-1	10pM/ µL	1 µL	5nM/ µL
SEFA-2	10pM/ µL	1 µL	5nM/ µL
BSA	5 mg/ml	1 µL	0.25 µg/ µL

MgCl ₂	25mM	12 µL	2.5 mM
		20 µL	3.5 mM
		28 µL	4.5 mM
ADN	ND	3 UI	ND
Aguilibre de DNAsas		Completar la reacción a 20 µL	

ND: No se determinó.

5.1.6 ESPECIFICIDAD

Con las condiciones de reacción previamente establecidas (5.1.1 – 5.1.5) determinar la especificidad de la muestra usando como control positivo *S. Enteritidis* y como controles negativos las otras cepas enunciadas (5.1.1), utilizando el kit de extracción DNA2000 (5.1.2.2) para obtener el ADN.

5.1.7 SENSIBILIDAD

La sensibilidad fue detectada en muestras de pechuga de pollo esterilizada e inoculada con *S. Enteritidis* únicamente y con una mezcla de esta bacteria con *Proteus* y *Citrobacter*. El inóculo de cada cepa fue previamente estandarizado en 1 y 10 cel/ml a partir de un patrón MacFarland 0.5 y confirmado por recuento en placa en Agar Hecktoen. La recuperación de las bacterias en la matriz inoculada fue confirmada siguiendo el protocolo ISO6579/1993 (5.2.2)

5.1.8 COMPARACION DE METODOS DE EXTRACCION

A cada una de las cepas control (5.1.1) se le realizó extracción de ADN por lisis térmica (5.1.2.1) y por el kit de extracción DNA2000-Corpogen (5.1.2.2) y se amplificaron simultáneamente en el equipo de PCR en tiempo real.

5.2 IDENTIFICACIÓN SEROTIPO *S. Enteritidis* DE CEPAS AISLADAS PREVIAMENTE

Identificar género y especie de 40 cepas aisladas de diferentes muestras, que han sido identificadas como *Salmonella* spp, para determinar la prevalencia de este serotipo en nuestro medio. Las cepas a identificar fueron previamente aisladas siguiendo el protocolo ISO 6579/1993 (**Vandeverne and Ribes (2002)**), estandarizado en el laboratorio de investigación LEMA – universidad de los Andes, como sigue:

- ✓ Tomar 25g o ml de la muestra y adicionarlos en 225 ml de agua peptonada tamponada al 1%.
- ✓ Incubar a 37°C +/- 1 durante 16 - 20 horas.
- ✓ Sembrar 1 ml del preenriquecimiento en 10 ml de caldo Rapaport y en 10 ml de Caldo tetrionate, e incubar a 42°C +/- 1 durante 24 +/- 2 horas.
- ✓ Aislar en placas de agar Hektoen, SS y XLT-4 a partir de los enriquecimientos e incubar a 37°C +/- 1 durante 20 – 24 h y hasta 48 h si es necesario.
- ✓ Tomar 5 colonias sospechosas de *Salmonella* spp. y repicar en agar nutritivo, incubándolo a 37°C +/- 1 durante 24 +/- 2 h.
- ✓ Sembrar cada una de las colonias en Kliger y urea e incubar a 37°C +/- 1 durante 24 +/- 2 h.
- ✓ Terminar la identificación en una galería de API 20E.

El ADN de cada cepa es extraído con el kit DNA2000-Corpogen y congelado a -20°C hasta el momento de su análisis por PCR en tiempo real.

5.3 IDENTIFICACION DEL SEROTIPO *S.Enteritidis* EN MUESTRAS DE POLLO CRUDO POR PCR EN TIEMPO REAL.

Muestreo: Se tomaron 40 muestras de pechuga de pollo en un supermercado de Bogotá. 25g de cada muestra fueron adicionados en 225 ml de agua peptonada tamponada al 1% e incubados a 37°C +/- 1 durante 16 - 20 horas. De este preenriquecimiento, una alícuota de 1ml es tomada para realizar extracción de ADN mediante el kit DNA2000-Corogen. El ADN extraído es congelado a -20°C hasta el momento de su análisis por PCR en tiempo real.

5.4 COMPARACION ENTRE PCR EN TIEMPO REAL Y EL PROTOCOLO ISO6579/1993 PARA LA BUSQUEDA DE *Salmonella* spp.

A las 40 muestras de pechuga de pollo evaluadas por PCR en tiempo real se les realizo el protocolo ISO6579/1993 para la búsqueda de *Salmonella* spp. (5.2.2). Los resultados obtenidos por los dos métodos fueron enfrentados para corroborar la eficiencia de la técnica de PCR en tiempo Real.

ANALISIS ESTADÍSTICO

El resultado cualitativo obtenido por cada uno de los métodos en las 40 muestras de pollo trabajadas, será analizado por un test de proporciones para determinar si existe diferencia significativa entre ellos, utilizando el programa profesional Statistix 8.

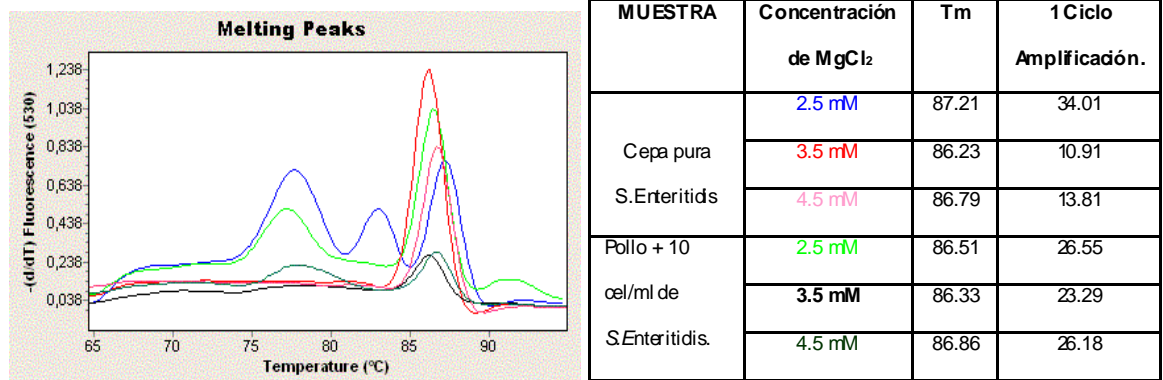
6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS METODOLOGICOS

ESTANDARIZACION PCR EN TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACION DE *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis

Curva de cloruro de Magnesio

Para estandarizar la reacción, se realizó una curva de $MgCl_2$ con el fin de determinar la concentración mas adecuada para obtener amplificaciones óptimas en la identificación. Se realizó estandarización de la PCR tanto en la cepa pura de *S. Enteritidis* como en una muestra de pollo previamente esterilizado e inoculado con 10 cel/ml de la misma cepa, a los cuales se les hizo extracción utilizando el Kit producido por Corpogen (5.1.2 B). Las cantidades y concentraciones utilizadas en la mezcla de reacción se muestran en la **tabla 2**. Se realizo el montaje en los capilares correspondientes al equipo Lightcycler y la amplificación se hizo con el ciclo descrito anteriormente (5.1.4), obteniendo que el mejor pico y la T_m mas adecuada para realizar la identificación se da a una concentración de 3.5 mM de $MgCl_2$, tanto en la cepa pura como en pollo inoculado. GRÁFICA 1



