

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
CLÍNICO**

**Comparación del coprocultivo vs la Técnica de Reacción en
Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para la detección
de *Salmonella* Typhi en muestras fecales.**

**Daniela Alexandra Espinoza Proaño
Estefanía Edith Iza Segovia**

QUITO-ECUADOR

Año 2013.

DEDICATORIA

A toda mi familia por estar siempre a mí lado.

A mi madre Alexandra por ser mi guía, soporte, compañía y todo en mi vida.

A mi hermana Iveth por crecer junto a mí. A mi padre Oscar y hermanos Daniel y Miguel Ángel.

A mi esposo Diego por ser mi alegría y darme su apoyo. Te amo.

A mis hijos Camila, Nicolás y Diego porque son el motor que me impulsa día a día. Les adoro.

Y a mis suegros Román y Beatriz por ser como mis segundos padres.

Daniela

A mis padres Raúl y Elizabeth por estar siempre a mi lado, ser mi apoyo, mi guía y llenarme de su amor.

A mis hermanas Soledad y Carlina por darme fuerzan en todo momento.

A mi sobrino Cesar Raúl por estar siempre a mi lado.

A Julio Cesar por estar siempre a mi lado apoyándome y no permitir que me dé por vencida. Te amo.

A mi hija Juliana que desde el momento en que supe que comenzaba a crecer en mí se convirtió en mi principal motor y en mi mayor fortaleza. Te amo pequeña.

A todos quienes me apoyaron día a día muchas gracias.

Estefanía

AGRADECIMIENTO

Agradecemos primeramente a Dios porque nos llenó de fortaleza y sabiduría.

Un agradecimiento especial al **Dr. Santiago Escalante** por habernos permitido desarrollar nuestra tesis y por darnos la oportunidad de trabajar con él.

A la **Msc. Sandra Andrade** y a la **Lic. Lucía Ulloa** por permitirnos realizar nuestra investigación dentro de las instalaciones de la PUCE.

A todas las personas que de una u otra manera aportaron con un grano de arena en nuestro andar dentro de este proceso educativo.

A los maestros y educadores que día a día nos compartieron sus conocimientos, mismos que han servido desde el primer momento que iniciamos nuestra vida como profesionales.

Estefanía y Daniela

RESUMEN

Existen métodos tradicionales para identificar *Salmonella Typhi* que consisten en el empleo de medio de cultivo los cuales permiten la recuperación de dicho microorganismo, para luego realizar el aislamiento en medios selectivos, la identificación bioquímica y caracterización serológica, por lo que estos métodos pueden llegar a ser muy dispendiosos y de esta manera consumen mucho tiempo.

Esta tesis busca comparar resultados obtenidos en el coprocultivo vs los resultados obtenidos en la PCR y la relación de sensibilidad y especificidad que presenta cada técnica para así poder dar a conocer cuál sería la más apropiada para poder llegar a un diagnóstico en un corto tiempo.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial E.Z.N.A. Stool de la casa comercial OMEGA.

Se realizó una PCR multiplex para la identificación de género mediante la amplificación de los siguientes genes: Grupo D (antígeno somático), fliC-d (antígeno flagelar) y wcdB (antígeno capsular) los cuales son propios de *Salmonella Typhi*.

Para desarrollar este estudio se analizó un total de 144 muestras fecales, que fueron inoculadas artificialmente con cepas de S.Typhi conocidas y posteriormente fueron analizadas simultáneamente mediante técnicas de cultivo tradicionales y de biología molecular (PCR) para comparar datos y analizar la sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos.

Del total de muestras se divide en tres grupos de 48, cada grupo es contaminado con concentraciones conocidas de S.Typhi de 300, 150 y 50 UFC lo cual permitirá seleccionar el inóculo más adecuado para el trabajo posterior.

Con el estándar que se obtenga una mejor sensibilidad se procede a contaminar un total de 50 muestras, 25 de *Salmonella Typhi* y 25 de *Escherichia Coli* para el análisis de sensibilidad y especificidad.

ABSTRACT

Traditional methods to identify Salmonella Typhi consisting of the use of culture medium which permit the recovery of said microorganism , and then make the isolation on selective media , biochemical and serological characterization, so these methods can become very wasteful and thus time consuming.

This thesis seeks to compare results obtained in the stool vs. the results of the PCR and the relative sensitivity and specificity of each technique presented in order to make known what would be most appropriate to reach a diagnosis in a short time .

For DNA extraction the commercial kit was used EZNA Stool of OMEGA trading house .

Group D (somatic antigen) fliC -d (flagellar antigen) and wcdB (capsular antigen) which are unique to Salmonella Typhi : A multiplex PCR for gender identification by amplification of the following genes was performed .

To develop this study a total of 144 fecal samples were artificially inoculated with known strains of S. Typhi and then analyzed simultaneously using traditional cultivation techniques and molecular biology (PCR) to compare data and analyze the sensitivity and specificity was analyzed of each of the methods .

Of the total samples were divided into three groups of 48, each group is contaminated with known concentrations S.Typhi 300 , 150 and UFC 50 which will select the most suitable inoculum for further work .

With standard that better sensitivity is obtained proceeds to contaminate a total of 50 samples , 25 of Salmonella typhi and Escherichia coli 25 for the analysis of sensitivity and specificity.

TABLA DE CONTENIDOS

1.1.	Introducción.....	1
1.2	Justificación	2
1.3	Planteamiento del problema.....	4
1.4	Objetivos	5
1.4.1	Objetivo general	5
1.4.2	Objetivos específicos.....	5
1.5	Marco referencial.....	6
2.1	Generalidades	9
2.2	Patogenia	13
2.3	Epidemiología	14
2.4	Métodos de diagnóstico por laboratorio.....	16
2.4.1	Coprocultivo	16
2.4.1.1	Métodos para el aislamiento de Salmonella	16
2.4.1.1.1	Preenriquecimiento en medio no selectivo	16
2.4.1.1.2.	Medio de enriquecimiento selectivo	17
2.4.1.1.3.	Medio de cultivo selectivo y diferencial.....	18
2.4.1.1.4.	Medios de cultivo selectivo principales.....	18
2.4.1.1.5.	Medios de cultivo diferenciales	19
2.4.1.4.	Desventajas del coprocultivo	24
2.4.2.2.1.	Denaturación.....	26
2.4.2.2.2.	Hibridación	26
2.4.2.2.3.	Elongación	27
2.4.2.4.	Ventajas de la PCR:	29
2.4.2.5.	Desventajas de la PCR.....	29
2.4.2.5.1.	Métodos de extracción de ADN.....	30
CAPÍTULO 3: MARCO METODOLOGICO		31

3.2	Trabajo de Laboratorio	31
3.3	Muestra.....	31
3.4	Diseño experimental.....	31
3.4.1	Población	31
3.4.2	Cálculo del tamaño de la muestra.....	31
3.4.3	Materiales	32
3.4.3.1	Equipos	32
3.4.3.2	Reactivos	33
3.4.4	Preparación Estándar	33
3.4.6.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
3.4.7.	Metodología:.....	40
3.4.7.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex para la determinación de genes Group D (Antígeno somático), fliC-d (Antígeno flagelar) y wcdB (antígeno capsular) de Salmonella Typhi.....	40
3.4.7.3.	Electroforesis en geles de agarosa	42
3.4.8.	Pruebas de Especificidad	43
3.4.9.	Análisis de datos.....	44
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....		45
4.1	Sensibilidad obtenida por cada estándar	45
4.1.1	300 UFC	45
4.1.2	150 UFC	46
4.1.3.	50 UFC	46
4.2.	Comparación de los métodos con los tres estándares:	47
4.2.	Límite de detección de la UFC.....	48
4.3.	Pruebas de sensibilidad y especificidad del estándar de 300 UFC.	49
CAPITULO 6: CONCLUSIONES.....		55
CAPITULO 7: RECOMENDACIONES.....		56
CAPITULO 8: ANEXOS		57
	Anexo 1.- Inserto técnica E.Z.N.A Stool para extracción de ADN en muestras fecales.	57
	Anexo 2.- Inserto para la preparación de Caldo de enriquecimiento tetratonato.....	61
	Anexo 3.- Inserto para la preparación del Agar Entérico Hektoen	62

Anexo 4.- Metodología del estudio:	63
Anexo 5.- Resultados del coprocultivo:	66
Anexo 6.- Resultados coprocultivo para cálculo sensibilidad.....	68
Fotografía 10- Cajas bi Petri sembradas con un control negativo (E. coli) y la bacteria en estudio (<i>Salmonella Typhi</i>)	68
Anexo 8: Resultados PCR para límites de detección:	69
Anexo 9: Resultados PCR con control negativo (E. coli) y colonia de <i>Salmonella Typhi</i> .	70

CAPITULO 9 BIBLIOGRAFIA:..... 71

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de <i>Salmonella</i>	9
Figura 2: Clasificación de <i>Salmonella</i>	10
Figura: 3 Anuario de vigencia epidemiológica 1994-2012.....	15
Figura 4.- Enfermedades transmitidas por aguas y alimentos	16
Figura 5: Caldo selenito	17
Figura 6: caldo Tetrionato.....	18
Figura 7: Agar EMB	19
Figura 9: Agar Hektoen, <i>Salmonella</i> positivo	20
Fuente 9 : foto personal	20
Figura 10: Agar SS, <i>Salmonella</i> positiva	21
Figura 12: Denaturación PCR	26
Figura 13: Hibridación PCR.....	27
Figura 14: Elongación de PCR.....	27
Figura 15: Procedimiento realizado.....	38
Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa.....	43
Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa para límite de detección.....	48

CONTENIDO DE TABLA

Tabla 1: Estandares preparados.....	34
Tabla 2: Estandares seleccionados	34
Tabla 3: Preparación de la Master Mix	41
Tabla 4: Secuencia y tamaño de los Primers.....	41
Tabla 5: Primers amplificados.....	42
Tabla 6: Condiciones del termociclador.....	42
Tabla 6: Resultados obtenidos con 300 UFC	45
Tabla 7: Resultados obtenidos con 150 UFC	46
Tabla 8: Resultados obtenidos con 50 UFC	46
Tabla 9: Comparación de los tres métodos con los tres estandares	47
Tabla 10: Comparación de resultados de la siembra de <i>Salmonella</i> Typhi entre el coprocultivo (agar Hektoen) y el medio enriquecido con tetracionato.....	52
Tabla 11: Comparación de resultados de la siembra de <i>Salmonella</i> Typhi entre el coprocultivo (agar Hektoen) y el PCR.....	52

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La fiebre tifoidea es una enfermedad que no ha sido eliminada de los países en vías de desarrollo. El agente causal es la bacteria conocida como *Salmonella Typhi* la cual presenta varias características, entre ellas que está compuesta por estructuras complejas, pero que presenta sensibilidad al calor. A las *salmonellas* se las puede clasificar de la siguiente manera según su accionar epidemiológico: Las que se adaptan en cualquier huésped, las que infectan solamente al humano y las que se adaptan a un huésped que está dentro de otro. (Bellver, García, 2000)

En los humanos, *Salmonella Typhi* puede producir hemorragia y perforación intestinal ya que se alojan en el intestino grueso. Sin embargo, hay salmonellas que también pueden invadir el sistema circulatorio poniendo en riesgo la vida del paciente. Es muy importante tomar en cuenta que el agente puede sobrevivir varias horas dentro del organismo.

Generalmente se transmite por la escasa aplicación de asepsia en la manipulación de alimentos. En lo que corresponde al Ecuador, las provincias de Sucumbíos, Esmeraldas, Los Ríos, El Oro y Loja demuestran mayor prevalencia. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Con respecto al coprocultivo cabe mencionar que la técnica tiene varias desventajas porque la información que brinda muchas veces limita la toma de decisiones a tiempo, no es una técnica muy sensible ni específica y puede estar influenciada por muchos factores en todo su procedimiento. El tiempo en que cual se obtienen los resultados definitivos es de 72 horas. (Conde, Revollo, & Espada, 2006).

La PCR también puede presentar problemas en la amplificación de las secuencias debido a varios factores como: diseño inapropiado de cebadores, la calidad y concentración de ADN, el tipo y cantidad de ADN polimerasa, el número de ciclos de amplificación, temperaturas de hibridación. Sin embargo, esta técnica tiene una especificidad del 98%, una sensibilidad del 100% en comparación con el “Gold Standar”, por lo cual puede ser utilizada con mayor efectividad en el diagnóstico temprano de salmonelosis. (Vásquez, 2008)

1.2 JUSTIFICACION

Las *Salmonellas* son bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos gram-negativos que causan una infección gastrointestinal conocida como salmonelosis, este tipo de infección puede ocurrir en los humanos y animales. Esta infección afecta a personas jóvenes, adultos mayores y en aquellas con problemas de salud de base, con lo cual genera graves consecuencias de salud pública y efectos negativos en lo económico y sanitario. (Bellver, García, 2000)

Las *Salmonellas* son la causa principal de cuatro manifestaciones clínicas como: la gastroenteritis, que puede presentarse desde una diarrea simple a una diarrea fulminante incluyendo náuseas y vómitos; bacteriemia o septicemia, fiebre tifoidea y paratifoidea, y la condición de portadores. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Estas patologías la originan, principalmente, tres tipos de microorganismos que son: la *Salmonella* serotipo Typhi (causante de la fiebre tifoidea), *Salmonella* Typhimurium (causante de gastroenteritis aguda) y *Salmonella* Choleraesuis. (Romero, Ramírez, 2001)

A nivel mundial se estima que cada año se produce alrededor de 16 millones de nuevos casos de fiebre tifoidea, con una cifra de 600.000 muertes, la mayor parte de los casos de fiebre tifoidea se produce en personas menores de 30 años, esto se debe al alto número de portadores encontrados en áreas endémicas lo cual hace que la situación sea más grave, presentando una incidencia de 694 portadores por cada 10.000 personas. (Organización Mundial de la Salud, 2009).

En los países desarrollados es una enfermedad rara, que cuando se presenta generalmente en inmigrantes o turistas constituye una curiosidad clínica.

La fiebre tifoidea, “es una enfermedad que se encuentra en muchos países del Lejano y Medio Oriente, en el este de Europa, en Asia, América Central y América del Sur” (Romero, et al, 2001). En el 2007 el Ecuador registró 6024 casos de enfermedad, siendo Sucumbíos, Esmeraldas, Los Ríos, El Oro y Loja las provincias más afectadas. (Rubiera, Rueda & Sánchez, 2009)

La fiebre tifoidea se presenta exclusivamente en el ser humano, y sus consecuencias pueden ser muy graves, sus síntomas se presentan en un cuadro sistémico caracterizado por fiebre y malestar general, por lo que se la debe tratar antes del periodo de incubación, para impedir su proceso infeccioso y evitar que se produzca una hipertrofia en el bazo o hígado. Esta enfermedad puede producir, también, hemorragia y perforación intestinal que en la mayoría de casos puede alcanzar una tasa de mortalidad del 10 al 15%. (Conde, 2004). Su período de incubación es de 1 a 14 días, pero normalmente suele durar de 3 a 5 días (Organización Mundial de la Salud, 2008). El agente consigue sobrevivir las primeras 24 a 72 horas en el intestino, penetrando luego en el epitelio multiplicándose y produciendo alteraciones histopatológicas. (Saravia, 2007)

El diagnóstico microbiológico es a través del coprocultivo, que se lo considera como una técnica “gold estándar”, el cual arroja los resultados a las 72 horas con pruebas de sensibilidad, sin embargo, en pacientes con tratamiento de antimicrobianos es posible que no se detecte la bacteria, pudiendo obtenerse resultados falsos negativos. Esta técnica presenta el inconveniente que tiene muchos pasos previos que alargan el tiempo del diagnóstico clínico, así como la detección de la bacteria, y esto afecta directamente en el tiempo de entrega del resultado (Villarreal, Soto, Pereira, Varela, Jaramillo, Villanueva & Mendoza, 2008), (Conde, Revollo, & Espada, 2006).

Se ha demostrado en la mayor parte de laboratorios clínicos que el coprocultivo es una muestra que por su volumen y carga de trabajo es de bajo rendimiento y bajo costo-efectividad. El tiempo estimado de duración del examen es de tres días, debido a que requiere selección de colonias que luego se someten a test bioquímicos y serológicos para su identificación. Es por esto, que a este método se lo considera de bajo rendimiento y bajo costo-efectividad, según un estudio conjunto realizado por el laboratorio de Biotecnología FUCYT-ACHS, laboratorio de Biotecnología FUCYT y el servicio de Exámenes Preventivos del Hospital del trabajador ubicados en Santiago de Chile. (Irigoyen, De Zamora, 2004).

El mismo resultado de bajo rendimiento y bajo costo-efectividad fue obtenido a través de un estudio realizado por varios avicultores colombianos, quienes determinaron que las técnicas de biología molecular han comenzado a utilizarse en los laboratorios de diagnóstico en los últimos años, y más específicamente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que ha tenido una gran implementación, tanto por la velocidad, como por el nivel de sensibilidad de la prueba.

Por estas razones, la PCR se ha comenzado a utilizar para la identificación de muchas especies microbianas en los laboratorios ya que ha demostrado ser más rápida y confiable porque incrementa la sensibilidad con respecto a la prueba tradicional, adicionalmente permite un diagnóstico oportuno y por ende un tratamiento a tiempo. (Vásquez, 2008)

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales patógenos que causan la fiebre tifoidea es la *Salmonella Typhi* la cual provoca graves problemas como: diarrea, fiebre, cólicos abdominales y es la principal causa de infecciones en humanos mediante la transmisión por alimentos contaminados, por ello es importante hacer un diagnóstico rápido de esta enfermedad para evitar consecuencias negativas en la salud humana, (Vásquez, 2008) porque al tratarse de una enfermedad altamente contagiosa puede transmitirse fácilmente; pues se ha demostrado que

la dosis infectante para contraer la enfermedad es de apenas de 10 bacterias.(Urrutia, Reyes, Melo, Henríquez, Pineda & Sakurada, 2006)

La baja sensibilidad del coprocultivo anteriormente mencionado se debe, quizá, a la baja cantidad de microorganismos; esto se puede producir por cambios inadecuados de temperatura y variación en el pH durante el transporte del espécimen, tratamientos con antibióticos, baja carga microbiana en las muestras, o por tratarse de portadores sanos etc. Por esta razón en la actualidad se está implementado cada vez en más laboratorios la técnica molecular PCR, que tiene una alta sensibilidad para la detección de microorganismos (Urrutia, et al., 2006)

Este estudio pretende contestar la siguiente pregunta: ¿El uso de la técnica molecular PCR convencional permitirá tener un diagnóstico más confiable, y más rápido ante la presencia de *Salmonella* Typhi, en relación con el coprocultivo?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Comparar los resultados obtenidos en el coprocultivo vs los obtenidos en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, y su relación de especificidad y sensibilidad que presenta cada técnica, y dar a conocer cuál sería la más apropiada para llegar a un diagnóstico en corto tiempo.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional vs el coprocultivo, para establecer las ventajas y desventajas de cada técnica de identificación.

- Determinar el límite de detección de la PCR convencional vs el coprocultivo, dependiendo de la cantidad de bacterias que cada técnica requiera para diagnóstico adecuado.

