

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL, PARA LA DETERMINACIÓN
DE *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium A PARTIR DE MUESTRAS DE HUEVO COMERCIAL
Y GRANJA, CON EL USO DE UN KIT COMERCIAL

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Jhoselyn Lorena López Florián
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2018

IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL, PARA LA DETERMINACIÓN DE *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium A PARTIR DE MUESTRAS DE HUEVO COMERCIAL Y GRANJA, CON EL USO DE UN KIT COMERCIAL

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

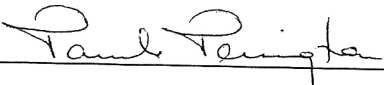


IMPLEMENTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL, PARA LA DETERMINACIÓN
DE *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium A PARTIR DE MUESTRAS DE HUEVO COMERCIAL Y
GRANJA, CON EL USO DE UN KIT COMERCIAL

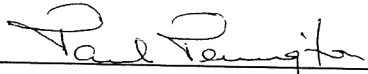
Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Jhoselyn Lorena López Florián
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

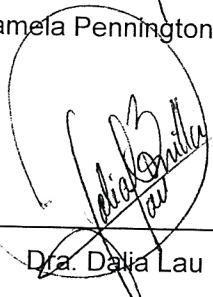
Guatemala
2018

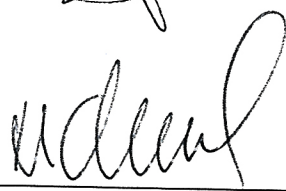
Vo. Bo.

(f) 
Dra. Pamela Pennington (Asesor)

Tribunal Examinador:

(f) 
Dra. Pamela Pennington (Asesor)

(f) 
Dra. Dalia Lau

(f) 
Dra. Marializ Gramajo

Fecha de aprobación: Guatemala 15 de febrero del 2018

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	3
III. OBJETIVOS.....	4
A. OBJETIVO GENERAL	4
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
IV. HIPÓTESIS.....	5
V. JUSTIFICACIÓN	6
VI. MARCO TEÓRICO.....	7
A. MINISTERIO DE AGRICULTURA GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN	7
B. COGUANOR	7
C. HUEVO	7
D. PRODUCCIÓN DE HUEVO EN INDUSTRIA	9
E. <i>SALMONELLA SPP.</i>	10
F. PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA SPP.</i>	16
VII. METODOLOGÍA.....	20
A. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	20

VIII.	RESULTADOS	24
IX.	DISCUSIÓN.....	29
X.	CONCLUSIÓN.....	32
XI.	RECOMENDACIONES	33
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Partes del huevo. Corte transversal.....	8
Figura 2: Esquema de proceso de comercialización de huevo y ovoproductos.....	10
Figura 3: Esquema de nomenclatura utilizada para <i>Salmonella</i> spp.....	11
Figura 4: Modelo de patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp.....	13
Figura 5: Características y métodos de detección asociado a islas de patogenicidad (PAIS, por sus siglas en inglés).....	14
Figura 6: Genes implicados en la patogenicidad de <i>Salmonella</i>	15
Figura 7: Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	18
Figura 8: Interpretación de resultados de qPCR.....	23
Figura 9: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control interno positivo y <i>S. Typhimrium</i> inoculado en huevos comerciales.....	26
Figura 10: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control interno positivo y <i>S. Typhimrium</i> inoculado en huevos de granja.....	27
Figura 11: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control positivo externo.....	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Producción de huevo en el año 2012.....	9
Cuadro 2: Tiempos y temperaturas de incubación para <i>Salmonella</i> en diferentes agares.....	17
Cuadro 3: Resultados de <i>Salmonella</i> en agar HE	21
Cuadro 4: Resultados en agar TSI y LIA	21
Cuadro 5: UFC/ml de diluciones seriadas de <i>S. Typhimurium</i>	24
Cuadro 6: Resultados de qpcr de inoculación artificial en huevo con <i>Salmonella</i> Typhimurium a diferentes concentraciones, en huevos comercial y huevos de granja	25
Cuadro 7: Resultados estadísticos para comparar datos de detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium entre huevos comerciales y de granja.....	28

RESUMEN

Salmonella spp. es un bacilo Gram negativo facultativo, el cual ha sido de gran incidencia en América Latina, Asia y África. En donde se han reportado de 200 a 500 casos de salmonelosis por 100,000 habitantes por año. Siendo las aves de corral, el producto con mayor contaminación.