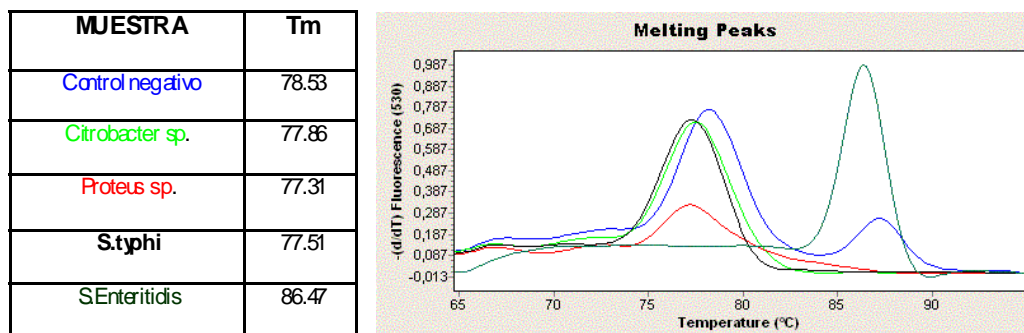
Gráfica. Curva de cloruro en la cepa control y pollo inoculado con 10 cel/ml de

S. Enteritidis

Con estos resultados podemos notar el adecuado funcionamiento de los primers con el ciclo de amplificación probado, ya que se presentan picos de amplificación en todos los casos y basados en los resultados, podemos notar que la concentración de 3.5 mM de Cloruro de Magnesio es la mas adecuada para la reacción, tanto en la cepa pura de S.Enteritidis como en pollo inoculado con esta cepa, mostrando que incluso realizando extracción de ADN a partir de este alimento, no hay inhibición de la PCR y se presentan buenos resultados de amplificación. Por estas razones, la concentración de 3.5mM será la utilizada a partir de este momento en todas las reacciones

ESPECIFICIDAD

Una vez determinada la concentración óptima de MgCl₂ para la amplificación, se realiza la prueba de especificidad de los oligonucleótidos primers con controles negativos que inducen otras especies de *Salmonella* y los entericos que usualmente se reportan como interferentes en los resultados por microbiología clásica. GRÁFICA 2.



GRÁFICA 2. Resultados de Especificidad. Amplificación del control positivo y posibles interferentes.

Este resultado nos muestra la alta especificidad de los primers SEFA, ya que el Tm obtenido para S.Enteritidis difiere en 1 unidad de los reportados para los

controles negativos, dando estos como muestras negativas, es decir que no poseen el gen blanco de la amplificación. Esta estandarización se realizó en dos réplicas de modo que se corroboraron los resultados y promediando los Tm de los controles positivos se obtiene que el Tm medio para la amplificación es de 86. Los picos en temperaturas diferentes pueden corresponder a dímeros de primer o ruido que genera fluorescencia en los ciclos de amplificación, pero solo son consideradas muestras positivas aquellas que generan pico en Tm óptimo para *S. Enteritidis*. Con estos resultados está comprobada la especificidad de los primers oligonucleotidos SEFA reportados para *S. Enteritidis* y utilizados en la reacción de modo que se asegura que solo se obtendrán amplificaciones en cepas pertenecientes a este serotipo y que no existen amplificaciones cruzadas con genes de otras especies o serotipos del mismo género o con bacterias de otros géneros que posean un genoma similar o que generalmente puedan ser hallados como interferentes en las pruebas de identificación utilizadas para este patógeno. Dicha especificidad se debe a la adecuada escogencia de oligonucleotidos para el serotipo *S. Enteritidis* y las temperaturas del ciclo de amplificación, que en conjunto hacen más específica la unión de los oligonucleótidos primers al gen blanco, evitando cruces con otras especies de *Salmonella* como *S. typhi*, la cual es comúnmente encontrada también en alimentos de origen animal; y con otros géneros bacterianos como *Proteus* y *Citrobacter*, los cuales se presentan como interferentes en la identificación de *Salmonella* spp. por el método tradicional, donde se reportan comúnmente como falsos positivos, por su alta similitud en características biológicas y fisiológicas con *Salmonella* spp. **PANGLOLI ET AL (2003), SIVIGILA (2002), YUNO ET AL (1995).**

SENSIBILIDAD

Esta prueba busca determinar la mínima concentración celular de *S. Enteritidis* presente en pollo crudo que es detectada en la amplificación; sin embargo debe tenerse en cuenta que la extracción de ADN parte de un pre-enriquecimiento, que aumenta la carga inoculada y asegura viabilidad de las bacterias que están siendo detectadas por PCR. Se realizó en pechuga de pollo esterilizada en autoclave, y la ausencia de microorganismos se confirmó por siembra en medios nutritivos. La pechuga fue inoculada primero con 1 y 10 cel/ml de *S. Enteritidis* y luego con una mezcla de *S. Enteritidis*, *Proteus* y *Citrobacter* con 1 y 10 cel/ml cada una. Los inóculos utilizados fueron estandarizados con patrón Mac Farland 0.5 y confirmados en agar Hecktoen, por siembra en superficie. **Tabla 3**

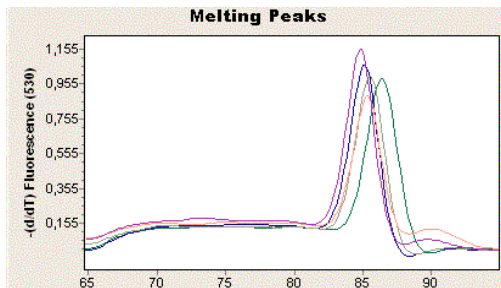
TABLA 3. ESTANDARIZACION DE INOCULOS POR MICROBIOLOGIA TRADICIONAL

MICROORGANISMO	REPLICAS	DILUCION	RECUENTO PROMEDIO ufc/ml
<i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	3	4	INCONTABLE
	4	3	INCONTABLE
	4	2	114
	4	1	14
	6	0	1
<i>Proteus</i>	2	4	INCONTABLE
	2	3	209
	2	2	69
	2	1	16
	2	0	0
<i>Citrobacter</i>	2	3	INCONTABLE
	2	2	136
	2	1	26
	2	0	4

Los resultados presentados en la tabla 3, permiten comparar las concentraciones celulares de los microorganismos utilizados como controles positivos y negativos en los diferentes ensayos realizados durante la investigación. Se obtuvo la concentración mas baja de cada uno de los microorganismos mediante diluciones del patrón Mac Farland 0.5, de modo que se llegó a obtener solo una

célula de cada microorganismo, dato que fue corroborado por crecimiento en agares selectivos y diferenciales de 1 ufc. Esta concentración es la indicada para hacer la inoculación de la matriz en evaluación. Adicionalmente, se verificó la recuperación de la célula inoculada en el pollo, siguiendo nuevamente el protocolo tradicional ISO 6579/1993 (5.2) para la búsqueda de *Salmonella* spp. Este procedimiento se realizó con *S. Enteritidis*, obteniendo crecimiento abundante de la bacteria en el aislamiento final, con colonias típicas en cada medio utilizado, según las indicaciones de los productores de cada agar. Posteriormente, se realizó inoculación con una mezcla de *Proteus*, *S. Enteritidis* y *Citrobacter* crecidos en caldo BHI, la cual contenía 1 cel de cada microorganismo, para ser inoculado en pollo previamente esterilizado. El resultado final, nos muestra una recuperación final de los tres microorganismos, obteniendo en HK una diferenciación más clara de las tres colonias y creciendo los tres microorganismos en cantidades similares. Contrario a esto, en Agar SS, no hay claridad en la diferenciación de las colonias de los microorganismos, ya que todas presentan producción de sulfuros y se requiere de confirmaciones adicionales para su identificación.

Posteriormente, se hizo la extracción de ADN al pollo inoculado y se realizó la amplificación, en la que se obtuvo amplificación positiva en todas las muestras con un Tm similar al del control positivo.



MUESTRA	Tm
Pollo+ 1 cel <i>S. Enteritidis</i>	85.18
Pollo+ 10 cel <i>S. Enteritidis</i>	85.59
Pollo+ 1 cel pool	85.38
Pollo+ 10 cel pool	84.89
<i>S. Enteritidis</i> (Control positivo)	86.47

GRAFICA 3. Amplificación para pollo inoculado con *S. Enteritidis* con 1 y 10 cel/ml.