1.5 MARCO REFERENCIAL

En estudios realizados en el Ecuador, Romero y Ramírez (1996) reportaron 14887 casos de salmonelosis, esta enfermedad estuvo presente en todas las provincias del Ecuador exceptuando Galápagos, teniendo tasas de incidencia más altas en la costa, tomando en cuenta que Bolívar tuvo la tasa más alta a nivel país en 1995.

En un estudio realizado en España, Carbó, Millares, Sanz, Mañas, Guiral y Pérez, (2005), descubrieron un brote de infección alimentaria por *Salmonella* en un restaurant, por lo que se plantearon como objetivo descubrir al principal comensal que transmitió la enfermedad. Se encontraron a 75 personas enfermas con signos como diarrea, dolor abdominal, fiebre y vómito; de estos, 60 resultaron positivos en el coprocultivo y de los 33 manipuladores de los alimentos, 5 resultaron ser positivos y de ellos 4 fueron portadores sanos y uno presentó la sintomatología característica de la salmonelosis.

En muchos países como Estados Unidos, Canadá y Colombia “se ha establecido dentro de la legislación “cero tolerancia” para *Salmonella*” (Yáñez, Máttar & Durango, 2008), en el Ecuador las campañas contra esta enfermedad fueron: controlar permisos y certificados de higiene en los sitios donde venden comida, provee a gran parte de la población de servicios básicos principalmente el agua potable y mejora el manejo y tratamiento de las aguas hervidas, las cuales han tenido gran éxito bajando los índices de contagio, para ello la OMS ha implementado estrategias como: separar los alimentos crudos y cocidos, mantener los alimentos a temperaturas adecuadas, usar agua y materias primas seguras, para prevenir y controlar la transmisión de enfermedades por los alimentos. Dentro de esta campaña se incorporaron nuevas técnicas de detección y diagnóstico más rápidos y sensibles que

ayudan a lograr un diagnóstico oportuno como la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa, (PCR) (Yáñez, et al., 2008).

En estudios realizados con muestras fecales para detectar la presencia de *Salmonella* y *Shigella* en pacientes sospechosos, de La Paz-Bolivia, se ha podido determinar que el uso de la técnica PCR tiene la capacidad de demostrar alta sensibilidad y especificidad. Lo más notable dentro de este estudio fue que se encontró una adecuada técnica de extracción de ADN debido a que a nivel del material fecal se encuentra inhibidores potenciales como: el hem de la hemoglobina, las bilirrubinas, sales biliares y los carbohidratos complejos los cuales afectan la amplificación del ADN. (Conde, Revollo & Espada, 2006)

Existe, también, la posibilidad de que *Salmonella* se encuentre en portadores sanos quienes, a su vez, pueden transmitir la bacteria a otras personas a través de la manipulación de alimentos. Un ejemplo de esto se pudo observar cuando en 1994 se reportó un brote de salmonelosis en la ciudad de México en un Hospital de tercer nivel. Para esto se realizó un estudio de casos y controles, donde 129 personas presentaban los síntomas y 150 eran asintomáticas a pesar de haber ingerido los mismos alimentos, de las cuales 4 persona del grupo control presentaron un coprocultivo positivo para *Salmonella*. (Chávez-de la Peña, Higuera-Iglesia, Huertas-Jiménez, Báez-Martínez, Morales-de León, Arteaga-Cabello, Rangel-Frausto & Ponce de León-Rosales, 2001).

Asimismo, estudios realizados en Chile han demostrado que la PCR tiene la capacidad de ser más sensible (100%) y específica (98%) frente a otras pruebas como por ejemplo la prueba de oro, logrando, de esta manera, detectar la presencia de la bacteria. Esto es una gran ventaja para detectar patologías, ya que gracias a esta técnica se pueden obtener resultados oportunos para dar con el diagnóstico y posterior selección del tratamiento más adecuado. (Urrutia, et al., 2006).

Un estudio realizado en Marzo del 2012 para identificar los genes aislados más frecuentes de *Salmonella* se estudió los genes *flic d* y *wcd*, demostrando que la PCR multiplex tiene ciertas ventajas sobre la PCR convencional donde solo pueden aislarse genes aislados. Este estudio mostro una sensibilidad del 95,5 % y especificidad del 100 %.

Se analizó los genes *flic d* ya que este está muy conservado en el extremo 5'-----3', mientras que las secuencias de las regiones centrales son variables, pero se comprobó que este hallazgo es cierto solo para los genes que codifican antígenos H y que no forman parte de la estructura flagelar ya que los genes que codifican las proteínas de la parte flagelar son muy similares impidiendo la identificación de los serovares. Por otra parte, el análisis en el gen *wcd* demostró que este puede conservar otros ADN a parte del ADN de la *Salmonella* disminuyendo la precisión en la lectura de los resultados.

Un estudio realizado en Colombia en el 2008 para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella entérica* se obtuvo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 96% el cual tuvo como fin determinar la igualdad de los resultados obtenidos por la PCR en comparación con la prueba estándar de serotipificación. Para la validación de la prueba se obtuvo la sensibilidad y especificidad de cada serogrupo obteniendo los resultados: para la identificación de los serogrupos C2 y E fueron de 100%; para el serogrupo B, la sensibilidad fue de 98% y la especificidad de 99%, y para el serogrupo D, la sensibilidad fue de 98% y la especificidad de 96%. Concluyendo que los tres serogrupos diseñados para este estudio es B, D y E permiten discriminar los serogrupos con un alto nivel de especificidad y sensibilidad sin producir reacciones cruzadas. (Lavalett, 2008)

En un estudio realizado en Vitoria-Gasteiz en el 2011 para la obtención de una tesis Doctoral donde desean estandarizar el método en reacción de cadena de la polimerasa para obtener una amplia variedad de resultados un porcentaje de las muestras fueron contaminadas artificialmente con *Salmonella* donde se obtuvo un valor de sensibilidad del 62,4% y los resultados obtenidos para el límite de detección abarcaron un rango de 0,1 a 10 células /25gr de muestras. (Martínez, 2011)

En un estudio realizado en el 2008 para la detección de *Salmonella* por PCR, donde las muestras fueron inoculadas artificialmente el conteo del inóculo inicial ajustado a 0.100 D.O fue de 200 UFC/ml, realizando diluciones " 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} ", mostraron un conteo de 200 UFC/mL, 20 UFC/mL y 2 UFC/mL arrojando como resultados que la PCR es capaz de detectar células de *Salmonella* cuando es inoculada 2 UFC. (Villarreal, et al., 2008)

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae que se movilizan a través de estructuras complejas y sensibles al calor llamadas flagelos. Está formado por especies y subespecies que tienen sus propias características bioquímicas como: no fermentación de la lactosa, pero sí de la glucosa; no producen indol y tampoco degradan la urea. Estas bacterias se desarrollan entre los 8 y 45 grados centígrados, pero no sobreviven a temperaturas superiores a los 75 grados centígrados.

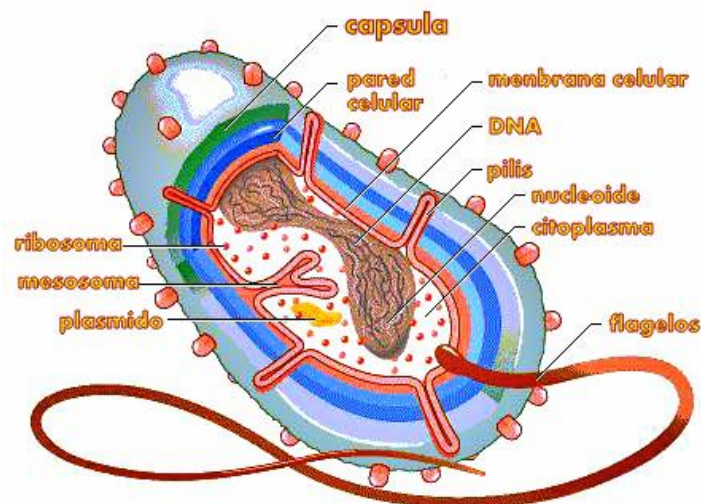


Figura 1: Morfología de *Salmonella*

Fuente: <http://richy-apuntesmedicinacoteja.blogspot.com/>

A lo largo de los años las *Salmonella* han estado sometidas a varias clasificaciones. Sin embargo, la clasificación que hoy en día se usa es:

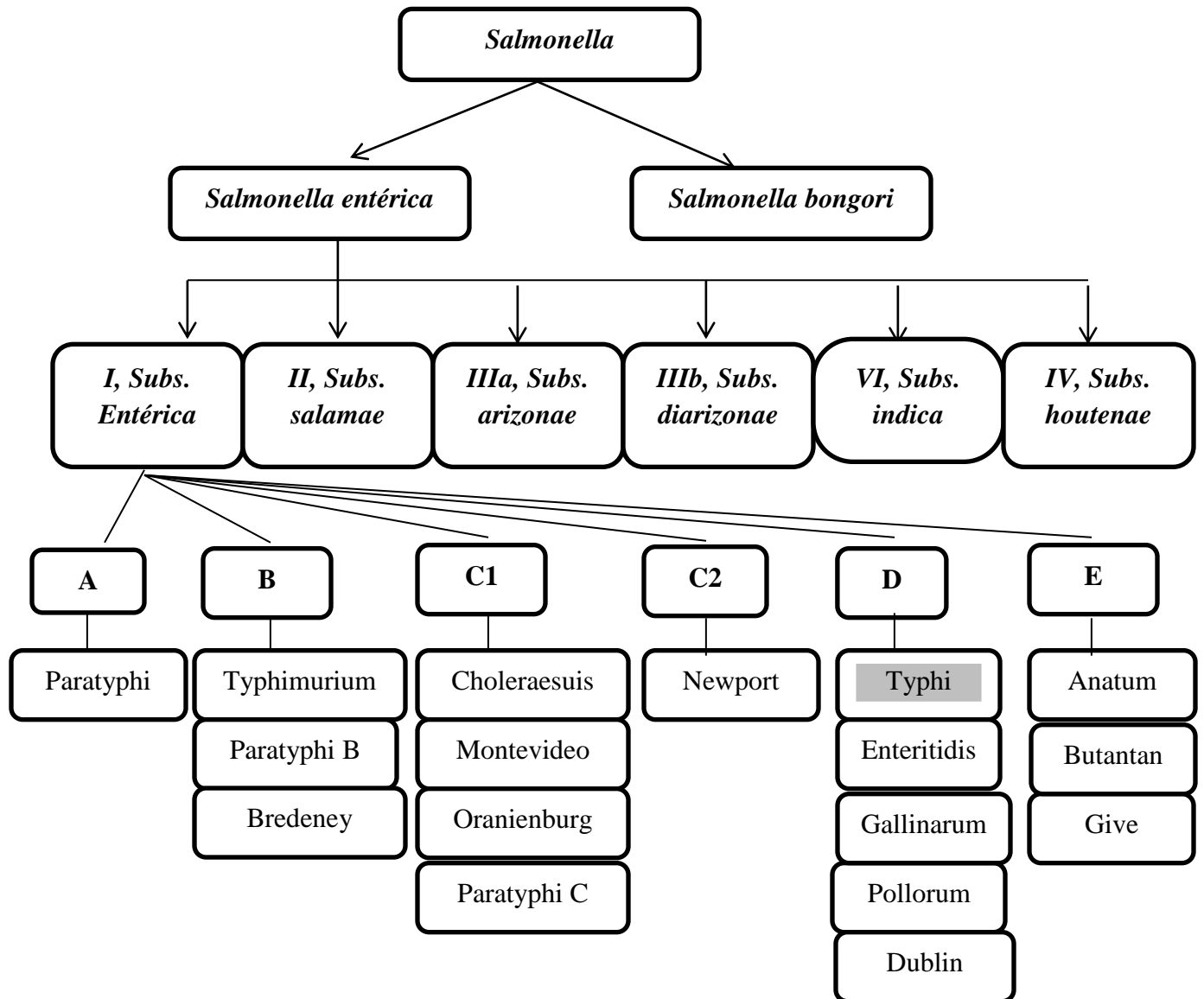


Figura 2: Clasificación de *Salmonella*

Fuente: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/flores_al/antec.pdf

Hay que aclarar que las salmonellas “se encuentran distribuidas en la naturaleza como comensales patógenos en el tracto digestivo de humanos, mamíferos domésticos y salvajes,

reptiles, aves, insectos y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales”. (Caffer, Terragno, 2001)

A las salmonellas se las puede clasificar de la siguiente manera según su accionar epidemiológico:

- Adaptación en cualquier huésped.
- Infección solamente al humano.
- Adaptación a un huésped que está dentro de otro.

Asimismo, las salmonellas son agentes aislados de agua fresca, aguas servidas, agua dulce o salada, aunque también pueden aislarse en algunos alimentos. Las características fisiológicas de estas bacterias las ayudan a ser resistentes a la deshidratación; incluso pueden presentar cambios en la expresión de sus genes dando lugar a recombinaciones más resistentes y virulentas.

En el caso específico de los seres humanos las *Salmonellas* pueden causar infecciones intestinales (salmonelosis), gastroenteritis o una infección restringida a la mucosa intestinal. Una de las características de las infecciones por *Salmonella* es que estas se pueden multiplicar y producir alteraciones histopatológicas.

Las salmonellas son las causantes de tox infecciones en los países desarrollados, así como la segunda causa de morbilidad en países en vías de desarrollo. Pese a todas las enfermedades que causan estas bacterias, la información de la diversidad y ocurrencia de los serotipos de *Salmonella* en el ambiente es todavía escasa, y esto se debe a los métodos requeridos para su identificación. (Aguilar, Escolástica, 2006).

La serotipificación no es accesible a todos los laboratorios debido a que la información de la gran variedad de serotipos de *Salmonella* es muy escasa esto se debe a los métodos para su identificación y esto explica en parte la poca información en relación a la diversidad de cepas en ecosistemas naturales; además muchas cepas provenientes de estos ecosistemas no pueden ser serotipificadas por estar en estado rugoso. (Aguilar, et al, 2006).

Para saber qué tipo de *Salmonella* está dentro de un organismo es común utilizar marcadores fenotípicos como:

- **Biotipos:** es la variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo. (Gutiérrez- Castillo, Paasch- Martínez & Calderón- Apodaca, 2008).
- **Serotipos:** Categoría en la que se clasifican los microbios o los virus según su reacción en presencia de suero que contiene anticuerpos específicos. Los diversos serotipos tienen diferentes grados de adaptación y patogenicidad para los humanos y las especies animales; por ejemplo, *Salmonella* entérica serotipo Typhi y *Salmonella* entérica serotipo Paratyphi causan enfermedades severas en humanos, conocidas como síndrome septicémico y fiebre tifoidea. (Gutiérrez- Castillo, Paasch- Martínez & Calderón- Apodaca, 2008).

Los serotipos ayudan específicamente con la identificación bioquímica, en los estudios epidemiológicos ayudan determinando la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, además es muy importante ya que permite realizar estudios cuando se presentan brotes, conocer la fuente de infección y como se trasmite.

- **Lisotipos:** Tipo de especie bacteriana que se determina por su reacción a ciertos fagos. (mediclopedia, 2008)
- **Bacteriocinotipos:** las bacteriocinas son sustancias de naturaleza química heterogénea, constituidas principalmente por un componente proteico esencial al cual se unen, según el tipo de bacteriocina, carbohidratos, lípidos, fosfatos y ADN en ciertas excepciones. (Merino, Hreňuk, Ronconi & María C., 2000).
- **Antibiotipos:** sirve para la primera aproximación al origen clonal, comparando dos aislamientos bacterianos de esta manera es posible aproximarse a la clonalidad de cepas a partir del antibiotipo usando el antibiograma habitual, para tener una clonalidad aproximada se debe considerar: la genética bacteriana, los perfiles de susceptibilidad habituales y los mecanismos moleculares de resistencia involucrados. (Labarca L., 2002)

Y marcadores genotípicos como:

- Plásmidos
- Perfiles de restricción de ADN
- Ribotipos
- Secuencias de inserción
- Perfiles de amplificación
- Amplificación específica
- Polimorfismo de longitud
- Sondas de secuencias repetitivas y no repetitivas.
- MLST
- MLVA

Mediante estos tipos de marcadores se han podido determinar muchas características y acciones de las salmonellas, sin embargo, estas tienen limitaciones que, no siempre, ayudan a su clara interpretación de perfiles

Se podría decir que una de las técnicas más convenientes era la de restricción con electroforesis en campo pulsado porque ofrece un nivel mejor de discriminación sobre otros métodos de tipaje genotípico. (Aguilar, et al, 2006).

2.2 Patogenia

Una de las características de las Salmonellas es su capacidad invasora, ubicándose principalmente en el intestino grueso en el caso de provocar gastroenteritis. Sin embargo hay algunas que pueden invadir al sistema circulatorio como es el caso de S. Dublín y S. Panamá. Otra de las enfermedades exclusiva es la tifoidea provocada por la *Salmonella Typhi*, y se caracteriza por: fiebre, dolor abdominal, evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre. Esto se produce cuando el bacilo logra pasar la barrera defensiva conocida como acidez gástrica, que ocurre cuando esta barrera natural se somete a circunstancias (aclorhifria, gastrectomía o toma de fármacos) las cuales pueden afectar su pH gástrico.

Estas pueden multiplicarse y penetrar el epitelio provocando alteraciones de carácter histopatológico.

En el caso específico de la tifoidea esta bacteria puede ingresar a los ganglios en su mayoría de los casos y continuar multiplicándose para posteriormente pasar a la circulación sanguínea y a las placas de Peyer, que son los órganos linfoides del intestino.

Cuando la infección de *Salmonella* se ha propagado a la sangre del paciente es conocida como bacteriemia o intoxicación sanguínea, lo cual produce fiebres muy altas, escalofríos y shock séptico, pudiendo a la vez producir la muerte del paciente. También puede producir meningitis la cual es una infección en la que se inflama el cerebro.

2.3 Epidemiología

La *Salmonella* es una bacteria presente en todo el mundo afectando principalmente a los países en vías de desarrollados y de manera poco frecuente en los países desarrollados. Generalmente se transmite por la escasa aplicación de asepsia en la manipulación de alimentos. Existen cerca de 2.500 serotipos hasta el día de hoy; sin embargo cada variación de estos serotipos son diferentes en cada país, y presentándose con mayor impacto negativo en los lugares donde las condiciones y calidad de vida está marcada por la pobreza e insalubridad.

Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países. (Gutiérrez-Cogco, Montiel-Vázquez, Aguilera-Pérez & Gonzales-Andrade, 2000).