Debido al alto consumo de productos de ave de corral, muchos entes tales como lo son el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA), buscan detectar el patógeno antes de que los productos sean comercializados. El análisis para dicho patógeno se puede realizar por medio de pruebas rápidas, tal y como lo hace el MAGA, por aislamiento e identificación de género por pruebas bioquímicas y métodos fenotípicos o por técnicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Siendo la última un método eficiente, permitiendo tener una detección rápida y alta sensibilidad para detección de patógenos.

Es por ello que el objetivo de este estudio, es determinar la presencia de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en huevo por medio del método molecular Bax system. El cual permite que el procesamiento de muestras para un PCR se pueda realizar en un menor tiempo.

I. INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA), es un ente encargado de obtener un desarrollo rural integral del uso equitativo de producción y uso sostenible de recursos ambientales, para mejorar calidad de vida, seguridad y soberanía alimentaria. Por lo tanto, es encargada de análisis de alimentos que pueden repercutir en la salud del consumidor. Entre estos análisis se puede mencionar es la determinación de *Salmonella* en huevo. El MAGA, hace uso de pruebas rápidas para la detección de este microorganismo, tal como lo son las placas 3M® Petrifilm™ (Mauricio 2017). Uno de los métodos utilizados por laboratorios, el aislamiento e identificación de género por pruebas bioquímicas y métodos fenotípicos. A pesar de ello, muchas veces no se logra obtener un resultado positivo, siendo este un procedimiento muy ambiguo. Debido al tiempo requerido para obtener resultados, precisión en concentración de inóculo, precisión en incubación y lectura (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011). Con lo cual muchas veces se podría llegar a confundir con otro tipo de microorganismo.

Uno de los mayores problemas que ha impedido la detección de *Salmonella* en huevo por métodos de aislamiento, es el uso de antibióticos por parte de las industrias. Muchas veces puede ser detectada si el mal uso de antibióticos lleva a una multirresistencia microbiana, permitiendo así el crecimiento de *Salmonella* en el producto alimentario. Debido a ello muchas empresas han optado por el uso de técnicas tales como la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Debido a que es un método eficiente, que permite una detección rápida y una alta sensibilidad para la detección de patógenos, tales como *Salmonella*.

El objetivo de este estudio es, la determinación de la presencia de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en huevo por medio del método molecular BAX® system. Este método molecular permite que el proceso de un PCR se pueda realizar en menos tiempo. El kit contiene tabletas que incluyen todos los reactivos necesarios para obtener los resultados. Por otro lado, también puede mencionarse que los resultados se pueden analizar de una forma sencilla y clara, la cual no necesita un análisis exhaustivo.

Para cumplir dicho objetivo, se obtendrán muestras de huevo de supermercado y de granja. A dichas muestras se les realizará un análisis para tener resultados de presencia/ausencia de *Salmonella*. Esto se hace debido a que las muestras con resultado negativo, contaminarán artificialmente con *Salmonella* Typhimurium. Se pasará a la preparación de la muestra, enriqueciéndola con agua peptonada bufferada (por sus siglas en inglés: *BPW*). Luego de ello se realizará una lisis y finalmente se procederá a el proceso de PCR, para la obtención de resultados. A partir de ello se espera obtener resultados positivos indicando presencia de *Salmonella* en huevo

y así estandarizar y optimizar el proceso de extracción y concentración óptima de *Salmonella* en huevo para su determinación.

II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- A. ¿Se tiene un proceso óptimo que facilite la obtención de muestra y detección de *Salmonella* en huevo?
- B. ¿El método qPCR permite de la detección de *Salmonella* en huevo?
- C. ¿Cuál es la concentración óptima para una exitosa amplificación?
- D. ¿Qué cantidad de muestra debo tomar para que el método sea sensible y específico?
- E. ¿Existe alguna diferencia significativa en la detección de *Salmonella* en huevos comerciales y huevos frescos de granja?