El resultado de la gráfica 3 y los T_m obtenidos nos muestran resultados positivos en todos los casos, indicando la posibilidad de detectar una concentración muy baja de *S. Enteritidis* en una matriz de alimento, pollo en este caso, incluso con flora acompañante. Con estos datos, se puede corroborar el adecuado funcionamiento de los oligonucleotidos primers, ya que no amplifica otras bacterias presentes en el alimento, incluso aquellas que han sido sometidas a enriquecimiento previo haciendo que se aumente su carga normal en el alimento.

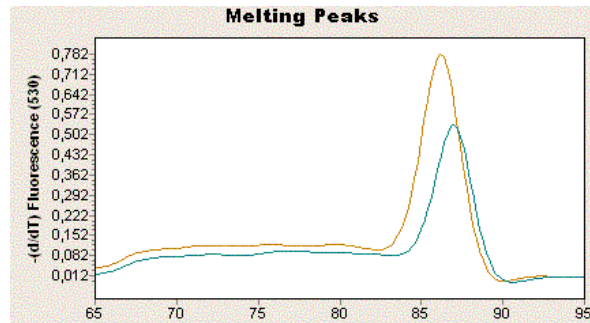
Con el preenriquecimiento que se realiza a la muestra se evita el reporte de falsos resultados mediante la técnica de PCR, ya que hace que se aumente la carga de los microorganismos y asegura la detección de los mismos aun cuando hay muy pocas células presentes. Además, asegura que las bacterias detectadas sean viables y no se generen amplificaciones por ADN de bacterias que estuvieron presentes en el alimento pero que fueron eliminadas en el proceso de producción, de esta forma se asegura que realmente se este identificando el patógeno que podría representar un riesgo en salud pública al estar presente en un alimento que será distribuido para consumo humano.

COMPARACIÓN MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este ensayo, se busca determinar si la extracción por lisis térmica estandarizada previamente en el laboratorio LEMA permite obtener ADN que presente amplificaciones similares a las obtenidas con ADN extraído y purificado por el kit DNA200-Copogen, de modo que se pueda realizar amplificaciones óptimas de cepas puras con un protocolo "manual" de extracción de ADN en el que se lisan las células pero no se eliminan componentes adicionales al ADN como RNA o proteínas, es decir no hay una purificación de los ácidos nucleicos de interés. Para esto, se realizó amplificación comparando los dos métodos de

extracción descritos (5.1.2), inicialmente con el control positivo S. Enteritidis y luego con todos los controles utilizados en la estandarización de especificidad.

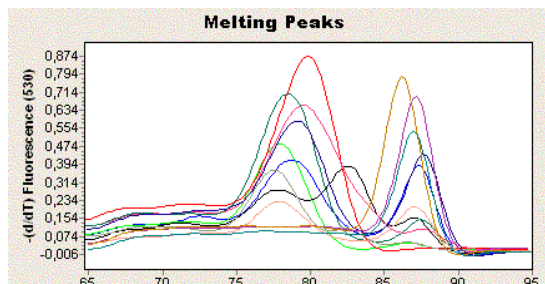
Grafica 4.



GRAFICA 4. Amplificación del control positivo extraído por el kit DNA2000-Corpopgen (■ Tm=86.30) y por lisis térmica (□ Tm=87.08)

En estos resultados se observa la generación de un pico que indica muestras positivas en un Tm muy similar para los dos métodos de extracción, sin embargo el ADN tratado con lisis térmica inicia más tarde su amplificación y genera menos cantidad debido a que la carga inicial de ADN es menor. A pesar de esto el resultado no presenta diferencias significativas entre los dos métodos.

Contrario a esto, al observar la gráfica de la amplificación todas las cepas control extraídas con lisis térmica, podemos notar que las muestras presentan mucho ruido y que muestras que se esperan negativas, generan un pico de amplificación en una Tm muy cercana a la esperada para S. Enteritidis, que aunque podrían corresponder a dímeros de primer, pueden ser tomados como falsos positivos. Por esta razón el protocolo de lisis, no funciona mejor que el kit de extracción y usar un kit aseguraría resultados más confiables.



MUESTRA	Tm por lisis termica	Tm por Kit
<i>S. Enteritidis</i>	87.08	86.30
<i>S. typhi</i>	87.20	82.74
<i>S. choleraesuis</i>	87.79	78.72
<i>Proteus</i>	80.03	82.87
<i>Citrobacter</i>	80.03	78.20

GRAFICA 5. Comparación de Tm del ADN de las cepas control extraído por dos métodos diferentes.

Los Tm obtenidos muestran amplificación positiva en todas las cepas evaluadas que se les realizó extracción por Lisis térmica, los cuales pueden originarse por la formación de dímeros de primer o por amplificaciones de otros componentes celulares como proteínas y RNA, los cuales no son eliminados por este protocolo de extracción de ADN y que al unirse con el reportero SYBR green emiten fluorescencia como si fueran productos de amplificación. Debido a estos resultados y a la posibilidad de reportar falsos positivos por el ruido presentado en la amplificación de cepas controles negativos que origina picos de fluorescencia en el equipo que no necesariamente corresponden a amplificación del gen blanco, esto todos los experimentos siguientes son realizados a partir de ADN extraído con el Kit DNA2000-Corpogen, Colombia.

6.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

IDENTIFICACIÓN DEL SEROTIPO *S. Enteritidis* DE CEPAS AISLADAS PREVIAMENTE

Una vez estandarizada la técnica de PCR en tiempo real con los oligonucleótidos primers SEFA para *S. Enteritidis*, se utilizó esta técnica para identificar el serotipo Enteritidis dentro de un grupo de cepas aisladas previamente de diferentes orígenes por el protocolo ISO6579/1993 (5.2.2), e identificadas por API 20E.

Este sistema de identificación permitió llegar a la especie de solo algunas de las cepas pero la mayoría de ellas fueron identificadas únicamente hasta género (*Salmonella* spp.), dando como sugerencia continuar la identificación con pruebas serológicas que permitan determinar el serotipo de la bacteria. Cada una de las cepas fue evaluada por PCR en tiempo real para detectar cual de ellas correspondía al serotipo Enteritidis, según el Tm que presentaran, teniendo en cuenta el obtenido para el control positivo. De las 37 cepas, 23 (62.16%) fueron S.Enteritidis. En promedio, las cepas positivas tuvieron un Tm de 86.79 y la cepa control tuvo Tm=86.91, lo cual corrobora la especificidad de la prueba para la identificación del serotipo Enteritidis. **Tabla 4**

TABLA 4. Identificación de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de diferentes fuentes usando ISO 6579/1998 Y API, e identificación del serotipo *S.Enteritidis* por PCR en tiempo real.

CEPA	PROCEDENCIA	IDENTIFICACION POR ISO6579 Y API	IDENTIFICACION <i>S.Enteritidis</i> por PCR en tiempo real	
			Tm	Resultado
1	Aislamiento clínico	<i>Salmonella</i> Enteritidis	86.76	Positivo
2	Agua de Quebrada	<i>Salmonella</i> sp	86.77	Positivo
3	Agua de Quebrada	<i>Salmonella</i> sp	86.88	Positivo
4	Agua acueducto	<i>Salmonella</i> sp	87.02	Positivo
5	Pollo crudo	<i>Salmonella</i> sp	86.86	Positivo
6	Pollo crudo	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
7	Jamón	<i>Salmonella</i> sp	86.81	Positivo
8	Tocineta	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
9	Tocineta	<i>Salmonella</i> sp	89.69	Negativo
10	Agua de lago	<i>Salmonella</i> sp	86.66	Positivo
11	Pollo crudo	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
12	Materia fecal perro	<i>Salmonella</i> sp	86.96	Positivo
13	Agua de lago	<i>Salmonella</i> sp	86.74	Positivo
14	Pollo crudo	<i>Salmonella</i> sp	86.87	Positivo
15	Agua de lago	<i>Salmonella</i> sp	87.55	Negativo
16	Pollo crudo	<i>Salmonella paratyphi</i>	86.68	Positivo
17	Pollo crudo	<i>Salmonella arizonae</i>	NA	Negativo
18	Pollo crudo	<i>Salmonella arizonae</i>	86.89	Positivo
19	Agua de lago	<i>Salmonella pullorum</i>	86.92	Positivo
20	Cárnico crudo	<i>Salmonella Typhi</i>	86.42	Positivo
21	Aislamiento clínico	<i>Salmonella Typhi</i>	86.71	Positivo
22	Concentrado para animales	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
23	Vegetales crudos	<i>Salmonella arizonae</i>	NA	Negativo
24	Aislamiento clínico	<i>Salmonella</i> sp	86.72	Positivo