En el Ecuador las enfermedades diarreicas tienen una tendencia estable, con 193.352 casos en 1996, así también constituyen una de las principales causas de morbilidad, en especial entre la población menor de 5 años es del 33.1%. En el mismo año

se registraron 14.887 casos de salmonelosis, con una tasa de 127,3 por 100.000 habitantes, casi 50% más que en 1992. La incidencia más alta se registró en las provincias de la costa variaron entre 160 y 325 por 100.000 habitantes. En América Latina y el Caribe, la incidencia de las infecciones de origen alimentario produce una tasa de mortalidad por diarrea en menores de 5 años de 0.13 ‰ en Trinidad y Tobago, 0.18 ‰ en Cuba y 9.83 ‰ en Nicaragua. En Latinoamérica se registran 1256 brotes de salmonelosis, que afectaron a 48334 personas y produjeron 15 muertes. (SIRVETA, 2002)

En el año 2009 datos publicados por el MSP dicen que las salmonelosis esta entre las diez primeras enfermedades de notificación obligatoria, ya que es una de las causas más importantes de brotes. En el Ecuador, al pasar los años los casos han ido disminuyendo paulatinamente, ya que en el 2001 hubo alrededor de 18.772 casos y en el 2008 hubo apenas 3286. (MSP/EPI 2, 2008).

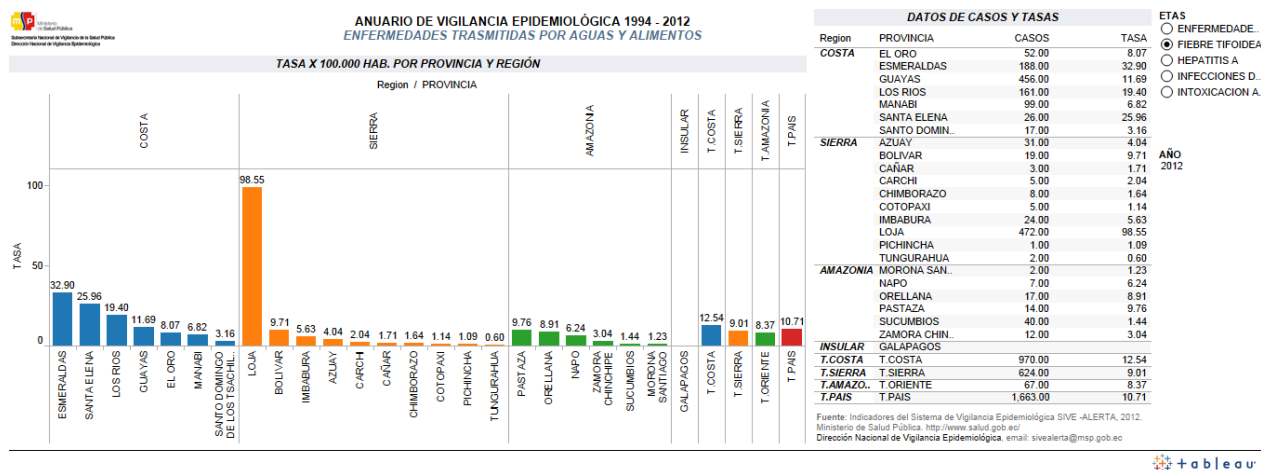


Figura: 3 Anuario de vigencia epidemiológica 1994-2012

Fuente: <http://public.tableausoftware.com/views/ETAS/CASOSPORPROVINCIA?:embed=y>

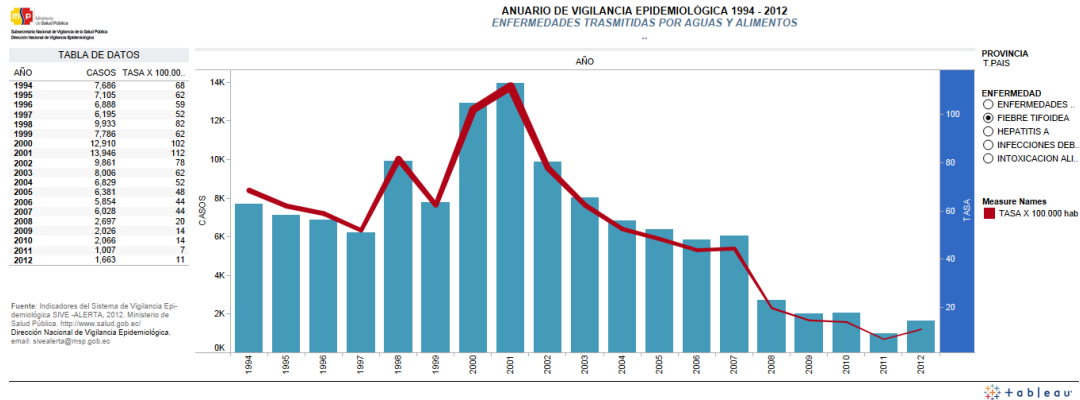


Figura4.- Enfermedades transmitidas por aguas y alimentos

Fuente: <http://public.tableausoftware.com/views/ETAS/CASOSPORPROVINCIA?:embed=y>

2.4 Métodos de diagnóstico por laboratorio:

2.4.1 Coprocultivo:

Es un examen de laboratorio que se lo realiza en heces fecales y nos sirve para la identificación de microorganismos los cuales causan infecciones gastrointestinales.

Es el método más utilizado para la detección de *Salmonella*, se caracteriza por ser una técnica clásica y no muy compleja, la cual se debe trabajar con sumo cuidado debido a que puede contaminarse fácilmente. (Parada, Inoriza & Plaja, 2007).

2.4.1.1 Métodos para el aislamiento de *Salmonella*:

2.4.1.1.1 Preenriquecimiento en medio no selectivo: que se utiliza cuando la muestra ha sufrido un proceso que puede afectar la viabilidad de los microorganismos; la finalidad de esta fase es que las células bacterianas comiencen su proceso de multiplicación normal sin exponerlas a sustancias las cuales pueden ser tóxicas. Para incrementar la recuperación de *Salmonella* se realiza en caldo peptonado bufferado o lactosado al 0,2%.

2.4.1.1.2. Medio de enriquecimiento selectivo: se lo realiza en un medio selectivo como el caldo de tetracionato que inhibe los coliformes y todos los microorganismos que se encuentra en el intestino; entre los principales medios de enriquecimiento tenemos:

2.4.1.1.2.1. Caldo selenito: donde el principal mecanismo de acción del selenito es el de inhibir el crecimiento de coliformes y enterococos, y a la vez posee componentes como la peptona la cual nutren a la bacteria.(Conde, 2004)



Figura 5: Caldo selenito

Fuente: <http://asociacionescueladeobstetricia.blogspot.com/2011/02/material-de-ayuda-para-segundo-ano.html>

2.4.1.1.2.2. Caldo tetracionato: Las sales biliares que contiene este caldo inhiben los microorganismos del intestino, sin afectar a bacterias reductoras de tetracionato como son *Salmonella* y *Proteus*. (Conde, 2004).

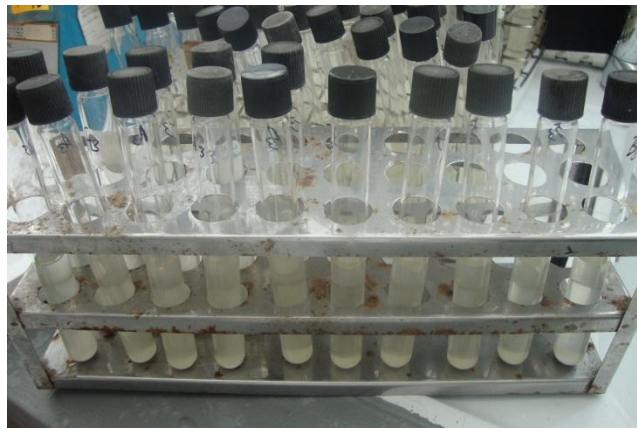
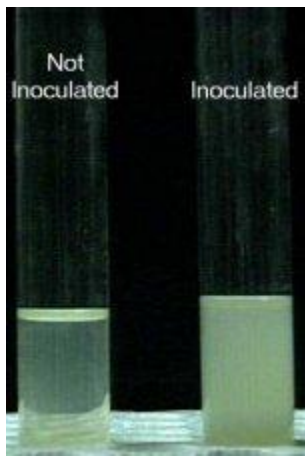


Figura 6: caldo Tetrathionato

Fuente: http://prokariotae.tripod.com/caldo_tetrathionato.htm

Fuente: Foto personal

Es importante recalcar que las propiedades que poseen ciertos caldos pueden afectar en la recuperación de algunos serotipos de *Salmonella*.

2.4.1.1.3. Medio de cultivo selectivo y diferencial: son los cuales contienen sustancias inhibitoras las cuales impiden el crecimiento de ciertos microorganismos, entre las sustancias inhibitoras podemos encontrar: antibióticos, colorantes, sales biliares. (Pachon, 2009).

2.4.1.1.4. Medios de cultivo selectivo principales:

2.4.1.1.4.1. Agar eosina azul de metileno (EMB): los colorantes que se usan en dicho agar permite inhibir el desarrollo de bacterias Gram Positivas, permitiendo la identificación de enterobacterias patógenas.

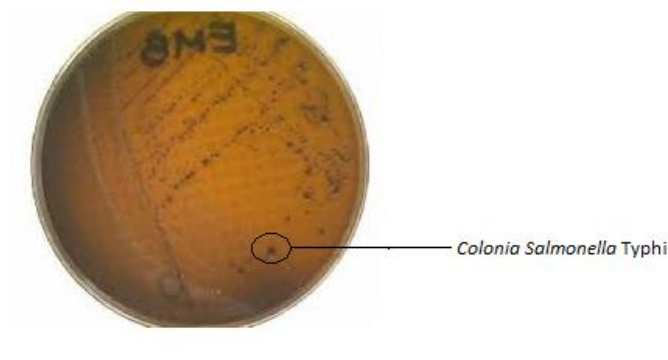


Figura 7: Agar EMB

Fuente: https://www.google.com.ec/search?q=agar+emb&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=r5ltUqSYKbHF4AOI64H4AQ&sqi=2&ved=0CC8QsAQ&biw=931&bih=433#q=agar+emb+salmonella&tbo=u&imgdii=_

2.4.1.1.4.2. Agar MacConkey: los principales componentes de dicho agar son las sales biliares y el cristal violeta, componentes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas.



Figura 8: Agar MacConkey, presencia de Salmonella

Fuente: <http://spanish.alibaba.com/product-tp/macconkey-agar-w-0-15-bile-salt-w-o-cv-109929003.html>

2.4.1.1.5. Medios de cultivo diferenciales: son medios los cuales poseen un sustrato sobre el cual va actuar la bacterias, es decir permiten diferenciar a la bacterias por su actividad metabólica, los principales medios son:

2.4.1.1.5.1. Agar Hektoen: que es un medio para el aislamiento de bacterias intestinales patógenas (Pachón, 2009) y que permite observar las características morfológicas de la colonia de la familia Enterobacteriaceae, como son colonias mucoides, secas, grandes, de color gris opaco, (Conde, 2004). Está formulado por: sales biliares que actúan como **elementos selectivos**, por lactosa, sacarosa y salicina que son **elementos diferenciales** los cuales no son fermentados por *Shigella* ni *Salmonella* y azul de bromotimol y fucsina ácida como **indicadores**.

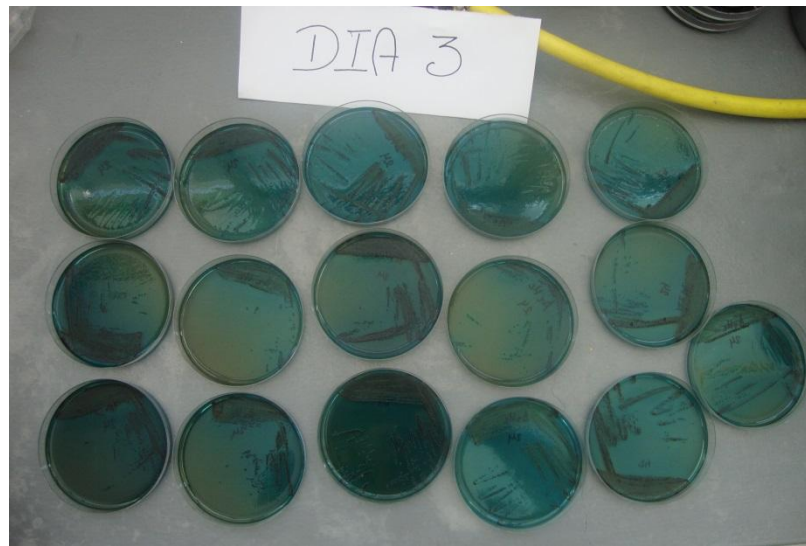


Figura 9: Agar Hektoen, *Salmonella* positivo

Fuente: foto personal

2.4.1.1.5.2. Agar Salmonella-Shigella: La selectividad de dicho agar está dada por sus componentes como las sales biliares y el verde brillante, componentes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y de coliformes.

Es considerado un medio diferencial ya que fermenta lactosa y forma ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio, formando colonias translúcidas con un punto negro en el centro.



Figura 10: Agar SS, *Salmonella* positiva

Fuente: <http://dianayjulian.galeon.com/bioquimicas.htm>

2.4.1.2. Análisis Bioquímicos para la identificación de *Salmonella* Typhi.

A menudo la fiebre tifoidea se diagnostica solo clínicamente sin embargo es muy necesario aislar el microorganismo y someterlo a pruebas bioquímicas para poder hacer un diagnóstico definitivo y para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

La identificación presuntiva de *Salmonella* Typhi se la define observando la reacción al aislarla en medios específicos como agar hierro Kligler (KIA) y agar hierro triple azúcar (TSI).

2.4.1.2.1. Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar:

Las colonias sospechosas deben ser tratadas cuidadosamente en medios de cultivo como KIA/TSI en incubarlas toda la noche a 37°C, para la siembra se selecciona una colonia bien aislada y con la punta de la asa en forma de aguja se toca el centro de la colonia, inoculamos en los medios realizando una puncionando hasta en tope del tubo y estriando en la superficie inclinada del agar, aflojamos las tapas e incubamos a 37 °C por 24 horas.

Luego de la incubación se observa la reacción, las cepas de *Salmonella* Typhi producen una superficie alcalina que se va a observar de color rojo (K) y un fondo ácido de color amarillo (A) y una porción negra por el H₂S (+), y no produce gas. (Ajello, et al 2003)

Otros serotipos de *Salmonella* producen una reacción K/AG+, q indica que la glucosa es fermentada por la producción de gas y de H₂S.

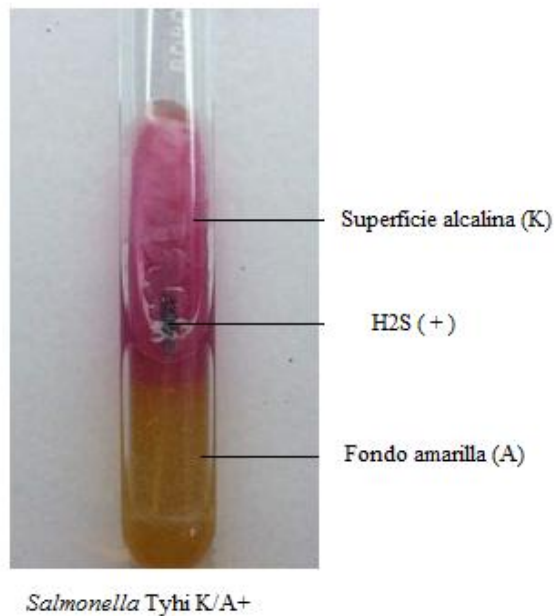


Figura 11: TSI para *Salmonella* Typhi

Fuente: <http://www.slideshare.net/roberchavez/medios-de-cultivo-y-pruebas-bioquimica-presentation>

2.4.1.3. Análisis bioquímicos adicionales para la detección de *Salmonella* Typhi:

2.4.1.3.1. Agar Hierro Lisina:

La mayoría de aislamientos de *Salmonella* descarboxilan lisina y producen H₂S y la producción de gas varía por serotipo, va a producir una reacción alcalina produciendo un color púrpura en la cuña y en el tope produce H₂S lo que va a

ennegrecer el medio. Cuando la reacción en el tope es alcalino indica que la lisina fue descarboxilada. (Ajello, et al 2003)

2.4.1.3.2. Agar motilidad:

Se inocula con una aguja recta en el medio de cultivo con una sola pinchada, la motilidad se observa por la presencia de un crecimiento difuso fuera de la línea inoculación. (Ajello, et al 2003)

2.4.1.3.3. Medio de Urea:

Identifica los microorganismos productores de ureasa, los cultivos positivos van a producir una reacción alcalina en el medio observándose un color rosáceo o rojo, mientras que los negativos no cambian de color. (Ajello, et al 2003)

2.4.1.3.4. Reacciones típica para el aislamiento de *Salmonella Typhi*

Medio de cultivo	Reacción <i>Salmonella Typhi</i>
Agar hierro triple azúcar (TSI)	K/A(+)
Agar hierro Kligler (KIA)	K/A(+)
Agar hierro lisina (LIA)	K/K(+)
Sulfuro de hidrogeno (H ₂ S)	Débil
Urea	Negativa
Motilidad	Positiva
Indol	Negativa

- **KIA y TSI:** K alcalina (rojo); A ácido (amarillo); + H₂S producido negro
- **LIA:** K alcalina (purpura); A ácido (amarillo); + H₂S producido negro. Cuando la lisina fue descarboxilada se produce una reacción purpura en el extremo. (Ajello, et al 2003)

2.4.1.4. Desventajas del coprocultivo:

- La información que brinda muchas veces, limita la toma de decisiones a tiempo; factor importante porque una detección temprana del microorganismo ayuda a evitar contagios y la aparición de brotes, así como también ayuda a implementar métodos preventivos para evitar que la infección se propague. (Parada, et al., 2007)
- Debido a la labor que demanda el coprocultivo, no es una técnica muy sensible ni específica y puede estar influenciada por muchos factores en todo su procedimiento.
- El tiempo en que cual se obtienen los resultados definitivos es de 72 horas. (Conde, et al., 2006).
- La identificación definitiva para el género requiere de un estudio bioquímico con las colonias sospechosas de *Salmonella* Typhi para someterlas a un estudio serológico con antisueros Vi y D de *Salmonella*. Para su confirmación revisamos la estructura antigénica Ag. somático O: de la pared celular, Ag. flagelar H: proteína de los flagelos y Ag. capsular Vi.

2.4.2. Reacción en cadena de la Polimerasa:

La PCR es una técnica molecular la cual se basa en el estudio de las características químicas de ADN y su réplica in vitro, amplificando más de un millón de veces el ADN obtenido de una región del genoma, siendo el ADN un polímero formado por dos cadenas antiparalelas, constituido por unidades de desoxirribonucleotidos de cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) unidas al azúcar desoxirribosa.

Para dicha técnica se utilizan dos oligonucleotidos de unos 15 a 20 nucleotidos, los cuales son complementarios a las zonas de la región la cual se va amplificar. Los oligonucleótidos actúan como cebadores para la amplificación in vitro de ADN la cual actúa habitualmente bajo la acción de la taq polimerasa.

Un aporte fundamental que ofrece esta técnica es la rapidez y eficiencia de sus resultados, los cuales anteriormente se los obtenía mediante largos procesos, el resultado obtenido es

un fragmento génico con un alto grado de pureza. Esta técnica tiene un alto grado de sensibilidad. (Satz, Kornblihtt, 1993)

2.4.2.1. Componentes de la PCR:

2.4.2.1.1. ADN molde: ADN del cual queremos obtener una copia para amplificarlo. El ADN que la taq usas como molde para la formación de nuevas cadenas polinucleotídicas.