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinación de la presencia de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en huevo por medio del método molecular BAX® system.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Crear un protocolo de obtención de muestra y detección de *Salmonella*.
2. Optimizar el proceso de extracción de ADN y determinar la concentración óptima de *Salmonella* en huevo para su posterior amplificación.
3. Identificar la presencia de *Salmonella* en huevo a partir de la técnica PCR en tiempo real
4. Analizar la sensibilidad necesaria para toma de muestra.
5. Comparar el crecimiento de *Salmonella* en huevos industriales y de patio.

IV. HIPÓTESIS

A. Hipótesis nula:

No existe diferencia significativa en la detección de *Salmonella* Typhimurium entre huevos industriales y de patio, con un nivel de confianza del 95%.

B. Hipótesis alternativa:

Existe diferencia significativa en la detección de *Salmonella* Typhimurium entre huevos industriales y de patio, con un nivel de confianza del 95%.

V. JUSTIFICACIÓN

En América Latina, Asia y África se ha reportado 200 a 500 casos por 100,000 habitantes por año de salmonelosis. Siendo la razón más frecuente la ingesta de alimentos contaminados, ya que se considera que la transmisión de *Salmonella* spp es poco común de persona en persona (Quesada et al., 2016). En donde las personas mayormente afectadas son: los menores a 5 años y mayores de 60 años (Palmer & Slauch, 2017).

El producto con mayor incidencia por contaminación de *Salmonella*, son las aves de corral. En donde los agentes principales de contaminación son *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y Enteritidis (Whiley & Ross, 2015).

A partir del problema de la presencia del microorganismo en alimentos, la industria optó por el uso de antibióticos para disminuir los casos de salmonelosis. Siendo este un problema posteriormente, debido a que su mal uso llevó a multirresistencia microbiana (Cota-Rubio, Hurtado-Ayala, Pérez-Morales, & Alcántara-Jurado, 2000). Siendo este un punto de análisis importante para la industria alimentaria, ya que radica en pérdidas económicas y en la salud del consumidor.

Un método utilizado para la detección de *Salmonella* spp en huevo, es el aislamiento e identificación del género. Debido a su poca eficiencia para ser detectado, este método no es suficiente para determinar la presencia del microorganismo. Es por ello que el uso de técnicas tales como la reacción de cadena de polimerasa (PCR), es una nueva opción para la detección de *Salmonella* spp. Puesto que es eficiente y sensible y provee un mejor análisis de muestra comparado con un método tradicional (Rivera Calderón et al., 2012).

Por dadas razones, el kit comercial BAX[®] system, implementa esta técnica para lograr la detección de manera eficiente de patógenos tales como *Salmonella*. Haciendo uso de fragmentos de ADN específicos del organismo y permitiendo que las muestras se procesen en un menor tiempo del que tomaría realizar un análisis microbiológico (Dupont, 2015).

VI. MARCO TEÓRICO

A. MINISTERIO DE AGRICULTURA GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN

El Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA), es un Instituto perteneciente al Estado el cual promueve la transformación y modernización del sector agropecuario, forestal e hidrobiológico. “Ello con el objetivo de obtener un desarrollo rural integral del uso equitativo de producción y uso sostenible de recursos ambientales, para mejorar calidad de vida, seguridad y soberanía alimentaria” (MAGA, 2017).

Además de ello se puede mencionar su función en el desarrollo de mecanismos que contribuyan con la seguridad alimentaria de la población. Así como ampliar los mecanismos de disponibilidad de información que permita a los productores, comercializadores y consumidores, mejorar de manera estratégica (MAGA, 2017).

B. COGUANOR

COGUANOR es la Comisión Guatemalteca de Normas, siendo este el Organismo Judicial de Normalización. Fue creado por el Decreto No. 1523 el 5 de mayo de 1962, adscrita al Ministerio de Economía, lo cual se ratifica con el Decreto No 78-2005 (COGUANOR, 2017).

Este tiene como objetivo el brindar soporte técnico a sectores públicos y privados por medio de la normalización (COGUANOR, 2013). El soporte brindado lo realizan a través de normas técnicas, las cuales se definen como documentos establecidos por consensos los cuales contienen reglas, directrices o características específicas para actividades o resultados esperados (MINECO, 2017).

C. HUEVO

El huevo es uno de los alimentos mayormente consumido por el hombre debido a sus beneficios nutricionales. Lo cual ha hecho que su posición en la economía y producción sea de gran importancia. Su estructura está diseñada principalmente para la protección del embrión. Dado que el contenido dentro de él es muy rico en nutrientes, por lo que la contaminación por microorganismos es mayormente probable (Salas *et al.*, 2014).