25	Cuello ternera	<i>Salmonella</i> sp	86.61	Positivo
26	Ossobuco ternera	<i>Salmonella</i> sp	86.45	Positivo
27	Lomo de cerdo	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
28	Carne magra de cerdo	<i>Salmonella</i> sp	87.26	Negativo
29	Lomo de cerdo	<i>Salmonella</i> sp	86.90	Positivo
30	Canales de ternera	<i>Salmonella</i> sp	78.23	Negativo
31	Cuello de ternera	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
32	Mbrtadela	<i>Salmonella</i> sp	86.80	Positivo
33	Carne Magra de cerdo	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
34	Costilla	<i>Salmonella</i> sp	NA	Negativo
35	Carne Magra de Cerdo	<i>Salmonella</i> sp	86.82	Positivo
36	Papada de cerdo	<i>Salmonella</i> sp	86.95	Positivo
37	Sirlón de res	<i>Salmonella</i> sp	87.03	Positivo
ATCC 13076	CONTROL POSITIVO	<i>S. Enteritidis</i>	86.67	

Las cepas aisladas provienen de diferentes fuentes como alimentos para consumo humano, aguas ambientales y aislamientos de pacientes que presentan infección por el patógeno, lo cual nos indica la amplia distribución de *Salmonella* en el ambiente, haciendo que esta bacteria se disemine fácilmente y sea común encontrarla en la materia prima de una gran variedad de productos alimenticios destinados a consumo humano y consumo animal. Además se evidencia el ciclo trófico presentado en la naturaleza, que se inicia con las heces de animales que contienen como flora normal la *Salmonella* y que es diseminada a fuentes de agua que pueden ser utilizadas en riegos de cultivos o industrias de alimentos, contaminando diferentes productos alimenticios que al ser consumidos por humanos generan infecciones que podrían ser tan graves hasta producir septicemia, de modo que se logra aislar de sangre periférica de pacientes infectados con este microorganismo. Es por esto, que se ha logrado aislar este patógeno de fuentes tan variadas que finalmente están relacionadas entre sí.

La identificación de estas cepas mediante el protocolo tradicional de microbiología, es dispendioso e inespecífico, ya que comúnmente se presenta

confusión en la identificación con otras bacterias de características bioquímicas similares como *Proteus*, *Shigella* y *Citrobacter*. Adicionalmente, la identificación mediante el sistema API 20E, aunque genera resultados más confiables respecto al género de la bacteria evitando el reporte de falsos positivos, no arroja resultados específicos a cerca de la especie y el serotipo de la cepa en identificación, incluso, el mismo sistema aconseja continuar la identificación mediante serotipificación para que dicho procedimiento sea más completo y exacto. Estos hallazgos nos muestran los diferentes inconvenientes que presentan los métodos tradicionales de microbiología y justifican la utilización de técnicas moleculares que generen resultados con mayor especificidad.

IDENTIFICACIÓN DEL SEROTIPO *S.Enteritidis* EN MUESTRAS DE POLLO CRUDO POR PCR EN TIEMPO REAL

El ADN extraído de las 40 muestras de pollo obtenidas en un supermercado de Bogotá, fue llevado a PCR en tiempo Real para determinar la presencia del serotipo Enteritidis en muestras en distribución en Bogotá para consumo humano. De las 40 muestras 17 (42.5%) presentaron amplificación positiva para el serotipo Enteritidis con Tm para cada muestra muy similares a las obtenidas en el control positivo. **Tabla 5**

Tabla 5. Detección del serotipo *S.Enteritidis* por PCR en tiempo real en muestras de pollo crudo

MUESTRA	Tm	RESULTADO PARA <i>S.Enteritidis</i>
<i>Citrobacter</i> sp (control negativo)	7618	Negativo
<i>S.Enteritidis</i> (Control Positivo)	8667	Positivo
1	8647	Positivo
2	8628	Positivo
3	NP	Negativo
4	NP	Negativo
5	8585	Positivo
6	8640	Positivo
7	8633	Positivo
8	8600	Positivo
9	NP	Negativo
10	8623	Positivo

11	8589	Positivo
12	8577	Positivo
13	NP	Negativo
14	NP	Negativo
15	NP	Negativo
16	7568	Negativo
17	7674	Negativo
18	7514	Negativo
19	8598	Positivo
20	7686	Negativo
21	7652	Negativo
22	7516	Negativo
23	8551	Positivo
24	8559	Positivo
25	8645	Positivo
26	7639	Negativo
27	7654	Negativo
28	8581	Positivo
29	7601	Negativo
30	77.12	Negativo
31	7679	Negativo
32	NP	Negativo
33	7699	Negativo
34	8533	Positivo
35	77.02	Negativo
36	77.27	Negativo
37	8597	Positivo
38	8579	Positivo
39	77.47	Negativo
40	NP	Negativo

Este resultado muestra la alta prevalencia del serotipo en la carne de pollo, lo cual es preocupante si se extrapola a toda la carne de pollo que se está distribuyendo actualmente en Bogotá, ya que la ley Nacional del Ministerio de Protección Social prohíbe la presencia de este patógeno en muestras de pollo crudo. Sin embargo el tamaño de la muestra no es alto y no puede concluirse que este dato indique la real prevalencia del patógeno. Estas muestras positivas para *Salmonella* encontradas a la venta, pueden deberse al protocolo de microbiología tradicional ISO6579/1993, utilizado para la detección de *Salmonella*, el cual es inespecífico y poco sensible en comparación con PCR en tiempo real, ya que no siempre se recupera el patógeno en los medios selectivos y diferenciales utilizados en los análisis de calidad, generando así falsos negativos y permitiendo que el producto salga a la venta, haciendo que la

circulación de cepas este patógeno sea elevada y aumente la posibilidad de generar un brote epidemiológico de importancia en salud pública.

COMPARACION ENTRE PCR EN TIEMPO REAL Y EL PROTOCOLO ISO 6579/1993 PARA LA BUSQUEDA DE *Salmonella* spp.

Paralelamente, a las 40 muestras de pollo evaluadas por PCR en tiempo real, se les realizó búsqueda de *Salmonella* spp, mediante el protocolo ISO6579/1993 (5.2.2) utilizando como enriquecimientos el Caldo Rappaport y el caldo Tetrationate; y como medios de aislamiento el XLT4, SS y HK.