Para que exista una buena copia de ADN es importante que la calidad del ADN molde sea óptima ya que cuando la calidad esta degradada o posee inhibidores puede afectar la acción de la polimerasa.

2.4.2.1.2. Taq polimerasa: enzima que nos permite generar la copia a partir del DNA molde. Se clasifica en termolábiles (actividad óptima de temperatura de 37 a 42°C) y termoestables (temperatura óptima de 72°C aunque puede resistir 95°C)

2.4.2.1.2.1. Tampón de amplificación: ayuda a llevar a cabo correctamente la reacción de la enzima taq polimerasa, en la actualidad es usado principalmente el $MgCl_2$.

El $MgCl_2$ tiene gran influencia en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones de Magnesio son indispensables para la correcta catálisis de la taq polimerasa.

La concentración usada de $MgCl_2$ debe ser la adecuada ya que cantidades excesivas pueden formar acumulación de productos inespecíficos y una baja cantidad disminuye la fidelidad de la copia. (Pachon, 2009)

2.4.2.1.3. Cebadores o primers: son moléculas cortas las cuales van a delimitar el fragmento a amplificar. La longitud debe ser de aproximadamente 18 a 24 bases ya que se ha comprobado que primers muy largos no ayudan en el rendimiento de la reacción y muy cortos disminuyen la especificidad. Los primers usados deben tener una misma temperatura. (Pachon, 2009)

2.4.2.1.4. Desoxirribonucleotidos de trifosfato dNTPs: son nucleótidos libres los cuales se van a incorporar al extremo 3' libre del cebador que está unido a la cadena molde para que la DNA polimerasa cree una cadena complementaria.

Es indispensable tener una concentración equimolar de las cuatro dNTPs ya que la desigualdad aunque sea tan solo en una dNTPs favorece la unión errónea de nuevas bases disminuyendo el rendimiento de la reacción. (Pachon, 2009)

La concentración de dNTPs y $MgCl_2$ van relacionadas ya que los iones de Mg se unen a los dNTPs, y al tener concentraciones elevadas de dNTPs disminuirá el rendimiento de la reacción al no tener la taq polimerasa suficiente cantidad de Mg para incorporar los dNTPs. (Pachon, 2009)

2.4.2.2. Pasos para la PCR:

2.4.2.2.1. Denaturación: en este primer paso las dos hebras de las cuales está constituido el ADN se denaturaliza es decir se sometes a altas temperaturas ($94-95^{\circ}C$) produciendo que los puentes de hidrógeno intercatenarios se rompan separando ambas cadenas.

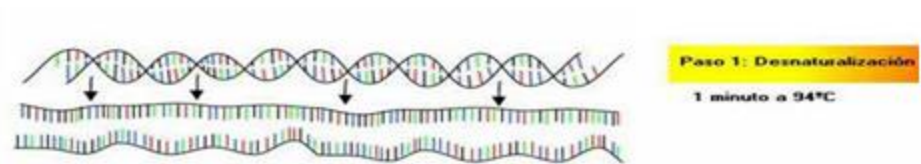


Figura12: Denaturación PCR

Fuente: <http://biologia-alchu.blogspot.com/2010/09/reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr.html>

2.4.2.2.2. Hibridación: también conocido como “annealing”, en este paso se baja la temperatura para que se pueda producir la unión del cebador a su hebra complementaria es decir al extremo 3' de cada una de las hebras que se va amplificar.

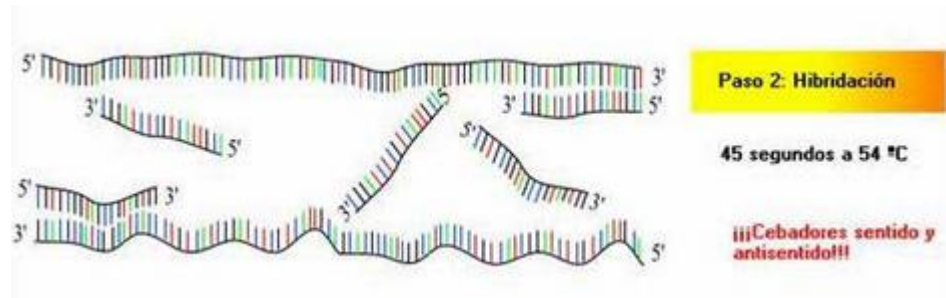


Figura 13: Hibridación PCR

Fuente: <http://biologia-alchu.blogspot.com/2010/09/reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr.html>

2.4.2.2.3. Elongación: extensión del cebador por la taq polimerasa, añadiendo los dNTP complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente.

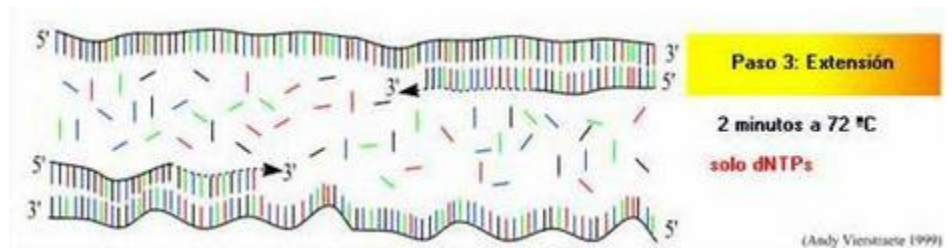


Figura 14: Elongación de PCR

Fuente: <http://biologia-alchu.blogspot.com/2010/09/reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr.html>

2.4.2.3. Variantes de la PCR:

2.4.2.3.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): herramienta molecular que analiza simultáneamente varios locis y detecta un gran número de ADN polimórfico, detecta los cambios en tamaño de distintas regiones del genoma sin la necesidad de conocer la secuencia de esta.

2.4.2.3.2. PCR asimétrica: amplificación preferencial de una de las cadenas de ADN blanco.

2.4.2.3.3. Colony PCR: reacción por cada colonia que se va analizar con el propósito de encontrar la colonia que contiene la secuencia que deseamos amplificar.

- 2.4.2.3.4. Hot start PCR:** el inicio de esta reacción se produce a altas temperaturas para evitar la amplificación de productos inespecíficos.
- 2.4.2.3.5. PCR Inversa:** permite realizar la amplificación de fragmentos de ADN de los cuales se conoce su secuencia interna.
- 2.4.2.3.6. In situ PCR:** la reacción se produce en secciones histológicas o células.
- 2.4.2.3.7. PCR larga (LA- PCR):** su objetivo es amplificar con exactitud regiones diana de gran tamaño que supere los de la PCR convencional.
- 2.4.2.3.8. Multiplex PCR:** variación de la PCR convencional donde se coloca en el mismo tubo dos o más primers con el propósito de amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN.
- 2.4.2.3.9. PCR anidada (Nested PCR):** variante de PCR convencional donde se realiza dos amplificaciones con distintos primers en cada una para obtener productos más cortos y específicos. Primero se realiza la amplificación de la región más extensa de ADN que contiene el fragmento diana con los iniciador externos, con el producto de amplificación obtenido se amplifica la región más específica con los iniciadores internos.
- 2.4.2.3.10. RT-PCR:** primero se realiza una Transcripción reversa a partir de ARN para sintetizar el ADN complementario que luego es amplificado mediante una PCR convencional.
- 2.4.2.3.11. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism):** técnica que se basa en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por la PCR.
- 2.4.2.3.12. PCR-SSCP** (Siglas en Ingles de Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism). es un proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadena simples de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de Poliacrilamida. Con esto, la estructura de cada hebra de ADN de un amplicón adoptará una conformación dada, dependiente de la secuencia nucleotídica, que afectará su migración en el gel. Así dos productos de PCR con diferencias puntuales en su secuencias presentaran distintos patrones electroforéticos de los fragmentos de ADN monocatenarios.

2.4.2.3.13. RAPD (Siglas en Ingles de Randomly amplified polymorphic DNA) Una técnica que permite la amplificar regiones anónimas de ADN mediante el empleo de iniciadores (primers) arbitrarios.

2.4.2.3.14. Real Time PCR (PCR en Tiempo Real): se basa en la detección y cuantificación al mismo tiempo por la fluorescencia emitida por los productos de PCR que acumulan durante el proceso de amplificación.

2.4.2.4. Ventajas de la PCR:

- Esta técnica tiene las ventajas de obtener varias copias de una secuencia diana, cualquier segmento de ADN o ARN pueden ser amplificados para obtener un número grande de copias de la secuencia de ADN.
- Posee gran sensibilidad porque permite detectar muy bajas cantidades de ADN molde.
- Posee gran especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácidos nucleicos para la que han sido diseñados los cebadores. (Méndez, Álvarez, et al., 2002).

2.4.2.5. Desventajas de la PCR:

La PCR puede presentar problemas en la amplificación de las secuencias debido a varios factores como: diseño inapropiado de cebadores, la calidad y concentración de ADN, el tipo y cantidad de ADN polimerasa, el número de ciclos de amplificación, temperaturas de hibridación. (Méndez-Álvarez, Pérez-Roth, 2002).

En el proceso de amplificación la denaturación incompleta puede causar el uso poco eficaz del ADN molde en los primeros ciclos de amplificación y a su vez producir un bajo rendimiento, también puede causar efectos de auto-anillamiento que da lugar a falsos positivos.

2.4.2.5.1. Métodos de extracción de ADN:

Inhibidores de la Taq polimerasa: la acción de la Taq polimerasa puede verse influenciada por concentraciones elevadas de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes.

Una concentración baja de Mg^{++} produce un bajo rendimiento para la amplificación, mientras que una concentración elevada puede disminuir la fidelidad de la copia.

También pueden afectar inhibidores presentes en el ADN extraído de las muestras fecales como son: hem de la hemoglobina, bilirrubinas, sales biliares y carbohidratos complejos los cuales van a afectar la sensibilidad de la detección de patógeno por PCR por ello es importante escoger un procedimiento correcto para la extracción del ADN el cual elimine en la mayoría a estos inhibidores. (Quintaes, Leal, Reis, Fonseca & Hofer, 2002).

CAPÍTULO 3: MARCO METODOLOGICO

3.1. Localización:

La parte práctica fue realizada en el área de microbiología del Laboratorio clínico DiserLab y en el laboratorio de docencia del área de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.2 Trabajo de Laboratorio

Las muestras fueron procesadas en Laboratorio de microbiología del DISerLAB de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.3 Muestra

Materia fecal inoculado artificialmente con cepas de *Salmonella* Typhi en concentraciones conocidas. La cepa de *Salmonella* Typhi se la obtuvo del cepario del Instituto Nacional de Higiene “Izquieta Pérez”.

3.4 Diseño experimental

3.4.1 Población

El estudio se realizará en un total de 144 muestras fecales inoculadas artificialmente por *Salmonella* Typhi de las cuales obtendremos la sensibilidad, y para la obtención de la especificidad se realizará un estudio con 50 muestras de las cuales 25 serán positivas y 25 serán negativas.

3.4.2 Cálculo del tamaño de la muestra

Al tratarse de una investigación descriptiva transversal en la que se van a comparar dos métodos analíticos para el cálculo de la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

Dónde:

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

Z_{α} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado= error $\alpha= 0.010$; Z_{α} 2.326

Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado= Potencia del estudio de 0,80;

$Z_{\beta}=0,842$.

p_1 = Valor de la proporción en la prueba habitual.= 73%

p_2 = Valor de la proporción en la nueva técnica= 98%

p = Media de las dos proporciones p_1 y p_2

Cálculo:

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2} \quad p = \frac{0,73 + 0,98}{2} = 0.85$$
$$n = \frac{2.326^2 * 0,85 (1 - 0,85)^2}{(p_1 - p_2)^2} + 0,842^2 * \frac{0,73 (1 - 0,73) + 0,98 (1 - 0,98)^2}{(p_1 - p_2)^2}$$
$$n = 144$$

Para este estudio se estableció un nivel de confianza del 99%, un error de muestreo o precisión 0.01, y un valor de la prueba del 73%.

3.4.3 Materiales:

3.4.3.1 Equipos:

- Pipetas automáticas de 1 – 10 ul
- Pipetas automáticas de 5 – 20 ul
- Pipetas automáticas de 20 – 200 ul
- Pipetas automáticas de 100 – 1000 ul
- Cronómetro.
- Micro centrífuga
- Baño María
- Cámara electroforética.
- Termociclador

3.4.3.2 Reactivos:

- Medios de cultivo Hektoen
- Medios de pre enriquecimiento Muller Kauffman
- Primer F (Group D wzx)
- Primer R (Group D wzx)
- Primer F (fliC-d)
- Primer R (fliC-d)
- Primer F (wcdB)
- Primer R (wcdB)
- Taq polimerasa marca Promega, catalogo M5122
- Marcador de peso molecular 100pb marca Promega, catalogo G2101
- Agarosa ultra pure Invitrogen, catalogo 16500500
- Tubos de reacción PCR
- SYBR safe. Gel Star marca Lonza
- Kit de extracción de ADN (OMEGA) el cual contiene los siguiente:
 - Buffer SLB
 - Buffer DS
 - Buffer SPD
 - Proteinasa K
 - Reactivo HTR
 - Buffer BL
 - Buffer UHB
 - Solución de lavado

3.4.4 Preparación Estándar

El siguiente cuadro permitió escoger cuál estándar es adecuado para esta investigación, es así que los estándares se los preparo partiendo de la escala Mac Farland 0.5 (1.5×10^8 UFC/ml). En donde se realizó 9 diluciones:

Dilución	Volumen dilución	Volumen de Buffer de Suspensión	UFC /ml	Volumen final
A	Mac Farland 0.5	0.0 MI	1.5×10^8	2000 UI
B	20 uL de A	1980 ul	1.5×10^6	2000 UI
C	20 uL de B	1980 ul	1.5×10^4	2000 uL
D	200 uL de C	1800 ul	1.5×10^3	2000 UI
E	500 uL de D	2000 ul	300 UFC	2500 UI
F	1200 uL de E	1200 ul	150 UFC	2400 uL
G	800 uL de F	1600 ul	50 UFC	2400 UI
H	1000 uL de G	1000 ul	25 UFC	2000 UI
I	800 uL de H	1200 ul	5 UFC	2000 uL
J	800 ul de I	1200 ul	1 UFC	2000 UI

Tabla 1: Estándares preparados

De las 9 diluciones preparadas se procedió a seleccionar tres estándares con los cuales se trabajó y estos estándares son:

E	500 uL de D	2000 ul	300 UFC	2500 uL
F	1200 uL de E	1200 ul	150 UFC	2400 uL
G	800 uL de F	1600 ul	50 UFC	2400 uL

Tabla 2: Estándares seleccionados

Las técnicas de aislamiento microbiológico y de amplificación por PCR se realizó partiendo de los estándares preparados con concentraciones diferentes de 50, 150 y 300 UCF respectivamente.

Se preparó los estándares con un volumen final de:

UFC /MI	Volumen final
300 UFC	2500 ul
150 UFC	2400 ul
50 UFC	2400 ul

Luego la muestra cómo se dividió:

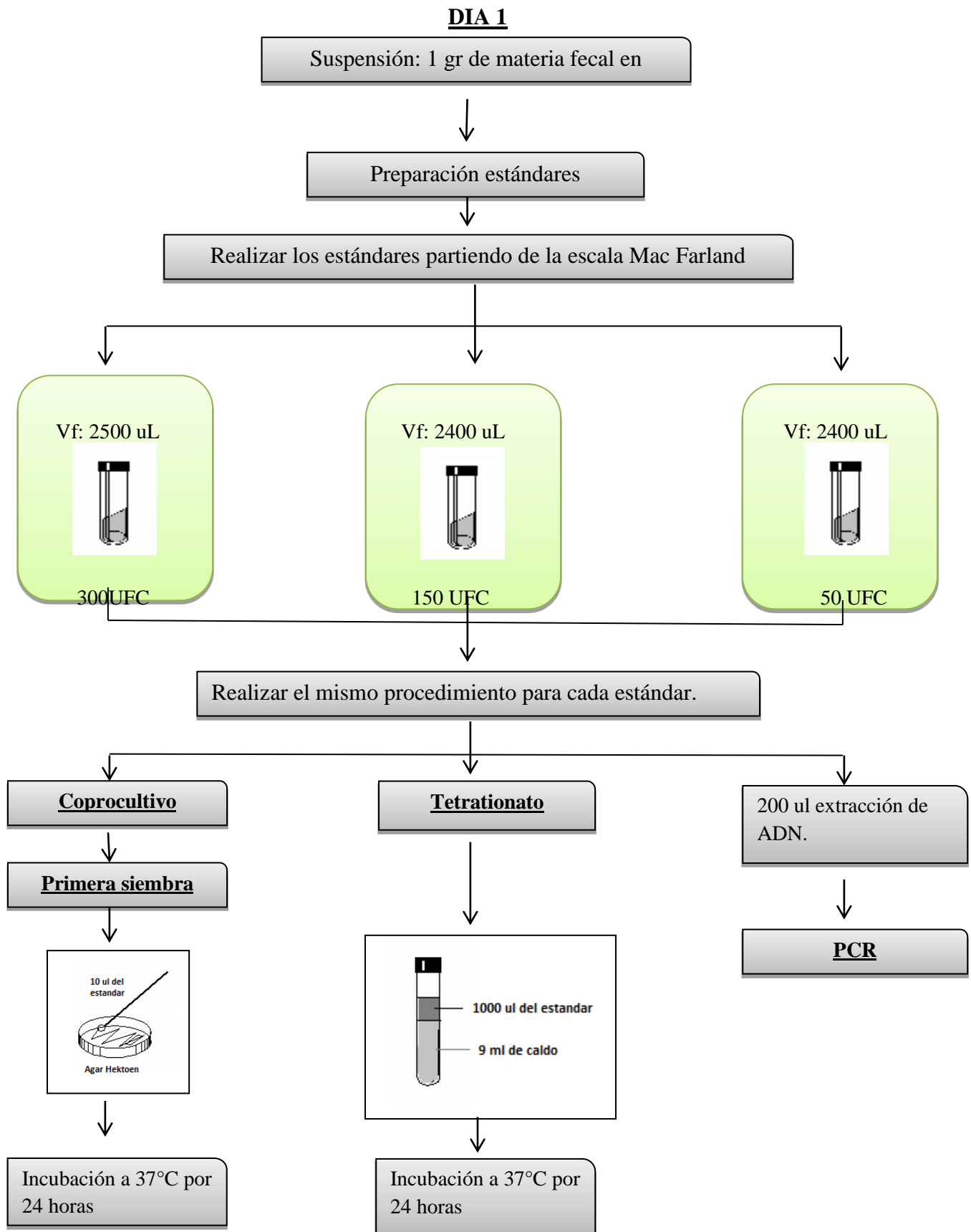
- 1 ml para siembra en tetracionato.
- 10 ul para siembra en agar Hektoen.
- 200 ul para extracción de ADN bacteriano.

Las 48 muestras diarias se dividieron en tres grupos para sembrar igual número de muestras por estándar, y para cada estándar realizamos las pruebas de laboratorio descritas a continuación.