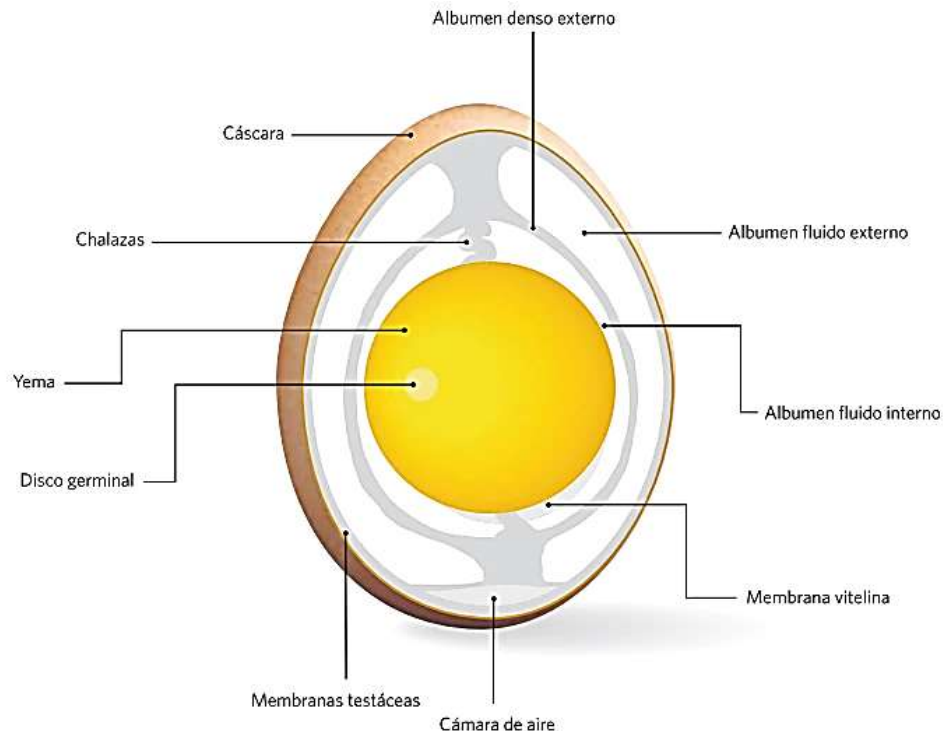
El huevo está constituido en un 30% de su peso por la yema, 60% por la clara y 10% de cáscara. Encontrándose mayormente en la yema vitaminas hidrosolubles y algunos minerales; a diferencia de la clara en donde se concentra un 11% proteínas y un 88% de agua (Carbajal, 2006).

El peso de un huevo se encuentra aproximadamente en 60 g. En la Figura 1 se puede observar un corte transversal del huevo y sus partes. En donde la cáscara le sirve como una cubierta manteniendo la integridad física. Este se encuentra mayormente compuesto de calcio, pero también se puede encontrar minerales tales como: sodio, magnesio, cinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. Tiempo después de la puesta del huevo, debido al cambio de temperatura se separan las membranas de la cáscara, formando así la cámara de aire (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

Además de ello se puede observar la clara o albumen. El cual se divide en albumen denso y fluido. El primero es el que se encuentra rodeando la yema, siendo este importante puesto que es la principal fuente de riboflavina y proteína. En cuanto al albumen fluido, se encuentra más próximo a la cáscara. El albumen también cuenta con una parte llamada chelaza, la cual es de ayuda para sujetar la yema (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

Por último se puede mencionar la yema, la cual es la parte central del huevo. Se encuentra rodeada por una membrana vitelina, la cual permite la separación entre la yema y clara.

Figura 1: Partes del huevo. Corte transversal



D. PRODUCCIÓN DE HUEVO EN INDUSTRIA

Para el año 2012, se tiene reportado que hubo una producción de huevos de 66.4 millones de toneladas en todo el mundo. En el Cuadro 1 se puede observar cinco países que son parte del 57.8% de la producción de huevos en el mundo (Zaheer, 2015).