De las 40 muestras procesadas, se aislaron un total de 105 colonias sospechosas de *Salmonella*, tomando de cada muestra procesada como máximo las 5 colonias mas típicas, según la descripción dada por el fabricante de cada medio de cultivo, es decir colonias lactosa negativas productoras de sulfuros. Sin embargo, sólo 7 de estas cepas (6.66%) fueron identificadas por API como *Salmonella* y serotipificadas por el laboratorio nacional de Referencia - INVIMA, como S. Enteritidis, las cuales pertenecen a 5 de las 40 muestras de pollo y el porcentaje de interferentes que fueron identificados como bacterias de otros géneros es alto, lo cual podría prestarse para generar falsos reportes de resultados positivos, siendo *Proteus* el interferente mas común. **Tabla 6.**

En general, tanto en lecturas a las 24 horas como a las 48 horas de incubación, los resultados en los medios de cultivo para los aislamientos son los mismos. Se encontró que el enriquecimiento con Rappaport permite un crecimiento abundante de coliformes, lo cual genera competencia para la *Salmonella* y hace que esta no se pueda recuperar. Los resultados con este enriquecimiento, muestran una recuperación alta de coliformes en XLT4 y no se observan

colonias con producción de sulfuros. En HK, también se recuperan muchos coliformes, pero hay un crecimiento medio de productores de sulfuros que podrían ser *Salmonella* o *Proteus*. En SS, el crecimiento es más demorado y aunque se recuperan Coliformes, el grado es menor. Los no coliformes crecen más lento y la producción de sulfuros es mínima.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el caldo Tetrathionate muestran que este enriquecimiento inhibe en mayor grado que el caldo Rappaport la flora coliforme acompañante y estimula un mayor crecimiento de lactosa negativos productores de sulfuros, sospechosos de *Salmonella*. En XLT4, solo en muestras muy contaminadas se alcanza a recuperar un crecimiento bajo de coliformes y aunque el crecimiento de colonias sospechosas de *Salmonella* es poco, las colonias que se encuentran, presentan morfología típica de *Salmonella* (Centro negro, alrededor rosado), lo cual asegura la recuperación más precisa del patógeno ya que se da inhibición de flora acompañante y en especial *Proteus*, que no crece en este medio de cultivo, disminuyendo así los falsos positivos. En HK, se recuperan coliformes, pero se observan más colonias con sulfuros a las 24 horas de incubación; a las 48 horas, no hay colonias típicas, los sulfuros se pierden fácilmente y no se identifican colonias de *Salmonella*. En SS, en cambio prácticamente no hay crecimiento de ninguna morfología bacteriana, tal vez por la inhibición que produce el medio en combinación con este enriquecimiento.

Otro hallazgo importante en los aislamientos provenientes de Tetrathionate es la recuperación de *Pseudomonas* en SS y en HK, la cual resiste los componentes inhibitorios de cada medio de cultivo y logra recuperarse. En XLT, en cambio, se inhibe. **Tabla 6**

TABLA 6. Grado de recuperación de posibles Salmonellas y Coliformes en los aislamientos realizados en cada medio de cultivo según el enriquecimiento utilizado.

ENRIQUECIMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	RECUPERACION POSIBLES SALMONELLA	RECUPERACION DE COLIFORMES
CALDO RAPPAPORT	XLT4	BAJA	ALTA
	SS	BAJA	MEDIA
	HK	BAJA	MUY ALTA
CALDO TETRATIONATE	XLT4	MEDIA	BAJA
	SS	BAJA	NR
	HK	ALTA	MEDIA

BAJA: Se obtiene Crecimiento sólo en el masivo. **MEDIA:** Crecimiento en el masivo y en la primera rejilla. **ALTA:** Crecimiento en el masivo y las dos rejillas. **MUY ALTA:** Crecimiento abundante hasta el espiral. **LAS MISMAS CONVENCIONES SON UTILIZADAS EN LA DISCUSION DEL TEXTO.**

Estos resultados muestran la importancia de estandarizar previamente en el laboratorio de análisis los enriquecimientos y medios de cultivo a utilizar en la búsqueda de *Salmonella* spp., de modo que se logró la mejor combinación que permita inhibir flora acompañante presente en los alimentos que pueden enmascarar la presencia de *Salmonella* y evitar recuperarla generando falsos negativos o por el contrario, reportar falsos positivos al aislar bacterias interferentes de características fisiológicas muy similares a *Salmonella* como *Proteus* y *Citrobacter* que por la producción de sulfuros crecen en colonias muy similares a las reportadas como típicas en los medios de cultivo selectivos y diferenciales diseñados para *Salmonella*, los cuales funcionan en base a la fermentación de la lactosa y la producción de sulfuros como resultados de esa fermentación. Adicionalmente, también es importante hacer una confirmación

bioquímica de las colonias sospechosas aisladas de cada medio, antes de dar un resultado final para así evitar reportar falsos resultados. **Tabla 7**

Tabla 7. Reportes de posibles falsos positivos en las muestras de pollo analizadas para *Salmonella* por ISO 6579/1993

MICROORGANISMO	% HALLAZGOS	SIMILITUDES ENCONTRADAS (Bergey's)
<i>Proteus</i>	50.47	Es un no coliforme productor de sulfuros. Pocas veces es inhibido por los medios para <i>Salmonella</i>
<i>Citrobacter</i>	20.95	Aunque algunas cepas son Lactosa positiva, la producción de sulfuros no permite ver el color de la colonia. Además algunos medios como XLD el PH vira rápidamente y no se distingue si hay o no fermentación.
<i>Erwinia</i>	8.57	No fermentador de lactosa, pero no se reporta si produce o no sulfuros. Es un fitopatógeno y no es común encontrarlo en animales.
<i>Pseudomonas</i>	4.76	Aunque no está clasificada dentro de las bacterias entéricas, es un gram negativo que resiste la mayoría de inhibidores utilizados en los medios de cultivo no destinados a su aislamiento. Produce sulfuros y aunque no fermenta la lactosa la oxida creciendo en cualquiera de los medios diseñados para entéricas. Puede ser patógeno de animales y se ha reportado como generador de descomposición en carnes
<i>Cedecea</i>	2.86	Es un no coliforme no productor de sulfuros, que pudo recuperarse de muestras con alta carga de coliformes. Hace parte de la flora normal de animales, aunque es poco común aislarla
<i>Enterobacter</i>	1.91	Es un coliformes, flora normal de animales y aunque no produce sulfuros puede recuperarse de los medios al estar cercana a otras colonias que sí producen los sulfuros.
<i>Ewingella</i>	1.91	Es un coliforme recientemente reportado. No produce sulfuros y rara vez actúa como patógeno oportunista de animales.
<i>Shigella</i>	0.95	No coliforme, algunas cepas producen sulfuros. Crece exactamente igual a <i>Salmonella</i> en la mayoría de los medios, aunque su recuperación no es muy alta, es la bacteria con mayor probabilidad de reportarse como falso positivo.
<i>Yersinia</i>	0.95	No coliforme y aunque es no productor de sulfuros puede recuperarse unida a otras cepas, ya que hace parte de la flora intestinal de animales.

Estas identificaciones obtenidas mediante el sistema API 20E muestran la alta probabilidad de que en el mercado se este distribuyendo carne de pollo que contiene *Salmonella* y que no fue reportada por los cruces presentados con otras bacterias interferentes que evitan la recuperación adecuada de este patógeno y que hacen que se reporten falsos negativos. Esto puede

corroborarse, al comparar estos resultados obtenidos por microbiología tradicional con las amplificaciones logradas en PCR en tiempo real para S. Enteritidis, en los que podemos notar que hay una gran diferencia entre los dos métodos, ya que de varias de las muestras positivas por PCR en tiempo Real, no se aisló *Salmonella* por el método tradicional. **Tabla 8**

TABLA 8. Comparación de los resultados obtenidos por Método tradicional vs. PCR en tiempo real para la detección de *Salmonella*