Realizamos 16 muestras por estándar, a los estándares seleccionados los identificamos de la siguiente manera:

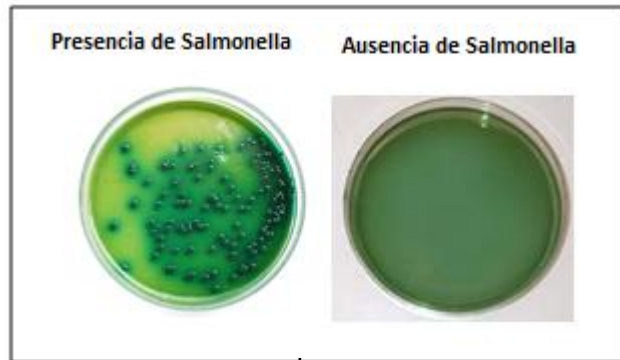
Estándar	UFC /MI
A	300 UFC
B	150 UFC
C	50 UFC

3.4.5. Coprocultivo:



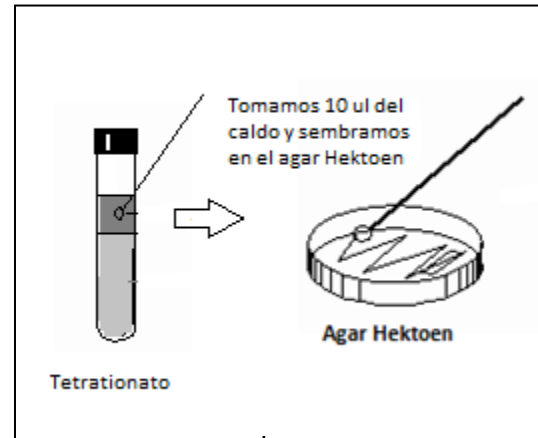
DIA 2

Observar resultados de la **primera siembra** (día 1)



Anotar resultados de las cajas las cuales fueron sembradas directamente en el medio de cultivo.

Realizar **segunda siembra** a partir del tetracionato (día 1)



Incubación a 37°C por 24 horas

DIA 3

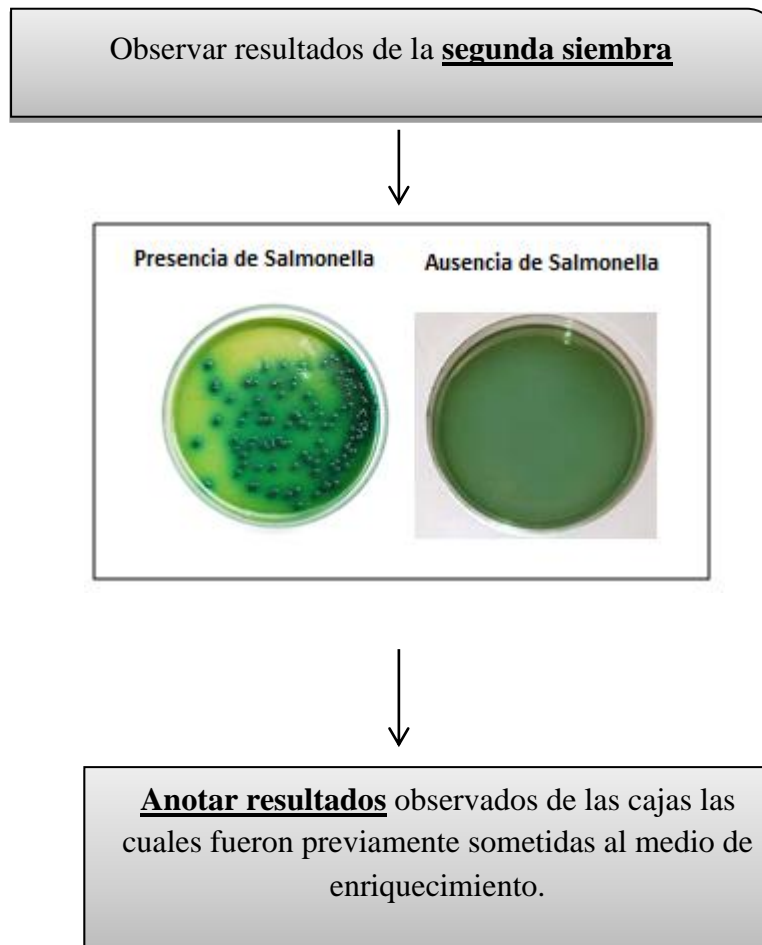


Figura 15: Procedimiento realizado

Nota: El mismo procedimiento se realizó durante los tres días para los cuales se dividió el total de muestras de nuestro estudio.

3.4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.4.6.1 Extracción de ADN bacteriano en materia fecal (E.Z.N.A. Stool DNA kit)

- Para la extracción de ADN se usa los 200 ul que fueron obtenidos según el procedimiento descrito en el gráfico número 13
- Se realizó la extracción de ADN de las muestras con el Kit comercial **E.Z.N.A. Stool DNA kit** de la casa comercial Omega el cual es específico para extraer ADN de heces fecales. La principal ventaja es que el producto se puede utilizar para clonar, secuenciar y análisis.
- Para dicha extracción se ejecutó el siguiente procedimiento: se tomó 200ul de la muestra de heces. Se añadió 540ul de Buffer SLB y se colocó en el vortex por 10 segundos o hasta que la muestra esté completamente homogenizada. Se añadió 60ul de buffer DS y 20ul de proteinasa K. Se mezcló en el vortex e incubó a 70°C por 10 minutos. Pasados los 10 minutos se añadió 200ul de buffer SPD 2 y se mezcló en el vortex por 30 segundos. Se incubo la muestra en hielo por 10 minutos y luego se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos para que se sedimente la muestra.
- Se aspiró 400 ul de sobrenadante en un nuevo tubo, al cual se añadió 200ul de reactivo HTR y se mezcló en el vortex por 10 segundos. Se procedió a incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó a 13000 g por 2 minutos para que sedimente los inhibidores y absorba el reactivo.
- Se colocó 250ul del sobrenadante en un nuevo tubo de 1,5 ml, al cual se añadió 250ul de Buffer BL, 250ul de etanol absoluto para el lisado de las células y se mezcló en el vortex por 10 segundos. Se transfirió la muestra en una columna HiBind DNA y se procedió a centrifugar a 13000 g durante 1 minuto.

- Se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 ml y se añadió 500ul de Buffer UHB y se procedió a centrifugar a 10000 g por 30 segundos. Inmediatamente se añadió 700ul del tapón para lavado de ADN en la columna de HiBind DNA y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto.
- Se procedió a retirar la columna de ADN del tubo anterior y la se colocó en un tubo de HiBind, el cual se añadió 700ul de solución de lavado y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto.
- Se retiró la columna y se colocó nuevamente en un tubo vacío, el cual se centrifugó a 13000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Para eluir el DNA se insertó el tubo filtro en un nuevo tubo estéril de 1.5 mL, se añadió 200uL del buffer de elusión (calentándolo previamente a 65°C) e incubarlo a temperatura ambiente por dos minutos.
- Por último centrifugar a 13000 g por 1 minuto. Se trabajó con el sobrenadante.

3.4.7. Metodología:

3.4.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex para la determinación de genes Group D (Antígeno somático), fliC-d (Antígeno flagelar) y wcdB (antígeno capsular) de Salmonella Typhi.

Los genes para la master mix fueron seleccionados según estudios realizados en Colombia en 2010 y 2008 descritos en el marco referencial.

Para la PCR multiplex se trabajó con Gotaq Hot Start Green Master Mix, que contiene: Reaction buffer (pH 8.5), 4uM MgCl₂, 400uM dGTP, 400uM dATP, 400uM dTTP, 400uM dCTP.

En la preparación de la master mix se trabajó con un volumen final de 25ul para lo cual se utilizó:

PRIMERS	VOLUMEN	CONCENTRACIONES
Primer F (Group D wzx)	0.5 ul	0,1 uM
Primer R (Group D wzx)	0.5 ul	0,1 uM
Primer F (fliC-d)	0.5 ul	0,1 uM
Primer R (fliC-d)	0.5 ul	0,1 uM
Primer F (wcdB)	0.5 ul	0,1 uM
Primer R (wcdB)	0.5 ul	0,1 uM
Taq polimerasas	12.5 ul	0.5 U
DNA	1 ul	< 250ng
Agua molecular	8.5 ul	
Volumen final	25 ul	

Tabla 3: Preparación de la Master Mix

3.4.7.2. Secuencia y tamaño de los Primers utilizados.

Nombre del Primers	Secuencia 5' – 3'	Temperatura melting (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Posición del primer
Group D forward	GCGTTGGGAGTGTGGTCTAT	54	185	431-450
Group D reverse	AATGGGCAGTATTGCTACCG	52		596-615
fliC-d forward	GATCCTATTACAGCCCAGAGCA	60	301	592-613
fliC-d reverse	CAACTGTGGTTCGTATCAACACC	60		871-892
wcdB forward	GAAGAACTACGGACCAAACCTGG	60	406	14-34
wcdB reverse	CGGCGTAGGTGAACTAGAGAC	60		418-439

Tabla 4: Secuencia y tamaño de los Primers

NOMBRE DEL PRIMER	AMPLIFICA
Group D	Antígeno somático de superficie.
fliC-d forward	Antígeno flagelar
Wcd B	Antígeno capsular

Tabla 5: Primers amplificados

Para el proceso de amplificación se utilizó un termociclador de BIORAD modelo s1000 Thermal Cycler el cual fue programado con el siguiente protocolo:

1	Activación de la taq	2 min a 92°C
2	Denaturación	60 seg a 94°C
3	Hibridación	60 seg a 65°C
4	Extensión	60 seg a 72°C
5	Ciclos paso 2 a 4	30 ciclos
6	Extensión final	10 min a 72°C

Tabla 6: Condiciones del termociclador

3.4.7.3. Electroforesis en geles de agarosa:

Para la electroforesis se trabajó en geles de agarosa ultra pura de calidad molecular a una concentración de 2%, preparada con TAE 1x.

La corrida electroforética se realizó en cámaras horizontales con un voltaje de 110 voltios por 90 minutos.

Para la comparación de los tamaños de ADN se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder).

El ADN de las muestras fue sometido a un proceso de tinción con el SYBR Safe (Invitrogen, 0.1ul/ml) para poder visualizarlo en un transluminador y fotografiar la corrida

electroforética resultante.

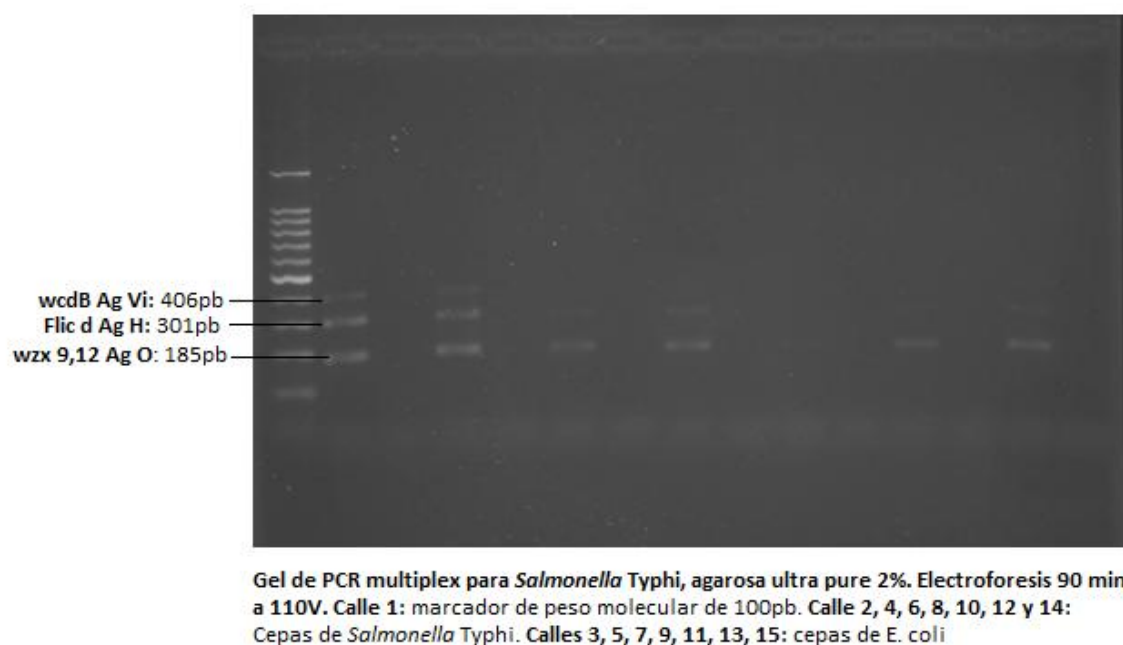


Figura 16: Electroforesis en geles de agarosa

3.4.8. Pruebas de especificidad.

Para la realización de la prueba de especificidad se tomó como base los tres estándares seleccionados que fueron de 50UFC, 150 UFC y de 300UFC de los cuales se observó si hubo presencia o ausencia del crecimiento de la bacteria, luego de haber evaluado los tres estándares se realizó el mismo procedimiento anteriormente mencionado seleccionando el estándar de 300 UFC ya que obtuvimos una mejor sensibilidad.

Para la prueba de especificidad se realizó la extracción de ADN de una cepa de *E. coli* la cual sirve como un control negativo, al mismo tiempo que se realizó la extracción de ADN de *Salmonella Typhi* y se realizó la amplificación respectiva para cada bacteria. Se utilizó un total de 50 muestras de las cuales 25 son positivas con *Salmonella* y 25 negativas inoculadas con *E. coli*. Para de esta manera poder determinar la especificidad y especificidad de cada técnica tanto del coprocultivo como de la PCR.

3.4.9. Análisis de datos:

Los datos obtenidos de cada estándar se registraron en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel, observando ausencia y presencia de la bacteria, para determinar que obtuvo una mayor sensibilidad y realizar las pruebas correspondientes para la obtención de la especificidad. Las 50 muestras realizadas para la obtención de la especificidad fueron procesadas en tablas de contingencia de dos por dos para comparar y evaluar las pruebas diagnosticar en relación al “gold estándar” que en el presente estudio corresponde al coprocultivo (agar Hekto en.

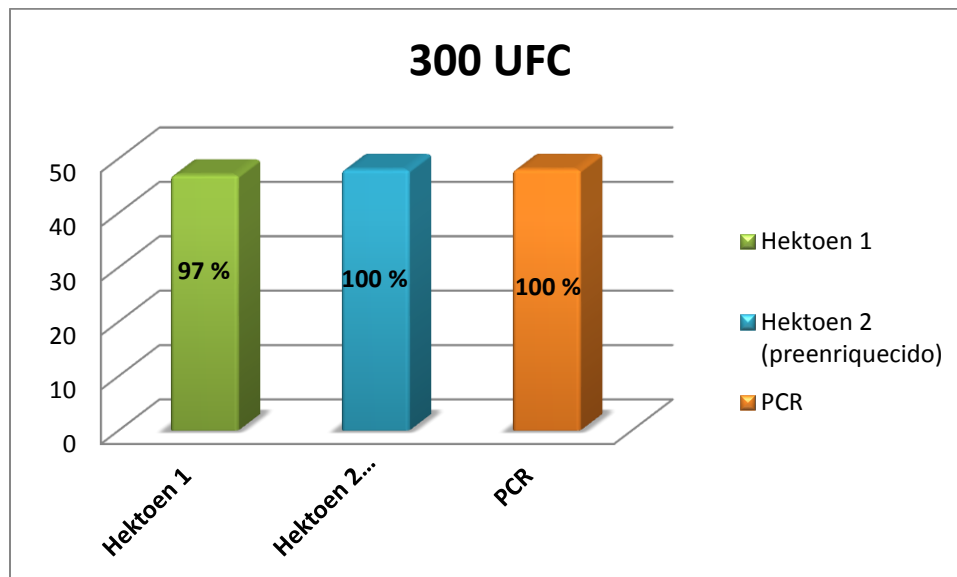
CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Sensibilidad obtenida por cada estándar

4.1.1 300 UFC

MÉTODO	POSITIVAS	SENSIBILIDAD
<i>Hektoen 1</i>	47	97%
<i>Hektoen 2 (preenriquecido)</i>	48	100%
<i>PCR</i>	48	100%
TOTAL	143	99%

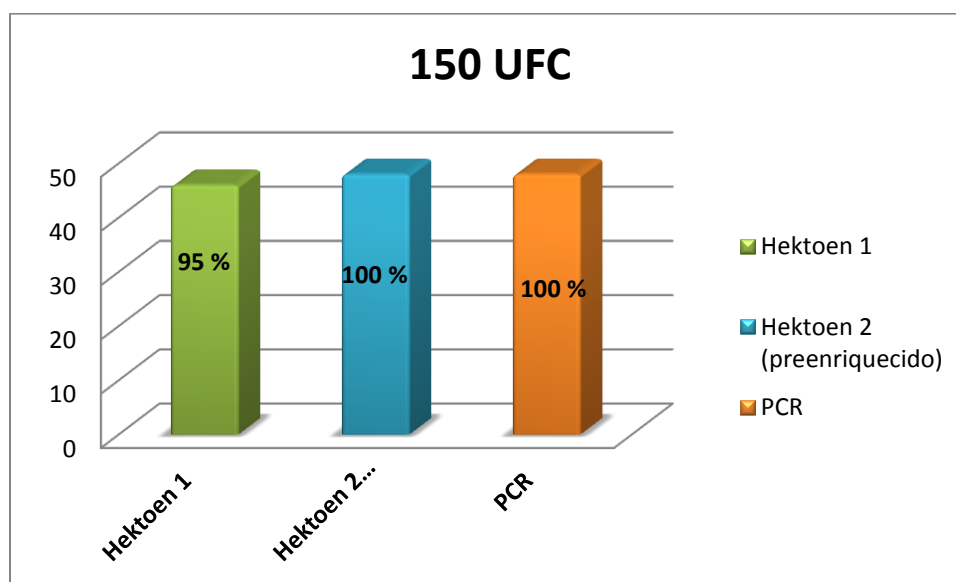
Tabla 6: Resultados obtenidos con 300 UFC



4.1.2 150 UFC

METODO	POSITIVAS	SENSIBILIDAD
<i>Hektoen</i>	46	95%
<i>Tetrationato</i>	48	100%
<i>PCR</i>	48	100%
TOTAL	142	98%