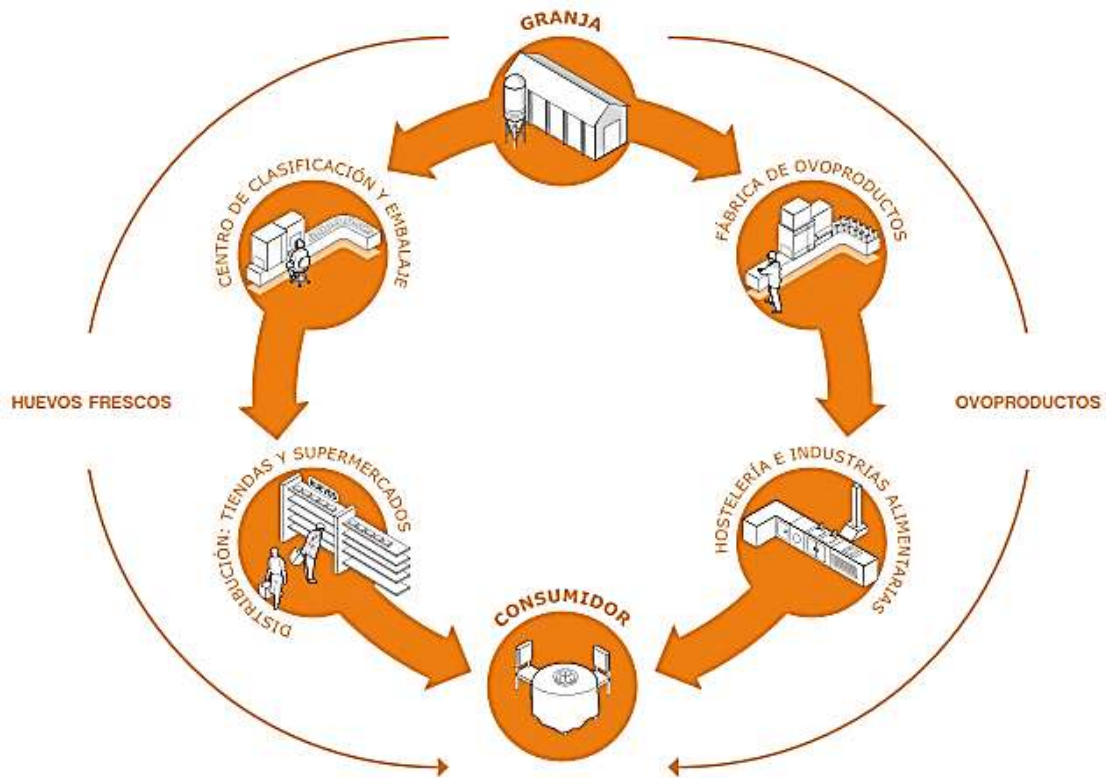
Cuadro 1: Producción de huevo en el año 2012

Country	Egg production (tonne) ^b	World total (%) ^c
China, mainland	24,500,000	36.9
United States	5,435,168	8.2
India	3,600,000	5.4
Japan	2,506,768	3.8
Mexico	2,318,261	3.5

Los datos observados con anterioridad en el Cuadro 1, han aumentado anualmente 2.3% de forma global desde el año 2000 al 2010 (Zaheer, 2015).

Esta producción masiva de huevo, se inicia en granjas. Los huevos obtenidos de la granja son llevados al centro de embalaje. Los cuales posteriormente se clasifican para su venta, tal y como se muestra en Figura 2 (Instituto de Estudios del Huevo, 2006).

Figura 2: Esquema de proceso de comercialización de huevo y ovoproductos



(Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

Además de la producción de huevo, se crean otros productos derivados del huevo. Teniendo productos deshidratados, los cuales tienen las mismas propiedades que un producto líquido y congelado. Para este proceso también se empieza desde una granja, luego los huevos tomados son llevados a fábrica para que sufran una transformación a los derivados que se quieren. Luego pueden ser distribuidas en tiendas y supermercados o llevadas a industrias alimentarias para la fabricación de otros productos tales como la mayonesa (Erica Maggi, 2010).