MUESTRA	DETECCION DE <i>Salmonella</i> por ISO6579/1993		AMPLIFICACIÓN PARA S. Enteritidis por PCR en tiempo real	
	Presencia	Identificación por API	Tm	RESULTADO
1	Negativa	<i>Proteus</i>	86.47	Positivo
2	Negativa	NP	86.28	Positivo
3	Negativa	<i>Proteus</i>	NP	Negativo
4	Negativa	<i>Citrobacter</i>	NP	Negativo
5	Negativa	NP	85.85	Positivo
6	Negativa	<i>Proteus</i>	86.40	Positivo
7	Negativa	<i>Cedecea, Citrobacter</i>	86.33	Positivo
8	Negativa	NP	86.00	Positivo
9	Negativa	<i>Proteus</i>	NP	Negativo
10	Negativa	<i>Proteus</i>	86.23	Positivo
11	Negativa	<i>Proteus</i>	85.89	Positivo
12	Negativa	<i>Proteus</i>	85.77	Positivo
13	Negativa	<i>Proteus</i>	NP	Negativo
14	Negativa	<i>Citrobacter</i>	NP	Negativo
15	Negativa	<i>Proteus, Citrobacter</i>	NP	Negativo
16	Negativa	NP	75.68	Negativo
17	Negativa	NP	76.74	Negativo
18	Negativa	<i>Ewingella, Proteus</i>	75.14	Negativo
19	Negativa	<i>Proteus</i>	85.98	Positivo
20	Negativa	<i>Enterobacter, Erwinia, Shigella</i>	76.86	Negativo
21	Negativa	<i>Pseudomonas</i>	76.52	Negativo
22	Negativa	<i>Proteus, Citrobacter</i>	75.16	Negativo
23	Negativa	NP	85.51	Positivo
24	Positiva	<i>Salmonella spp.</i>	85.59	Positivo
25	Positiva	<i>Salmonella spp.</i>	86.45	Positivo
26	Negativa	<i>Citrobacter</i>	76.39	Negativo
27	Positiva	<i>Salmonella spp.</i>	76.54	Negativo
28	Negativa	<i>Pseudomonas</i>	85.81	Positivo
29	Negativa	<i>Erwinia</i>	76.01	Negativo
30	Negativa	<i>Proteus</i>	77.12	Negativo
31	Negativa	NP	76.79	Negativo
32	Negativa	NP	NP	Negativo
33	Negativa	<i>Erwinia</i>	76.99	Negativo
34	Negativa	<i>Proteus, Pseudomonas</i>	85.33	Positivo

35	Negativa	<i>Proteus, Pseudomonas</i>	77.02	Negativo
36	Positiva	<i>Salmonella paratyphi</i>	77.27	Negativo
37	Negativa	<i>Proteus</i>	85.97	Positivo
38	Negativa	NP	85.79	Positivo
39	Positiva	<i>Salmonella spp.</i>	77.47	Negativo
40	Negativa	<i>Citrobacter, Ewingella</i>	NP	Negativo
Citrobacter sp (control negativo)			76.18	Negativo
S. Enteritidis (Control Positivo)			86.67	Positivo

NP: No presentó colonias sospechosas de *Salmonella*

Al analizar la tabla 8, podemos notar que de las 17 muestras que dieron amplificación positiva por PCR en tiempo real, 15 fueron negativas por el protocolo ISO6579, ya que no se detectó *Salmonella* y aunque había colonias sospechosas, la mayoría fueron identificadas como *Proteus* y otras como *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Cedecea*. Esto ratifica la baja especificidad de los medios, ya que recupera alta cantidad de flora acompañante, lo cual disminuye la posibilidad de aislar *Salmonella*, aunque este presente en la muestra y por lo tanto se generan falsos resultados. Adicionalmente, hay 3 muestras que fueron positivas por el método convencional de microbiología y que fueron negativas en la amplificación por PCR en tiempo real. Esto puede darse por la alta especificidad de los primers utilizados en la reacción, los cuales fueron diseñados únicamente para detectar la presencia del serotipo S. Enteritidis, haciendo que otros serotipos de *Salmonella* presentes en la muestra no sean detectados, es decir que no se amplifican otras salmonellas como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* pero si se recuperan en los medios de cultivo. Sin embargo, podemos encontrar resultados cruzados, como las cepas identificadas como enteritidis, que es posible no fueron detectadas en la PCR, tal vez por su bajo número presente en la muestra. Esto haría útil la técnica para detectar *Enteritidis* en muestras de pollo, pero no para dar un resultado definitivo de la presencia de

Salmonella spp., que es lo exigido por las normas nacionales e internacionales para cárnicos crudos **USDA (2002)**, sino como una herramienta previa de verificación de calidad en el proceso. Solo dos muestras coinciden en el resultado de presencia de *Salmonella* por los dos métodos, indicando que estas tenían *Salmonella* Enteritidis, pero no asegura que por PCR en tiempo real se este reportando un resultado total del genero, ya que se excluyen otros serotipos, y por el contrario, no se asegura que las muestras negativas por el método tradicional no tengan *Salmonella*, ya que comúnmente se pierden colonias posibles *Salmonella*, por la recuperación de otras bacterias.

Basados en estos resultados podemos notar las diferencias en los resultados obtenidos por los métodos evaluados, siendo PCR en tiempo real una técnica mucho mas sensible para la detección del serotipo S. Enteritidis, pero no para el total de *Salmonella* presente en el alimentos. Aunque los resultados son confiables, se hace necesario estandarizar un ensayo que genere resultados que cumplan con lo exigido por el ministerio de Protección Social en cuanto a ausencia de *Salmonella* en cárnicos, ya que en nuestro país aun no se busquen específicamente los serotipos, a pesar de ser sólo patógenos *S. Enteritidis* (de interés en el sector avícola), *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, de modo que puedan asegurar la inocuidad de los productos alimenticios, evitando distribuir cepas de microorganismos patógenos y por lo tanto la posibilidad de generar brotes de infección, con el fin de cuidar la Salud pública de nuestra población.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvieron las proporciones de positivos en cada uno de los métodos, las cuales correspondieron a $5/40 = 0.12500$ para el protocolo tradicional y a $17/40 = 0.42500$ para PCR en tiempo real. A estos datos se les realiza la prueba de proporciones y con un $Z = -3.00$ y $P = 0.0027$, se rechaza la hipótesis nula, lo cual nos indica que hay una altísima diferencia entre los resultados obtenidos por los dos métodos en comparación. Esto comprueba los análisis anteriormente descritos en los que se notan las diferencias y la mayor sensibilidad de PCR para detectar muestras positivas para *S. Enteritidis*.

7. CONCLUSIONES

1. El Tm mas adecuado para la amplificación tanto de la cepa pura como de las mezclas inoculadas en pollo crudo, se obtiene con una concentración 3.5 mM de MgCl₂.
2. Los primers sefA reportados para la identificación del serotipo S.Enteritidis son altamente específicos ya que no presentan amplificación cruzada ni con otras especies de *Salmonella* ni con bacterias de otros géneros.
3. PCR en tiempo real es una técnica sensible y específica para la rápida identificación del serotipo S.Enteritidis a partir de cepas puras o de muestras de pollo crudo.
4. El protocolo tradicional de microbiología ISO6579/1993 para la detección de *Salmonella* es un método largo, poco sensible e inespecífico para la detección del patógeno en muestras de alimentos, aumentando la probabilidad de generar falsos resultados. Por lo tanto, no es posible sugerir una combinación adecuada de enriquecimientos y medios de cultivo para el aislamiento de *Salmonella*; esto depende de la carga microbiana de cada muestra y de la estandarización que realice cada laboratorio de análisis.
5. El control para la erradicación de este patógeno, no debe limitarse solo a los alimentos de consumo humano, sino también vigilar el patógeno en otras fuentes como aguas ambientales y animales domésticos los cuales son vehículos importantes de transmisión en los que se aislado S.Enteritidis.