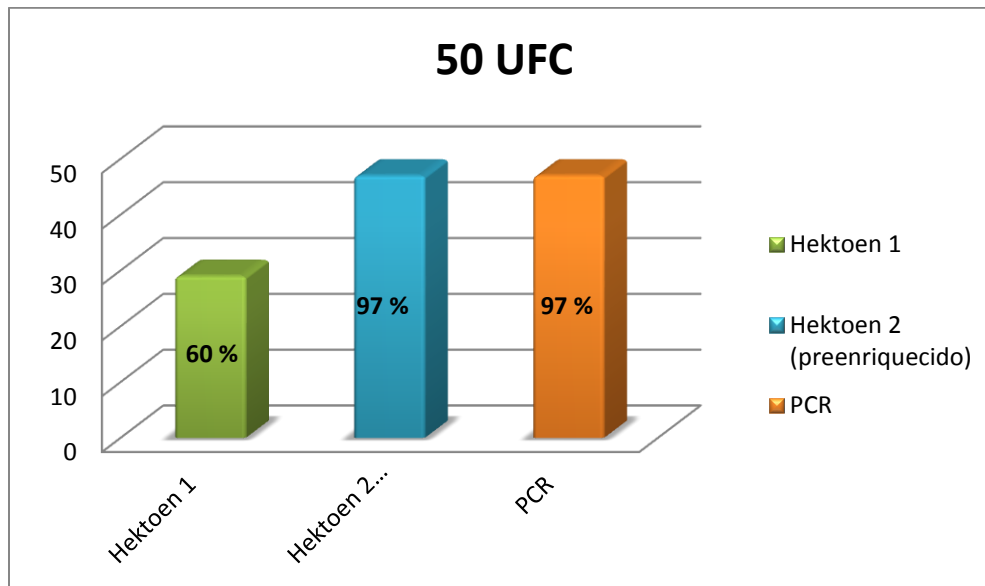
Tabla 7: Resultados obtenidos con 150 UFC



4.1.3. 50 UFC

METODO	POSITIVAS	SENSIBILIDAD
<i>Hektoen</i>	29	60%
<i>Tetrationato</i>	47	97%
<i>PCR</i>	47	97%
TOTAL	123	85%

Tabla 8: Resultados obtenidos con 50 UFC

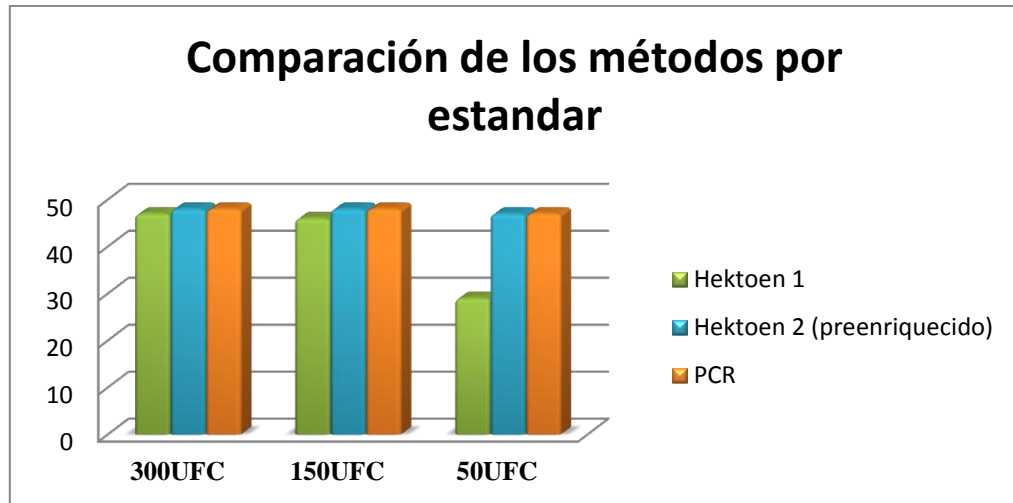


Determinando la sensibilidad por estándar se puede concluir que a pesar de ser mínima la diferencia entre cada estándar se obtiene mejores resultados con las 300 UFC.

4.2. Comparación de los métodos con los tres estándares:

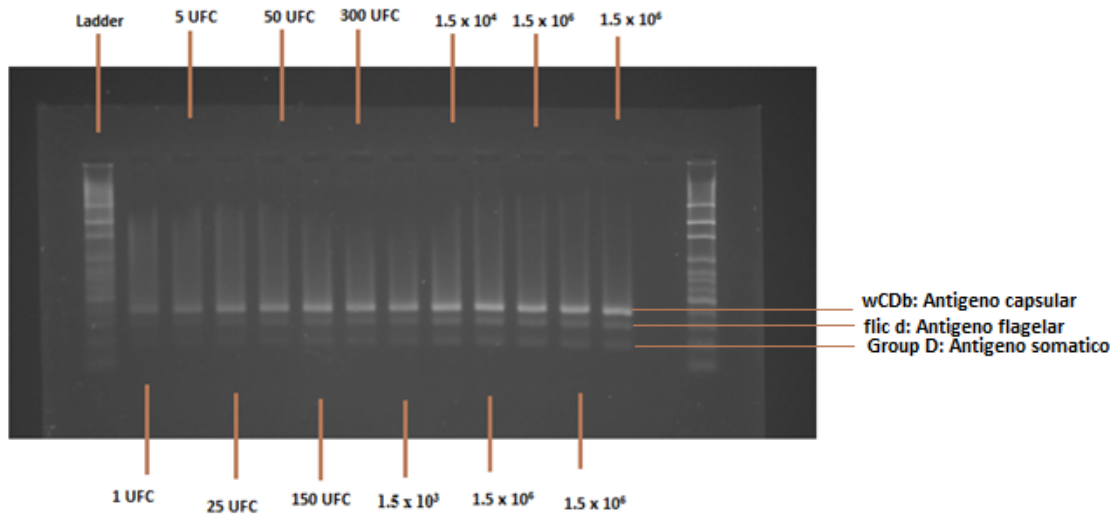
METODO	300UFC	150UFC	50UFC	TOTAL	SENSIBILIDAD
<i>Hektoen 1</i>	47	46	29	122	84%
<i>Hektoen 2 (preenriquecido)</i>	48	48	47	143	99%
<i>PCR</i>	48	48	47	143	99%

Tabla 9: Comparación de los tres métodos con los tres estándares



4.2. Límite de detección de la UFC

Para la determinación de límite de detección se procedió a extraer el ADN de cada dilución para de esta manera poder determinar el límite mínimo de UFC que detecta la prueba.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinar límites de detección de *Salmonella Typhi*.
 Calle 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Calle 2: 1 UFC para *Salmonella Typhi*, Calle 3: 5 UFC para *Salmonella Typhi*, Calle 4: 25 UFC para *Salmonella Typhi*. Calle 5: 50 UFC para *Salmonella Typhi*. Calle 6: 150 UFC para *Salmonella Typhi*. Calle 7: 300 UFC para *Salmonella Typhi*. Calle 8: 1.5×10^3 UFC para *Salmonella Typhi*, Calle 9: 1.5×10^4 UFC para *Salmonella Typhi*, Calle 10-13: 1.5×10^6 UFC para *Salmonella Typhi*. Calle 15: marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa para limite de detección

Podemos concluir que con todos los estandares planteados hubo amplificación para *Salmonella Typhi*. Para el estudio de especificidad se trabajo con el estandar de 300 UFC.

4.3.Pruebas de sensibilidad y especificidad del estándar de 300 UFC.

Para el diagnóstico de sensibilidad y especificidad de un test diagnóstico se usa la tabla tetracórica.

	TEST		
TEST	<i>POSITIVO</i>	<i>NEGATIVO</i>	
<i>POSITIVO</i>	A	B	a+b
<i>NEGATIVO</i>	C	D	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

Dónde:

- A: verdaderos positivos, número de individuos con la enfermedad
- B: falsos positivos, individuos sin la enfermedad pero que en el resultado de la prueba diagnóstica son positivos.
- C: falsos negativos, individuos con la enfermedad pero que en la prueba diagnóstica son negativos.
- D: verdaderos negativos, individuos sin la enfermedad.

Sensibilidad: es la capacidad que posee un test para identificar correctamente a los sujetos que tienen la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

Especificidad: es la capacidad que tiene el test para identificar correctamente a los sujetos que no tienen la enfermedad.

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d}$$

Se procesaron 50 muestras de las cuales 25 eran positivas para *Salmonella* Typhi y 25 negativas de *Escherichia coli*, de acuerdo con la siguiente tabla:

Los números impares son muestras positivas y los números pares son muestras negativas, los resultados se colocaron en una matriz donde:

“1” se colocó para las muestras positivas

“0” se colocó para las muestras negativas

N° MUESTRA	Agar Hektoen	Tetracionato	PCR
1	0	1	1
2	0	0	0
3	0	1	1
4	0	0	0
5	1	1	1
6	0	0	0
7	0	1	1
8	0	0	0
9	0	1	1
10	0	0	0
11	0	1	1
12	0	0	0
13	1	1	1
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	1	1	1
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1	0	0

21	1	1	1
22	0	0	0
23	1	1	1
24	0	0	0
25	1	1	1
26	0	0	0
27	0	0	0
28	1	0	0
29	0	1	1
30	0	0	0
31	1	1	1
32	0	0	0
33	1	1	1
34	0	0	0
35	1	1	1
36	0	0	0
37	1	1	1
38	0	0	0
39	1	1	1
40	0	0	0
41	0	1	1
42	1	0	0
43	1	1	1
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	1	1	1
50	0	1	0

HEKTOEN 2 (PREENRIQUECIDO)	COPROCULTIVO AGAR HEKTOEN 1		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	13	10	23
NEGATIVO	3	24	27
TOTAL	16	34	50

Tabla 10: Comparación de resultados de la siembra de *Salmonella* Typhi entre el coprocultivo (agar Hektoen) y el medio enriquecido con tetracionato.

En este estándar, la capacidad del tetracionato para identificar correctamente a los verdaderos positivos es del 81,25% (sensibilidad); en cambio su capacidad para detectar a los verdaderos negativos es del 70.58% (especificidad).

PCR	COPROCULTIVO AGAR HEKTOEN 1		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	13	9	22
NEGATIVO	3	25	28
TOTAL	16	34	50

Tabla 11: Comparación de resultados de la siembra de *Salmonella* Typhi entre el coprocultivo (agar Hektoen) y el PCR.

En este estándar, la capacidad del PCR para identificar correctamente a los verdaderos positivos es del 81,25% (sensibilidad); en cambio su capacidad para detectar a los verdaderos negativos es del 73.52% (especificidad).

CAPITULO 5: DISCUSIÓN

Al realizar las pruebas para determinar cuál de ellas era la más idónea para su utilización en el laboratorio, se pudo determinar que la PCR podía aportar, de manera significativa, en la obtención de resultados confiables en el laboratorio.

Para comprobar esta afirmación se hicieron tres análisis a partir de la aplicación de tres estándares diferentes (300, 150 y 50 UFC), donde la técnica PCR obtuvo una sensibilidad del 99% a partir de la preparación de la master mix con un volumen final de 25ul.

En el presente estudio se compararon los resultados obtenidos a través la técnica del coprocultivo vs los obtenidos con la PCR, además, de la relación de sensibilidad y especificidad. Para esto se realizó la prueba con el estándar de 300UFC los cuales dieron como resultado una sensibilidad del 81,25% y una especificidad del 73,58% (este porcentaje indica que el rango de microorganismo utilizados en el estudio no fue muy alto), demostrando con ello que esta técnica puede ser utilizada con mayor efectividad para el diagnóstico temprano de Salmonelosis en pacientes con esta patología.

A partir de las muestras cultivadas se identificó que la sensibilidad al 81,25 % y la especificidad al 70.58%, demuestran la utilidad de la PCR en la obtención de resultados más rápidos y exactos debido ya que esta técnica tiene las facultades de: poseer una especificidad alta logrando reducir el número de falsos negativos, que las muestras pueden ser obtenidas de cualquier tipo de tejidos o secreciones, que gracias a la velocidad con la que se obtienen los resultados se puede dar rápidamente el diagnóstico y, por consiguiente, el tratamiento. Además, de permitir la detección de ^P_{SEP}agentes ^P_{SEP}viables ^P_{SEP}y ^P_{SEP}no ^P_{SEP}viables.

Según el estudio realizado por José Villarreal Camacho (2008) la PCR puede amplificar muestras de ADN de *Salmonella* con apenas 2 UFC, mientras que en nuestro estudio nos da

como resultados que la PCR puede detectar a partir de 5 UFC dándonos un resultado con poca diferencia a la anteriormente mencionada.

Al ser *Salmonella* una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial es importante el desarrollo de métodos rápidos con una alta sensibilidad y especificidad para detectar contaminación por *Salmonella* ya que estudios realizados en Vitoria-Gasteiz en el 2011 dicen que la dosis para infectarse con *Salmonella* es de 10⁶ UFC aunque en pacientes con un sistema inmunológica bajo una dosis de 1 a 10 células son suficientes para causar la enfermedad.

CAPITULO 6: CONCLUSIONES

1. La PCR es una técnica con una efectividad muy elevada ya que tiene la capacidad de minimizar el tiempo de entrega de resultados con un grado alto de confianza.
2. Los resultados del estudio demostraron que la PCR, frente a las otras técnicas, posee la capacidad de dar lecturas más claras con respecto a la condición patológica del paciente.
3. La PCR demostró un porcentaje superior de sensibilidad, especificidad y límite de detección en el estándar de 300 UFC; por lo cual se decidió trabajar en el estudio con este estándar.
4. A pesar de observar que entre los tres estándares la sensibilidad y especificidad entre el Hektoen, el pre enriquecimiento y la PCR son mínimas siempre se obtuvieron mejores resultados con el estándar de 300 UFC.
5. La PCR permite obtener resultados en menor tiempo y con un alto grado de sensibilidad ya que las técnicas moleculares proporcionan una estrategia rápida y sensible para la detección de bacterias.
6. Al comparar los tres métodos como se observa en la tabla 9 podemos observar que la siembra directa nos da una sensibilidad del 84%, pero que al ser previamente sometida al preenriquecimiento nos va a dar una sensibilidad del 99% igual que la PCR.

CAPITULO 7: RECOMENDACIONES

1. Cuando se realiza un estudio es muy importante la serotipificación, y la bioquímica, pues permite determinar la prevalencia de la serovariedad en diferentes zonas geográficas para de esta manera llevar la estadística y el conocimiento de los brotes y para dar a conocer la fuente de infección y sus medios de trasmisión.
2. En el Ecuador se debería tener más seguimiento epidemiológico y estudios sobre la salmonelosis, como tratarla y como prevenirla ya que es una enfermedad muy frecuente en nuestro medio.
3. En los principales laboratorios de Quito se debería tratar de implementar la PCR como gold estándar para la detección de *Salmonella* Typhi ya que como se observó en el presente estudio esta tiene una mayor sensibilidad y especificidad en relación al coprocultivo.
4. AL ser la PCR una técnica poco usada tiene un costo muy elevado pero al tratar de implementar esta técnica en los laboratorios puede bajar los precios ya que mientras más exámenes se realice más bajos van a ser los precios.

CAPITULO 8: ANEXOS

Anexo 1.- Inserto técnica E.Z.N.A Stool para extracción de ADN en muestras fecales.

E.Z.N.A.® Stool DNA Kit Pathogen Detection Protocol

E.Z.N.A.® Stool DNA Kit Protocol - Pathogen Detection

Materials and Equipment to be Supplied by User:

- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x g
- Nuclease-free 2 mL microcentrifuge tubes
- Nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Water baths, heat blocks, or incubators capable of 65°C and 70°C
- Vortexer
- 100% ethanol
- Ice bath
- Optional: RNase A stock solution at 20 mg/mL
- Optional: Incubator capable of 95°C

Before Starting:

- Prepare ice bath
- Heat Elution Buffer to 65°C
- Set a water bath, heat block, or incubator to 70°C
- Prepare DNA Wash Buffer and VHB Buffer according to the Preparing Reagent section on Page 5
- Optional: for gram-positive bacteria set an incubator to 95°C

1. Add up to 200 mg stool sample in a 2 mL microcentrifuge tube containing 200 mg glass beads. Place the tube on ice.

Note: If the sample is liquid, add 200 µL sample into the centrifuge tube. Cut the end of the pipet tip to make pipetting easier. If the sample is frozen, use a spatula to scrape the sample into the tube. Do not thaw the frozen sample until the SLB Buffer is added into the tube.

2. Add 540 µL SLB Buffer. Vortex at maximum speed for 10 minutes or until the stool sample is thoroughly homogenized.

Note: We recommend a mechanical disruptor instrument such as the SPEX Geno/Grinder 2010 or a flat bed vortexer with tape.

3. Add 60 µL DS Buffer and 20 µL Proteinase K Solution. Vortex or pipet up and down to mix thoroughly.

E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit Pathogen Detection Protocol

4. Incubate at 70°C for 10 minutes (13 minutes if frozen). Vortex the sample twice during incubation.

Optional: For isolation of DNA from gram-positive bacteria, do a second incubation at 95°C for 5 minutes. Continue to Step 5.

5. Add 200 µL SP2 Buffer. Vortex at maximum speed for 30 seconds.
6. Let sit on ice for 5 minutes.
7. Centrifuge at full speed ($\geq 13,000 \times g$) for 5 minutes.
8. Carefully aspirate 400 µL supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not supplied). Do not disturb the pellet or transfer any debris.
9. Add 200 µL HTR Reagent. Vortex at maximum speed for 10 seconds.

Note: HTR Reagent must be thoroughly resuspended before use. Cut the end of a 1 mL tip to make it easier to pipet the HTR Reagent.

10. Let sit at room temperature for 2 minutes.
11. Centrifuge at maximum speed for 2 minutes.
12. Transfer 250 µL supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

Optional: If RNA-free DNA is required, add 10 µL RNase A (not included). Vortex to mix thoroughly. Incubate at 37°C for 3 minutes. Continue to Step 13.

13. Add 250 µL BL Buffer and 250 µL 100% ethanol. Vortex at maximum speed for 10 seconds.

E.Z.N.A.® Stool DNA Kit Pathogen Detection Protocol

14. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.
15. Transfer the entire sample from Step 13, including any precipitates that may have formed, to the HiBind® DNA Mini Column.
16. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
17. Discard the filtrate and the collection tube.
18. Transfer the HiBind® DNA Mini Column into a new 2 mL Collection Tube.
19. Add 500 µL VHB Buffer.

Note: VHB Buffer must be diluted with ethanol before use. Please see the Preparing Reagents section on Page 5 for instructions.
20. Centrifuge at maximum speed for 30 seconds.
21. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
22. Add 700 µL DNA Wash Buffer.

Note: DNA Wash Buffer must be diluted with ethanol before use. Please see the Preparing Reagents section on Page 5 for instructions.
23. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
24. Discard the filtrate and reuse collection tube.
25. Repeat Steps 22-24 for a second DNA Wash Buffer wash step.

E.Z.N.A.® Stool DNA Kit Pathogen Detection Protocol

26. Centrifuge at maximum speed for 2 minutes to dry the column.

Note: It is important to dry the column membrane before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.

27. Transfer the column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

28. Add 100-200 μL Elution Buffer heated to 65°C directly to the center of the HiBind® matrix.

29. Let sit at room temperature for 2 minutes.

30. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

31. Store DNA at -20°C.

Note: For maximum PCR robustness, it is recommended to add BSA to a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ to the PCR reaction mixture. Hot-start PCR is also recommended to increase the specificity. Try to use the minimal amount of elute possible for downstream applications.

Anexo 2.- Inserto para la preparación de Caldo de enriquecimiento tetrionato.

038290 210430 8

Base de caldo de tetrionato

Base para medio de enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella*

Instrucciones: Suspénda 4,6 g del polvo en 100 mL de agua purificada y caliente la mezcla hasta llevarla a ebullición. Enfríe la mezcla por debajo de 60 °C. Añada 2 mL de solución de yodo (6,0 g de cristales de yodo y 5,0 g de yoduro potásico en 20,0 mL de agua). NO VUELVA A CALENTAR EL MEDIO DESPUÉS DE AÑADIR YODO. NO AUTOCLAVE. Utilice la mezcla inmediatamente. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Fórmula aproximada* por litro

Peptona de proteosa	2,5 g
Digerido pancreático de caseína	2,5 g

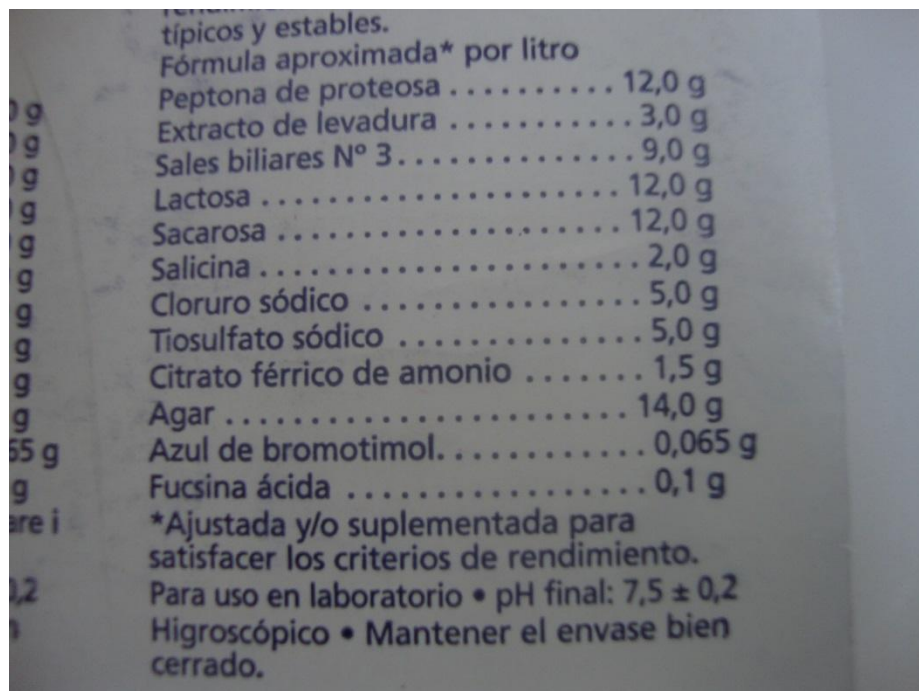
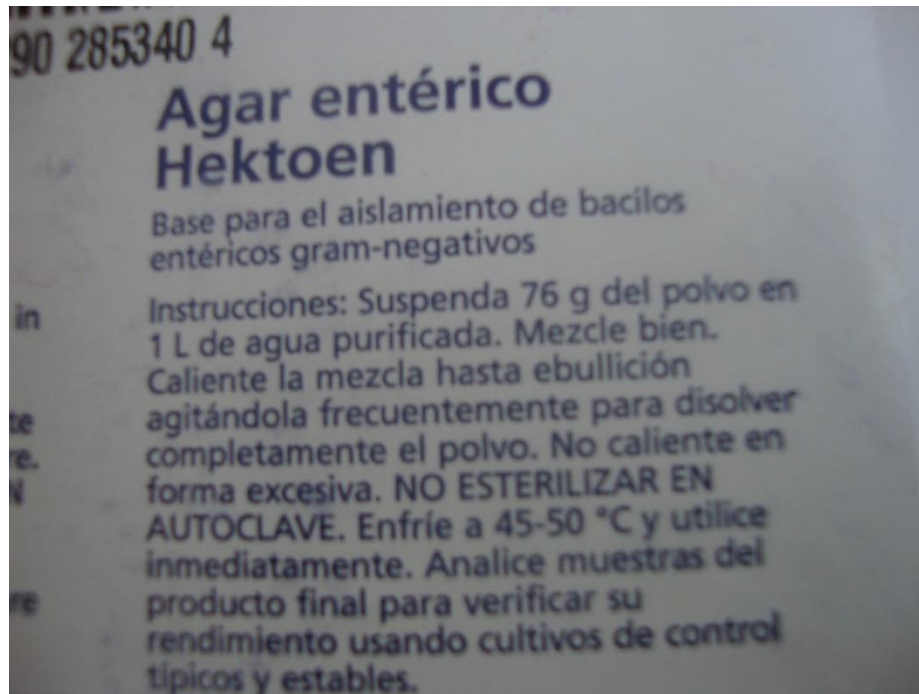
100 mL de agua purificada y caliente la mezcla hasta llevarla a ebullición. Enfríe la mezcla por debajo de 60 °C. Añada 2 mL de solución de yodo (6,0 g de cristales de yodo y 5,0 g de yoduro potásico en 20,0 mL de agua). NO VUELVA A CALENTAR EL MEDIO DESPUÉS DE AÑADIR YODO. NO AUTOCLAVE. Utilice la mezcla inmediatamente. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Fórmula aproximada* por litro

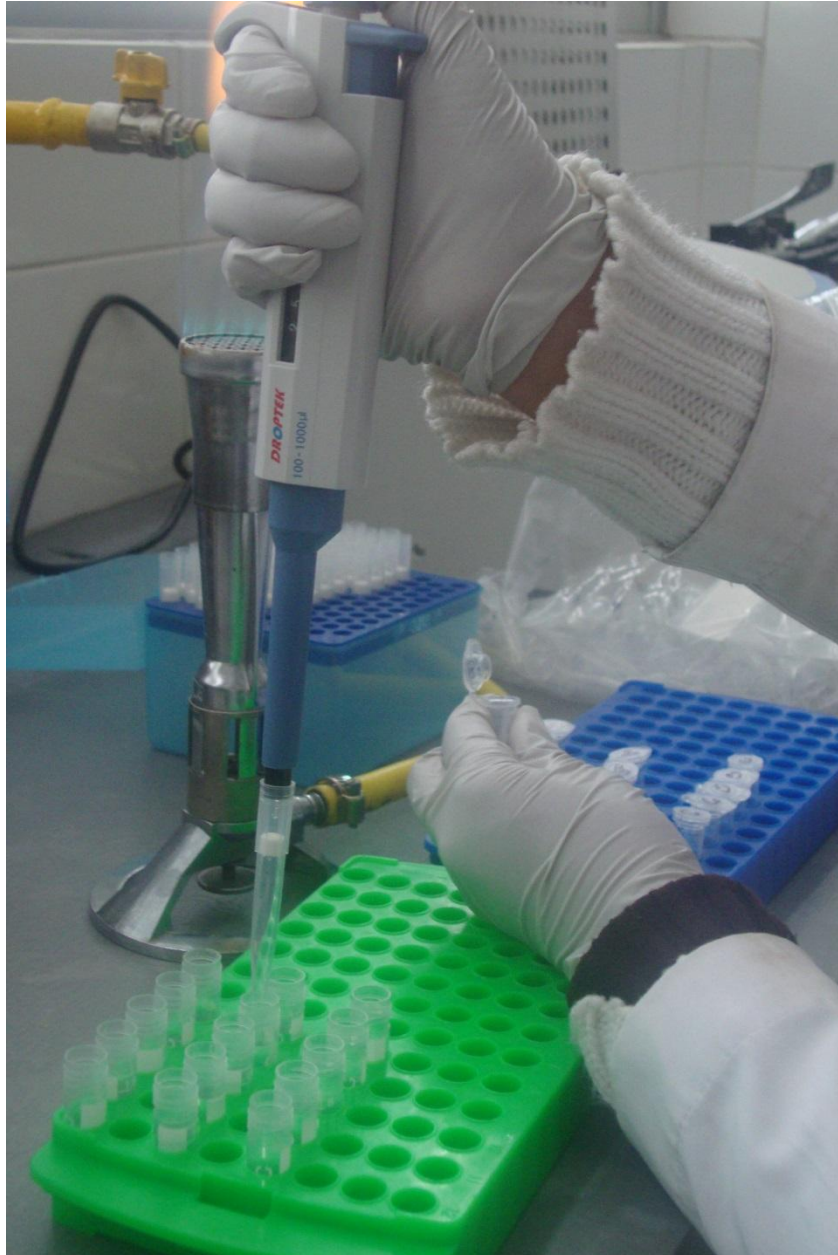
Peptona de proteosa	2,5 g
Digerido pancreático de caseína	2,5 g
Bilis de buey	1,0 g
Tiosulfato sódico	30,0 g
Carbonato cálcico	10,0 g

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.
 Para uso en laboratorio • pH final: 8,4 ± 0,2
 Higroscópico • Mantener el envase bien cerrado.

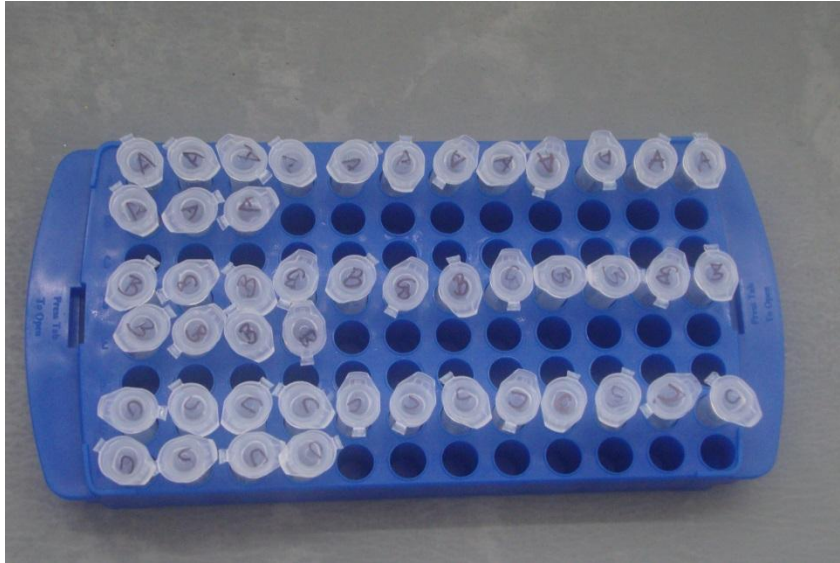
Anexo 3.- Inserto para la preparación del Agar Entérico Hektoen



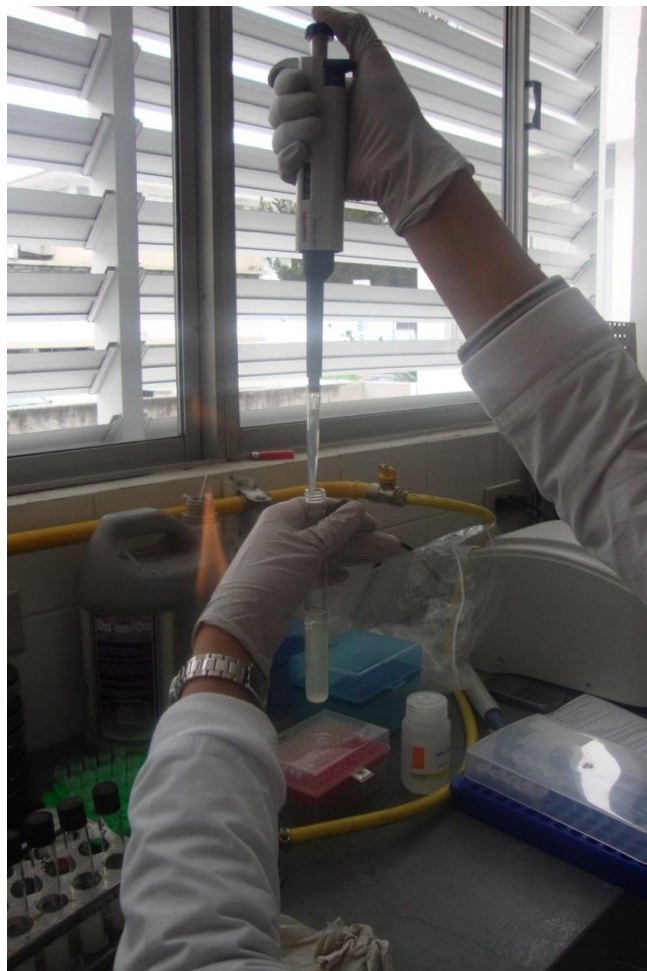
Anexo 4.- Metodología del estudio:



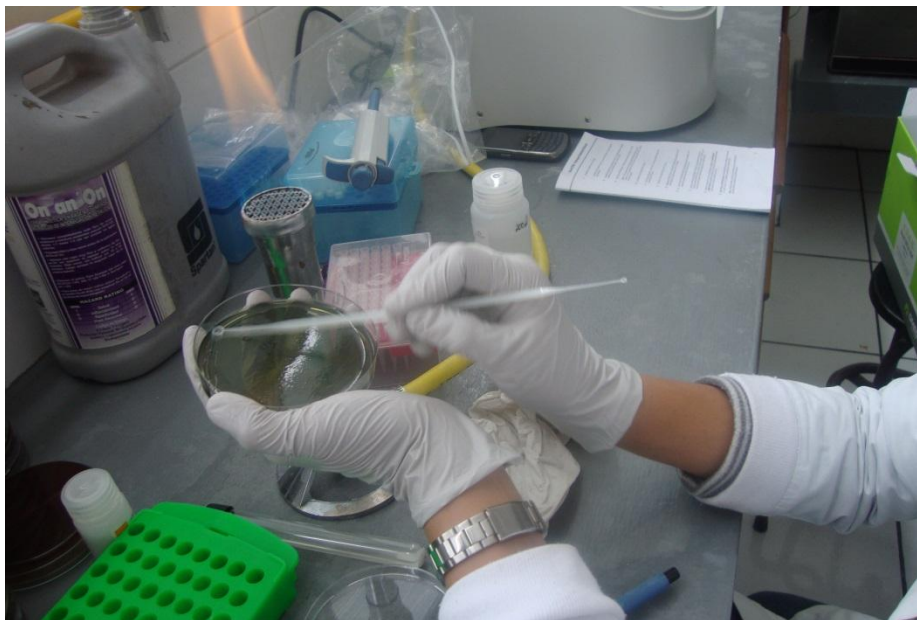
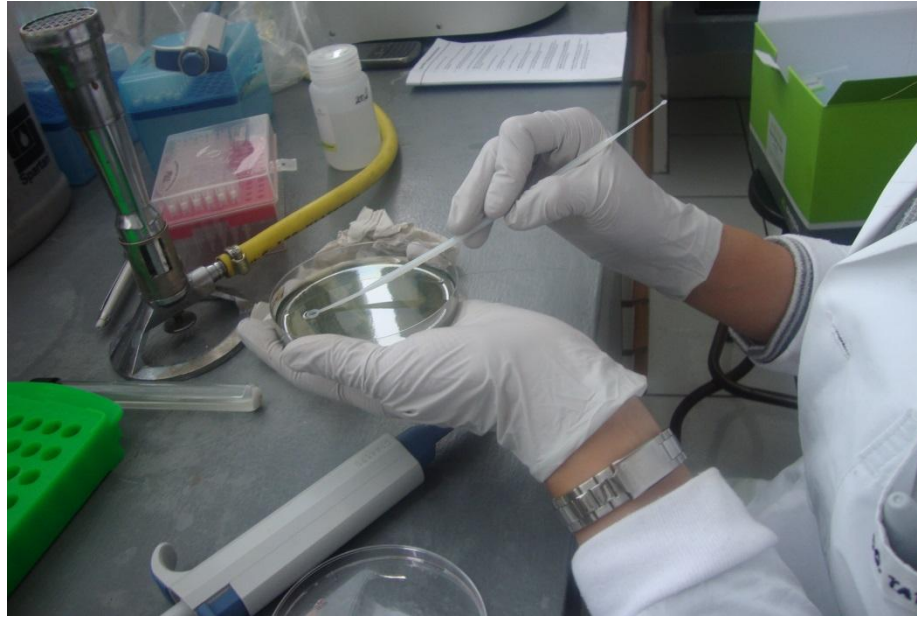
Fotografía 1.- Preparación de estándares



Fotografía 2.- Estándares preparados

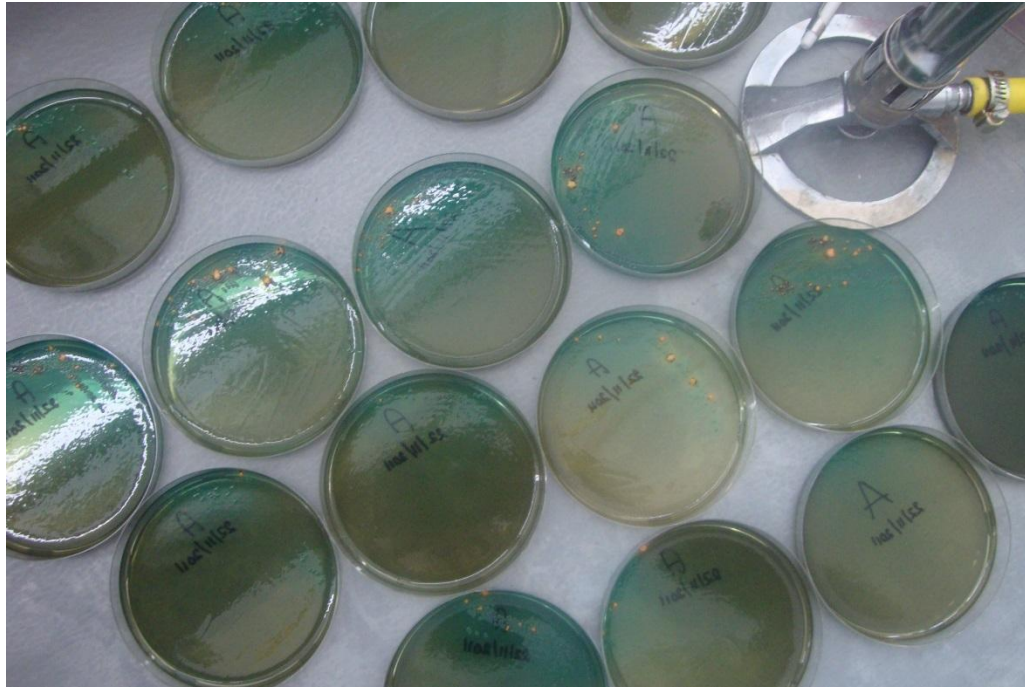


Fotografía 3.- Siembra en caldo tetracionato.