8. RECOMENDACIONES

1. Al trabajar el protocolo tradicional de microbiología para la detección de *Salmonella*, se recomienda utilizar dos enriquecimientos diferentes, por lo menos tres medios de cultivo y confirmar el mayor número de colonias sospechosas, de modo que no se corra el riesgo de perder colonias y reportar falsos resultados. Adicionalmente, es necesario revisar y proponer cambios en los protocolos tradicionales para eliminar la recuperación de interferentes como *Proteus*, el cual es continuamente reportado como falso positivo en los análisis de *Salmonella*.
2. Se propone realizar más estudios que permitan generar un método que combine la técnica de microbiología tradicional con técnicas de biología molecular, de modo que se puedan detectar todos los serotipos presentes en nuestro medio sin perder datos ni generar falsos resultados.
3. Aunque el serotipo Enteritidis es el más común en nuestro país y el de mayor interés para la industria avícola, es necesario controlar la presencia tanto de este serotipo como de otras especies patógenas como *S.typhi*, implementando sistemas de calidad y técnicas microbiológicas rápidas en las industrias productoras de alimentos.
4. Estudios adicionales con un mayor número de interferentes y controles negativos podrían dar un panorama más exacto de la especificidad de los primers utilizados y los artefactos generados en la reacción de amplificación, de modo que se halle una respuesta al bajo número de

coincidencias obtenidos en los resultados por los dos métodos evaluados.

5. Esta investigación podría complementarse realizando un estudio de validación oficial siguiendo los protocolos sugeridos por entidades internacionales como la AOAC, para comprobar la eficiencia de la PCR en tiempo real en estudios colaborativos y así, poder sugerirla como un método alternativo al oficial en la búsqueda de *Salmonella* en muestras de alimentos.
6. Realizar un análisis de costos del protocolo tradicional vs PCR en tiempo real, teniendo en cuenta todas las variables del análisis y el tiempo de cuarentena en cadenas de frío que deben guardar los lotes de pollo crudo antes de ser distribuidos al mercado, esperando los resultados microbiológicos, podría ser un gran aporte a la industria avícola para implementar la técnica de PCR en tiempo real como una alternativa más rápida para la detección de patógenos en sus productos.
7. La técnica de PCR en tiempo real puede ser utilizada para hacer estudios de prevalencia de diferentes serotipos de *Salmonella*, de modo que se obtengan datos más exactos que puedan ser utilizados en proyectos de Análisis de riesgos de este patógeno en nuestro país.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrocadenas (2003) Colombia. (2003). Exploración de mercados – Carne de pollo. Consultado el 2 de octubre de 2004 en http://www.Agrocadenas.gov.co/inteligencia/int_exploracion.htm
- Ambion (2004). Real –Time PCR goes Prime Time. Consultado en <http://www.ambion.com/techlib/tr/81/813.html>
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. Struhl, K. (2002). Short Protocols in Molecular Biology – A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Vol 2. Fifth edition. Wiley Ed. Canadá.
- Bennett, A.R., Greenwood, D., Tennant, C., Banks, J.G. and Betts R.P. (1998). Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. Lett. Appl. Microbiol. 26. P: 437-441.
- CDC (2004) Outbreak of Salmonella Serotype Enteritidis Infections Associated with Raw Almonds --- United States and Canada, 2003—2004. MMWR weekly. June 11, 2004 / 53(22);484-487. Consultado el 10 de septiembre de 2004 en <http://www.cdc.gov/mmwr>.
- Collighan, R., Woodward, M.J. (2001). The SEF 14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* encoded within a pathogenicity islet. Vet. Microbiol. 80 (3). P: 235-245
- Daum L., Barnes W., McAvin, J., Neider, M., Cooper, L., Huff, W., Gaul, L., Riggins, W., Morris, S., Salmen., Lohman, K. (2002). Real – Time PCR Detection of *Salmonella* in suspect Foods from a Gastroenteritis Outbreak in Kerr County, Texas. J. Clinical. Microbiol. 40 (8). P: 3050-3052
- D'aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne Salmonella. Int. J. Food Microbiol. Vol 12 P: 14-70.
- De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Pasquale, D., Filetici, E., Toti, L. (2003). Evaluation of DNA extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I real-Time PCT to detect *Salmonella enterica* Serotype *Enteritidis* in Poultry. Appl. Env. Microbiol., June, 69. (6) P: 3456 – 3461
- Dorak T. (2004) Real Time-PCR. Consultado el 12 de octubre de 2004 en <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
- Edwards B. (1999). *Salmonella* and *Shigella* species” Food-Borne Diseases. Clinicsin Laboratory Medicine. 19: 3. p: 469-477

- Fach, P., F. Dilasser, J. Grout, and J. Tache. (2001). Evaluation of a polymerase chain - Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. (Revision of 2nd ed., ISO) International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1991.
- FENAVI. Federación Nacional de Avicultores. (1999) Departamento de Estudios Económicos. Estimativos de Producción. Santafé de Bogotá.
- Fernandez E. (2000). Microbiología e inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Queretano-México. Pag: 518 - 536
- Ferretti, R., Mannazzu, R., Cocolin, L., Comi, G., Clementi, F. (2001). Twelve-Hour PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food. Appl. Envir. Microb. 67 (2). P: 977-978.
- García F., Frías N., Frutos C., Martín B., López C. (2001) Análisis de los serotipos de *Salmonella* aislados en el año 2000 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. Boletín epidemiológico semanal de España. Vol. 9 nº 27/281-292
- Hill, W.E. (1996). The Polymerase Chain Reaction: Applications for the Detection of foodborne pathogens' Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 36. Pags: 123-173
- Hoorfar, J., Ahrens, P., Radstrom, P. (2000). Automated 5' Nucleasa PCR Assay for identification of *Salmonella* enterica. J. Clin. Microb. 38 (9). P: 3429 – 3435
- ICMSF. (1996). Microorganismos de los Alimentos Características de los Patógenos Microbianos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pag: 255-305
- IFT (2002). Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implications for Control in the 21st Century. Consultado el 20 de enero de 2005 en www.ift.org/cms7?pid=1000379
- Jothikumar, N, Wang, X., Griffiths W. (2003). Real Time Multiplex SYBR Green I-Based PCR Assay for Simultaneous Detection of *Salmonella* Serovars and *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 66, 11. P: 2141-2145.
- Kimura AC, Reddy V, Marcus R, Ciedak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, Segler SD, Hardnett FP, Barrett T, Swerdlow DL (2004) Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella* enterica serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in

- FoodNet sites Clin Infect Dis. Apr 15;38 Suppl 3:S244-52. Consultado el 10 de septiembre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
- Knutsson, R., Lofstrom, C., Grage, H., Hoorfar, J., Radstrom, P.(2002).Modeling of 5' Nuclease Real-Time Responses for Optimization of a High-Throughput Enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. J.Clin.Microb.40 (1). P:52-60
 - Marcus, S., Brumell, J., Pfeifer, C., Finlay, B. (2000). Salmonella pathogenicity islands big virulence in small packages' Microbes and Infection. 2. p: 145-146. Consultado el 5 de noviembre de 2004 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
 - Marcus R, Rabatsky-Ehr T, Mohle-Boetani JC, Farley M, Medus C, Shiferaw B, Carter M, Zansky S, Kennedy M, Van Gilder T, Hadler JL. (2004) Dramatic decrease in the incidence of Salmonella serotype Enteritidis infections in 5 FoodNet sites: 1996-1999. Clin Infect Dis. Apr 15;38 Suppl 3:S135-41. Consultado el 10 de septiembre de 2004 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
 - McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, Beninga KK, Astorga A, McCleskey FK, Huff WB, Niemeyer D, Lohman KL. (2001). Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR. J Clin Microbiol. Oct; 39(10): 3446-3451.
 - Ministerio De Salud, Instituto Nacional De Salud. (1998). Informe Quinquenal Epidemiológico Nacional. 3:118-119.
 - OMS. (1997) Antigenic Formulas of the Salmonella serovars Institute Pasteur. France. Pag: 1-15
 - Pangloli, P., Dje, Y., Oliver, S.P., Mathew, A., Golden, D.A., Taylor, W.J., Draughom, F.A. (2003). Evaluation of Methods for Recovery of *Salmonella* from dairy Cattle, Poultry and Swine Farms. J.Food Prot. 66, 11. Pags: 1987 – 1995.
 - Ponchel, F., Toomes C., Bransfield, K., Leong, F., Douglas, S., Field, S., Bell, S., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A., Robinson, P., Inglehearn, C., Isaacs, J., Markham, A. (2003). Real-Time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions." BMC Biotechnology. 3, 18. P: 1-13