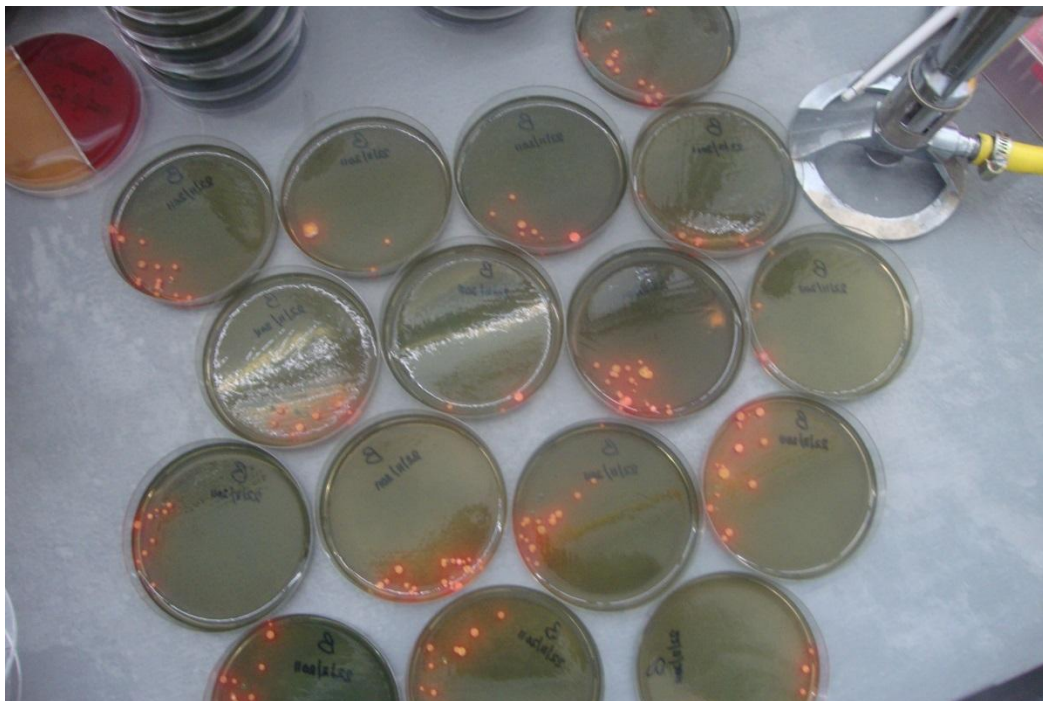


Fotografía 4.- Siembra de bacterias en Agar Hektoen.

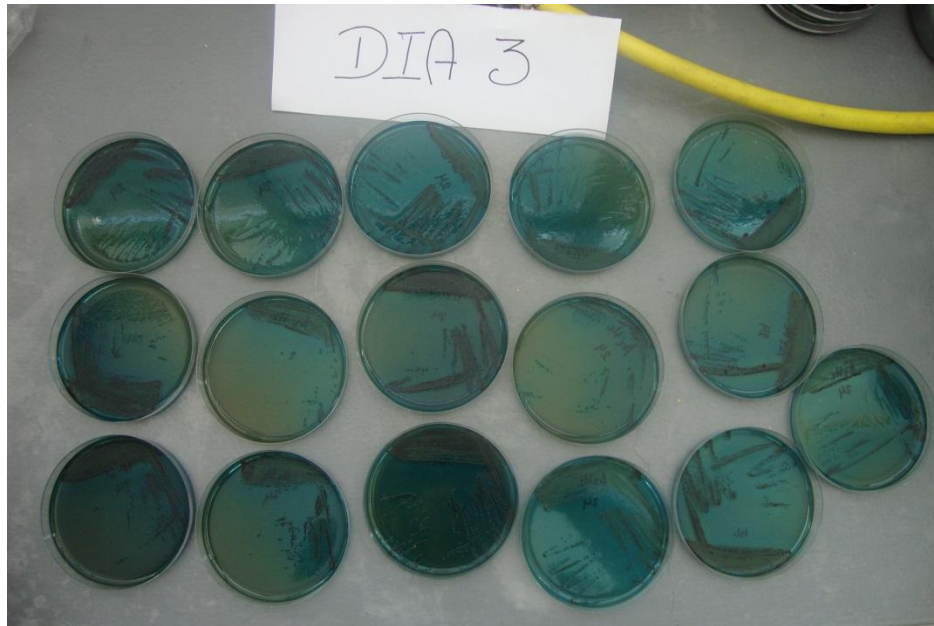
Anexo 5.- Resultados del coprocultivo:



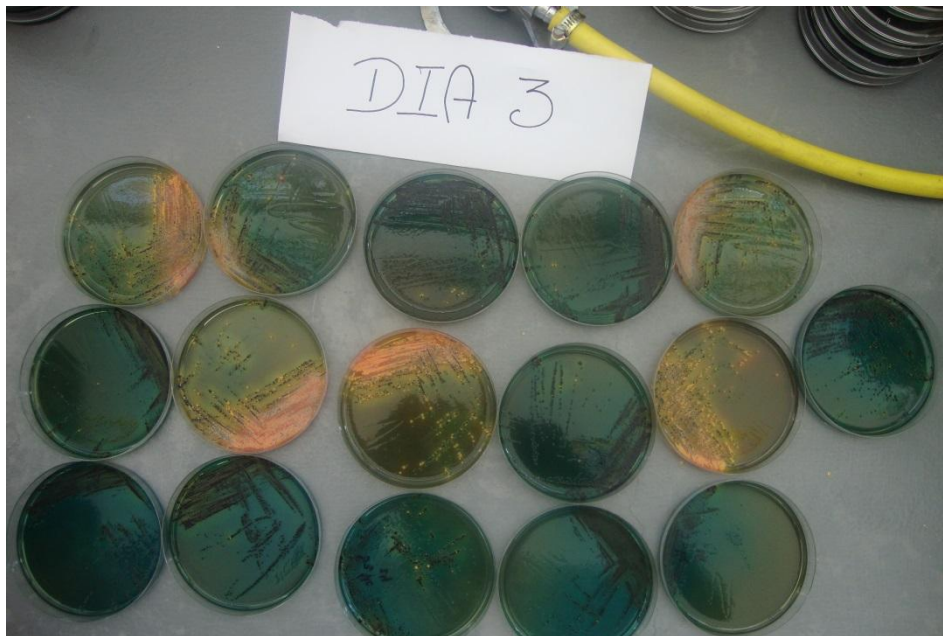
Fotografía 5.- Cajas del Estándar A: 50 UFC sin previo enriquecimiento.



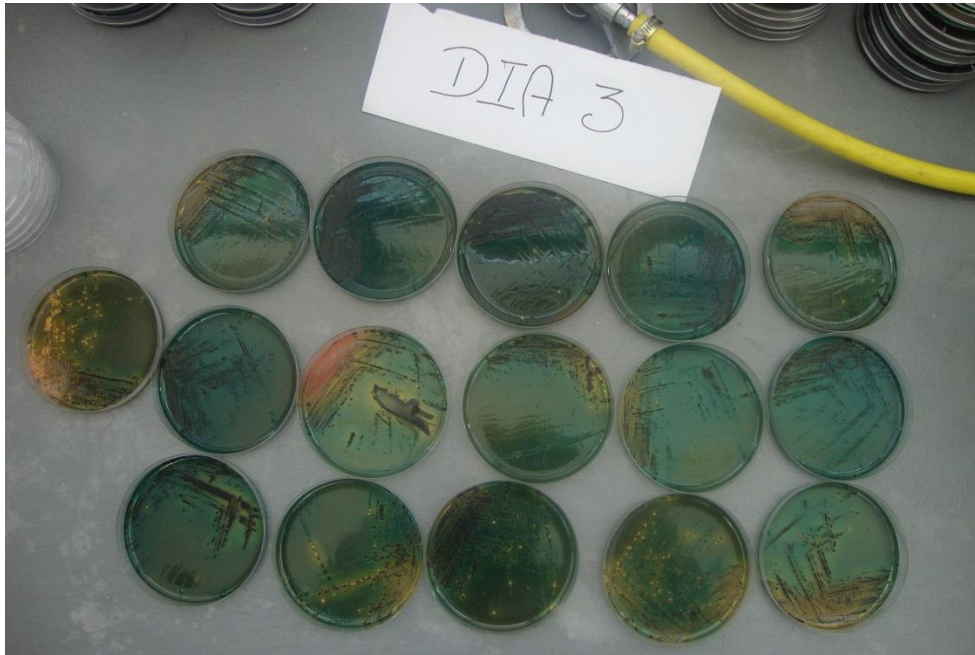
Fotografía 6.- Cajas del Estándar B: 150 UFC sin previo enriquecimiento.



Fotografía 7.- Cajas estándar A previo enriquecimiento



Fotografía 8: Cajas estándar B previo enriquecimiento



Fotografía 9.- Cajas Estándar C previo enriquecimiento

Anexo 6.- Resultados coprocultivo para cálculo sensibilidad

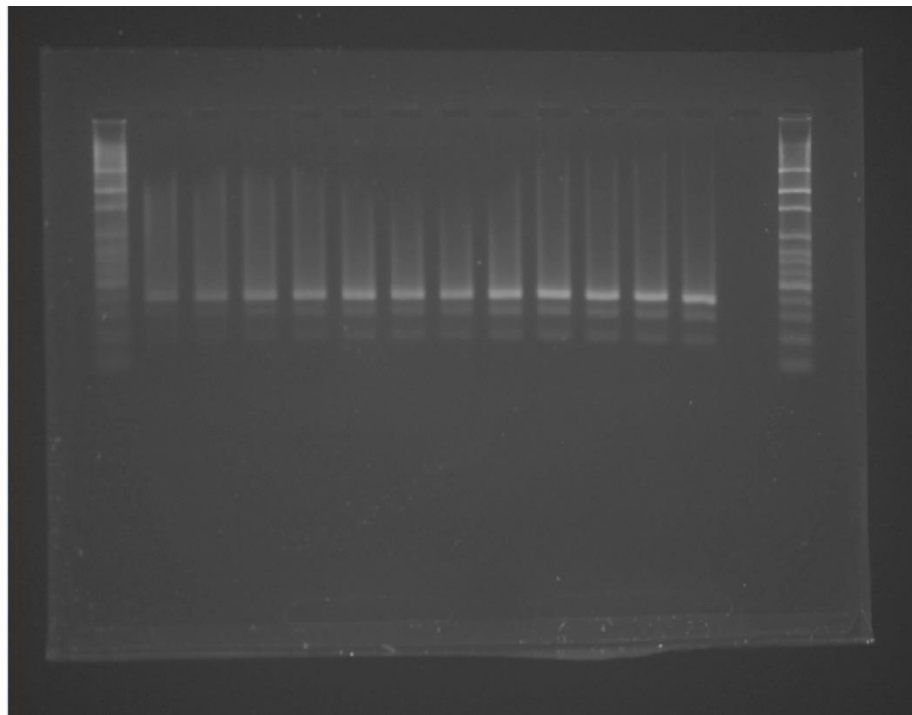


Fotografía 10- Cajas bi Petri sembradas con un control negativo (*E. coli*) y la bacteria en estudio (*Salmonella Typhi*)

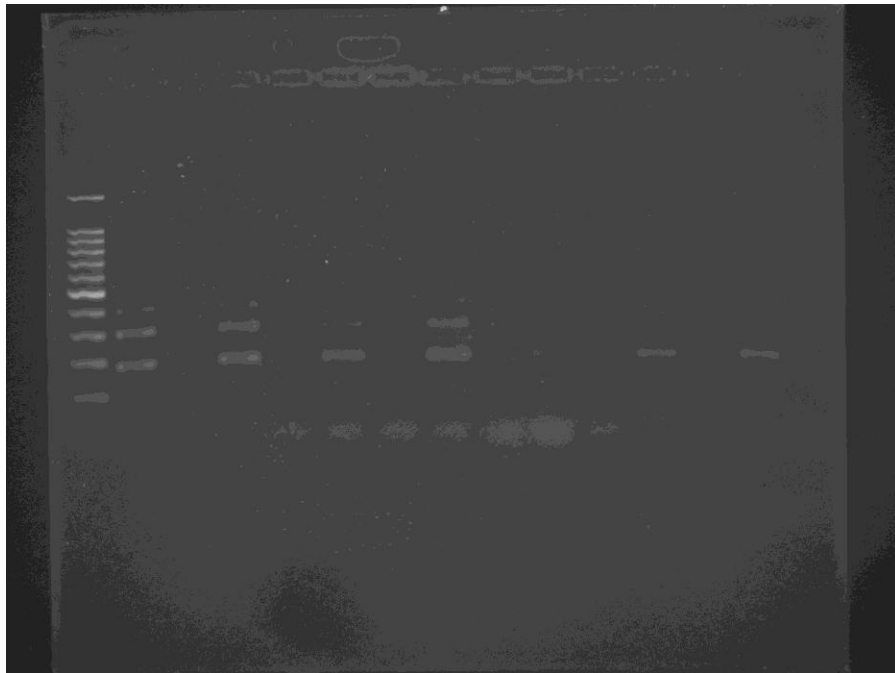
Anexo 7.- Siembra en TSI para confirmar colonias de *Salmonella* Typhi



Anexo 8: Resultados PCR para límites de detección:



Anexo 9: Resultados PCR con control negativo (*E. coli*) y colonia de *Salmonella* Typhi.



CAPITULO 9 BIBLIOGRAFIA:

- Ajello, Gloria MS. Boop Cheryl S, Elliot John, PhD, Facklam Richard PhD, Joan S. Knapp, PhD, Joy Wells, MS, Scott F. Dowell (2003). Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s16330s/s16330s.pdf>
- Bellver, P., García, M. (2000). Epidemiología de la salmonelosis no tifoidea en un hospital de Pontevedra (1994-1997). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(3),125-32. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es/revistas/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/epidemiologia-salmonelosis-no-tifoidea-un-hospital-pontevedra-9758-originales-2000>
- Caffer, M., Terragno, R. (2001). *Manual de procedimientos para la caracterización de salmonella*. Buenos Aires: Instituto nacional de enfermedades infecciosas Departamento Bacteriología Servicio Enterobacterias.
- Carbó Malonda, R., Miralles Espí, M., Sanz Bou, R., Mañas Gimeno, F., Guiral Rodrigo; S. & Pérez Pérez, E. (2005). Brote de toxiinfección alimentaria por salmonella entérica en un establecimiento de restauración colectiva; *Revista Especializada de Salud Pública*, 79, 47-57. Recuperado de: <http://www.scielosp.org/pdf/resp/v79n1/original3.pdf>
- Chávez-de la Peña, M., Higuera-Iglesias, A., Huertas-Jiménez, M., Báez-Martínez R, Morales-de León, J., Arteaga-Cabello, F., Rangel-Frausto, M. & Ponce de León-Rosales, S. (2001). Brote por Salmonella enteritidis en trabajadores de un hospital; *Salud pública de México*, 43(3). Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342001000300006&script=sci_arttext&tlng=es
- Conde Chipana, M. (2004). *Caracterización epidemiológica de las EDAs causadas por: Salmonella spp. y Shigella spp. en niños de 6 meses a 5 años de edad en el Hospital Boliviano*

Holandes de agosto a noviembre de 2004. Implementacion de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Diagnostico Directo de Salmonella spp. y Shigella spp. (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Conde M., Revollo S. & Espada A. (2006). Implementación de la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Diagnostico de Salmonella y Shigella directamente de muestras fecales. *BIOFARBO*, 14. 67-75.

Diccionario Medico. (2011). Recuperado de:

http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Serotipo.

Flores Aguilar, L. (2003). Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de Salmonella choleraesuis aisladas en ambientes marinos. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores_al/Antec.pdf

Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez P. & González-Andrade MC. (2000). Salmonella serotypes isolated in Mexico's health services. *Salud pública de México*, 42(6), 490-495. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342000000600004>

Gutiérrez-Castillo Adriana del Carmen, Henri- Paasch Martínez Leopoldo & Calderón- Apodaca

Norma Leticia, (2007). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. Departamento de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Recuperado: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0301-50922008000100007&script=sci_arttext&tlng=pt

Irigoyen, H., De Zamora, L. (2004). Manual de calidad: Instrucciones para coprocultivo. Recuperado de: <http://www.lebbyac.com/manual/instrucciones/copro.htm>

Martínez ballesteros Ilargi (2011). Tesis doctoral desarrollo de métodos de detección de salmonella basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias. *Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitateko Zerbitzua*. Recuperado de:

http://www.ehu.es/argitalpenak/images/stories/tesis/Ciencias_de_la_Vida/Tesis%20Doctora%20Ilargi%20Mart%C3%ADnez.pdf

Méndez-Álvarez, S., & Pérez-Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica*, 22(3), 183-92. Recuperado de: http://external.elsevier.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/espacioformacion.PKG_eimc.show_login?p_idcurso=2

Mediclopedia. (2008). Recuperado de <http://diccionario.mediclopedia.com/l/lisotipo/>:

Merino, Luis A. Hreñuk, Gabriela E. Alonso, José M. Ronconi, María C. (2000). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000 Dotación plasmídica y bacteriocinotipo en *Shigella* spp. Instituto de Medicina Regional UNNE. Chaco Argentina. Recuperado de: http://www1.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_015.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2008). *Guías para la calidad del agua potable. Hoja de información microbiológica*. (3ra ed.). Recuperado de: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_11.pdf

Pachon Cubillos, D. (2009). *Aislamiento e identificación de Enterobacterias del genero Salmonella en una población de Crocodylus intermedius y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Parada Ricart, E., Inoriza Belurze, J. & Plaja Roman, P. (2007). Gastroenteritis aguda: coste de una causa de ingreso potencialmente evitable. *Anales de Pediatría*, 67(4), 368-373. Recuperado de: http://www.doyma.es/revistas/ctl_servlet?_f=7064&ip=66.249.71.67&articuloid=13110610

Quintaes, B., Leal, N., Reis, E., Fonseca, E., & Hofer, E. (2002). Conventional and Molecular Typing of *Salmonella* Typhi strains from Brazil. *Revista del Instituto de Medicina de Sao Paulo*, 44(6), 315-319. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000600004>

- Romero Saltos, C., Ramirez Figueroa, J. (2001). *Análisis Estadístico Multivariante de las Principales Enfermedades Gastroentéricas en el Cantón Guayaquil*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Rubira, N., Rueda, J. (2009). *Salmonelosis y fiebre tifoidea*. Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/39119179/Fiebre-Tifoidea-Primera-Partee>
- Saravia, J. (2007). *Guías de actuación en urgencias y emergencias: Salmonelosis*. Recuperado de: <http://www.aibarra.org/Guias/7-25.htm>
- Satz, L., Kornblihtt, R. (1993). La reacción en cadena de las polimerasas. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*, 4(23). Recuperado de: <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm>
- Urrutia, M., Reyes, E., Melo, C., Henríquez, M., Pineda, J. & Sakurada A. (2006). Estandarización de una Técnica para la Detección de Salmonella spp. útil para Manipuladores de Alimentos Mediante Técnica de Amplificación Molecular. *Revista ciencia y trabajo*, 8(22). 164-166
- Vásquez Cedeño, Elizabeth. (2003). Técnica para la detección de Salmonella Rápida y en tiempo real. *Revista Avicultores*, 103. Recuperada de: <http://encolombia.com/veterinaria/Avicultores103/Separata2.htm>
- Villarreal Camacho, J., Soto Varela Z., Pereira San Andrés, N., Varela Prieto, L., Jaramillo Lancho, R., Villanueva Torregroza, D. & Mendoza Torres, E. (2008). Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Salmonella sp. en leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte*. 24 (2): 216-225. Recuperado de: http://ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/salud_uninorte/24-2/6_Reaccion%20encadena.pdf
- Yáñez, E., Máttar, S. & Durango A. (2008). Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Revista Infectio*, 12(4), 246-254. Recuperado de: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0123-93922008000400003&script=sci_arttext&tlng=pt