- Rajashekara, G., Munir, S., Alexeyev, M., Halvorson, D., Weels, C., Nagaraja, K. (2000). Pathogenic Role of SEF14, SEF17 and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Infection of Chickens. *Appl. Envir. Micr.* Apr. 66, (4). P: 1759-1763
- Reischl U, Youssef MT, Kilwinski J, Lehn N, Zhang WL, Karch H, Strockbine NA. (2002). Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* Jul; 40(7): 2555-2565.
- Restrepo A., Robledo, J., Leiderman, E., Restrepo, M., Botero, D., Bedoya, V.I. (2003). Enfermedades infecciosas- Fundamentos de Medicina. 6° Ed. CIB-Editores. Colombia. P: 450 – 458.
- Sails, A.D., Fox, A.J., Wareing, D.R. Greenway, D.L. (2003). A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods after Enrichment Culture. *Appl Environ Microbiol.* Mar, 69(3): 1383-1390.
- Sanchez M., Cardona N. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infecta-Asociación Colombiana de Infectología.* 7: 1 P: 22-28
- Santos R., Tsoils R., Baumler A., Adams L. (2003). Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 36: 3-12
- Secretaría Distrital De Salud. (1999) Análisis positivos para *Salmonella* en alimentos - Enero a septiembre de 1999. Oficina de Vigilancia Epidemiológica. Laboratorio de Salud Pública. Santafé de Bogotá.
- SIVIGILA. (2002). Vigilancia en red de *Salmonella* spp, *Shigella* sp. y *Vibrio cholerae*, Colombia 2000-2001. Boletín epidemiológico Semanal – INAS. Mayo 26 a 1 de Junio 2002. Consultado en noviembre de 2003 en www.ins.gov.co/epidemiologia/
- Suarez M., Mantilla J. (2000). Presencia de *Salmonella* Serovariedad *Enteritidis* en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *Revista Iatreia.* Vol 13 No. 4. Universidad Nacional. Bogotá – Colombia
- Surveillance center. (1997) *Salmonella* Enteritidis and *S. typhimurium* in Western Europe for 1993-1995: a surveillance report from Salm-Net. *European Communicable disease bulletin.* January. Vol 2 No.1. Consultado el 14 de septiembre de 2004 en <http://www.b3e.jussieu.fr/ceses/eurosurv>.

- USDA. (2002). Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry and Egg products. Microbiology Laboratory Guidebook – USA. Consultado en http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_03.pdf el 8 de noviembre de 2004.
- Uxera, M., Aladueña A., Diaz, R., De la Fuente M., Cerdán P., Gutierrez R., Echeita A. (2001) Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2000. Boletín epidemiológico semanal de España. Vol. 9 nº 27/281-292
- Vandevenne C., Ribes M. (2002). Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos Diaz de Santos Ed. España.P: 123-129.
- Velilla A., Terzolo H, Feingold S. (2004). Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella*: PCR aplicada a la avicultura y a la microbiología de los alimentos Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Argentina
- Wang, R-F, Cao,W-W, Cemiglia,C.E. (1997). A universal protocol for PCR detection of species of foodborne pathogens in foods. J. Appl. Microb. 83. p: 727-736.
- Wang, S-J., Yeh, D-B. (2002). Designing of polymerase chain reaction primers for detection of *Salmonella Enteritidis* in foods and fecal samples Letters appl. Microb. 34 P. 422-427
- Yuno MM, Terzolo HR, Fernandez HD, Malena RC, Altuna ME (1995) Evaluation of selective culture media for the isolation of *Salmonella* from poultry. Rev Argent Microbiol. 1995 Apr-Jun;27(2):57-69. Consultado el 14 de Septiembre de 2004 en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

ANEXOS

1. MEDIOS DE CULTIVO

▪ BHI - Caldo Infusión Cerebro Corazón

Formula	gm/litro
Sólidos de infusión de cerebro del becerro	12.5
Sólidos de infusión de carne de corazón de vaca	5.0
Peptona proteasa	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de Sodio	5.0
Fosfato Disodio	2.5
pH 7.4 ±0.2	

▪ Hektoen Agar Enterico

Formula	gm/litre
Extracto de carne	5.0
Peptona	5.0
Lactosa	10.0
Sales Biliares	8.5
Citrato de Sodio	10.0
Tiosulfato de Sodio	8.5
Citrato Ferrico	1.0
Verde Brillante	0.00033
Rojo Neutro	0.025
Agar	15.0
pH 7.0 ±0.2	
NO SOBRECALENTAR - NO AUTOCLAVAR	

▪ Kiger Hierro Agar

Formula	gm/litro
Extracto de Carne	3.0
Extracto de Levadura	3.0
Peptona	20.0
Cloruro de Sodio	5.0
Lactosa	10.0
Glucosa	1.0
Citrato Ferrico	0.3
Tiosulfato de Sodio	0.3
Rojo de Fenol	0.05
Agar	12.0
pH 7.4 ±0.2	

▪ Nutritivo Agar - AN

Formula	gm/litro
Extracto de Carne	1.0
Extracto de Levadura	2.0
Peptona	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	15.0
pH 7.4 ±0.2	

- **Peptona tamponada Agua al 0.1%**

Formula	Gm/litro
Peptona	1.0

El pH final debe ser de 7.0 +/- 0.2

- **Rappaport-Vassiliadis (RV) Caldo Enriquecimiento**

Formula	gm/litre
Peptona de Soya	5.0
Cloruro de Sodio	8.0
Fosfato de Potasio Dihidrogenado	1.6
Cloruro de Magnesio 6H ₂ O	40.0
Verde de Malaquita	0.04
pH 5.2 ±0.2	

- **Salmonella Shigella Agar (SS Agar)**

Formula	gm/litro
Extracto de Carne	5.0
Peptona	5.0
Lactosa	10.0
Sales Biliares	8.5
Citrato de Sodio	10.0
Tiosulfato de Sodio	8.5
Citrato Ferrico	1.0
Verde Brillante	0.00033
Rojo neutro	0.025
Agar	15.0
pH 7.0 ±0.2	
NO SOBRECALENTAR - NO AUTOCLAVAR	

- **Tetracionato Caldo**

Formula	gm/litro
Peptona Caseína	2.5
Peptona de Carne	2.5
Sales Biliares	1.0
Carbonato de Calcio	10.0
Tiosulfato de Sodio	30.0

- **Urea Caldo**

Formula	gm/litro
Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de Sodio	5.0
Fosfato Disodio	1.2
Fosfato de Sodio Dihidrogenado	0.8
Rojo de Fenol	0.004
pH 6.8 ±0.2	
NO AUTOCLAVAR	

▪ **XLT4 Agar Base**

Formula	Gm/litro
Extracto de Levadura	3.0
Peptona Proteasa	6
L-Lisina HCl	5.0
Xilosa	3.75
Lactosa	7.5
Sucrosa	7.5
Cloruro de Sodio	5.0
Tiosulfato de Sodio	6.8
Citrato de amonio Ferriico (III)	0.8
Rojo de Fenol	0.08
Agar	18
pH 7.4 ±0.2	

NO SOBRECALENTAR - NO AUTOCLAVAR . Adicionar suplemento, según indicaciones del productor.

2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL KIT DNA2000-CORPOGEN

Para la extracción del ADN genómico, las bacterias son lisadas a 80°C en presencia de un detergente iónico. Enseguida se remueven las proteínas contaminantes por medio de una alta concentración salina y finalmente se recupera el DNA por precipitación con isopropanol. En un lapso de aproximadamente 3 horas se obtiene ADN genómico de alta calidad a partir de 1 ml de cultivo bacteriano, con la ventaja de no utilizar solventes orgánicos tóxicos.