E. SALMONELLA SPP.

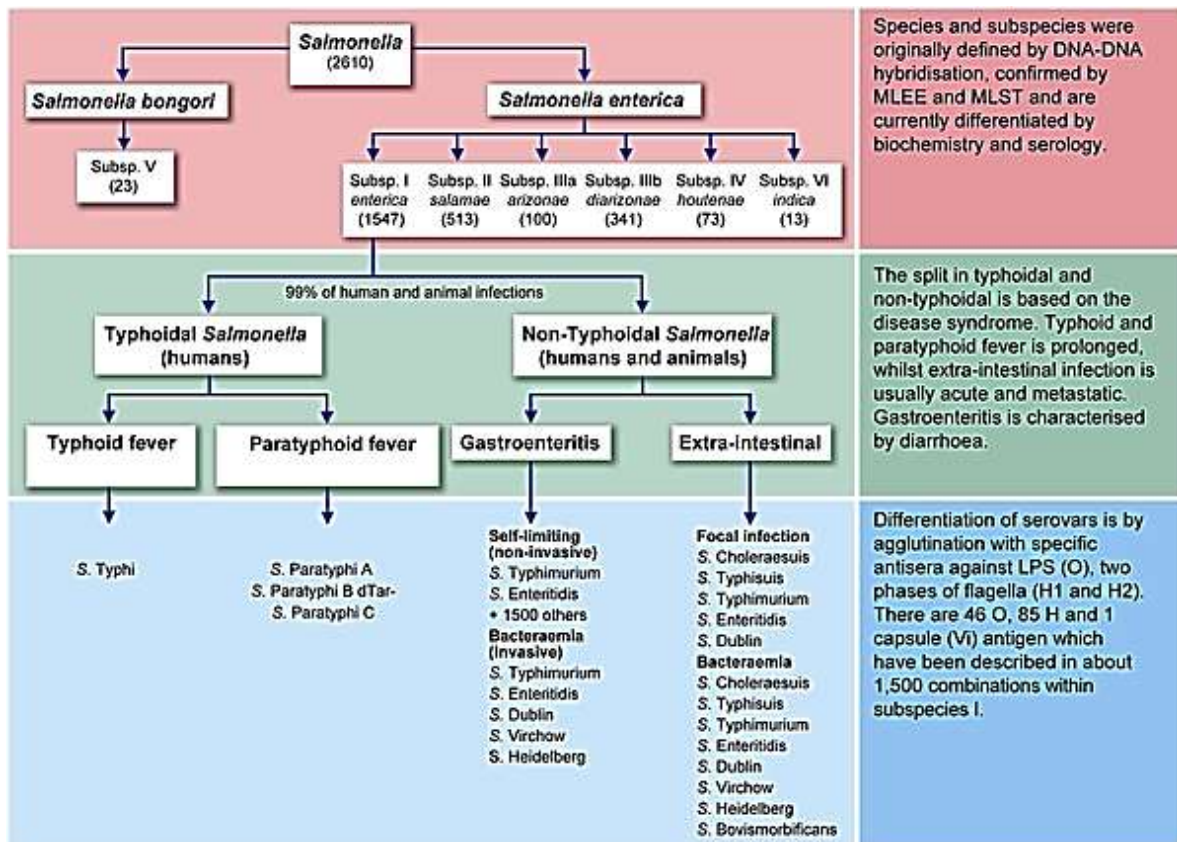
1. Características generales. *Salmonella* spp fue identificada en 1885 y nombrada por el descubridor Daniel Elmer Salmon. Es un bacilo Gram negativo facultativo. Se caracteriza por ser lactosa negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y poseer motilidad (Guerra, Teruya, & Ramos, 2010). La temperatura óptima de crecimiento es a 37°C, pero tiene la habilidad de crecer a temperaturas de 6 a 46°C, lo cual le provee mayor oportunidad de crecimiento (Brands, Alcamo, & Heymann, 2006).

2. Nomenclatura. Gracias a Kauffmann, se ampliaron los estudios serológicos pioneros establecidos por White. En el cual se crea un manual para un diagnóstico diario de *Salmonella*. Se agrupaban por serovares o serotipos (Achtman *et al.*, 2012). Dicho serotipo, dependerá de la aglutinación con antisueros que son específicos para los lipopolisacáridos (antígeno O), antígeno flagelar (antígeno H1 y H2), y antígeno Vi (capsular) (The Pathological Society of Great Britain, 1992).

Cada uno de los serotipos mencionados se consideró una especie separada, lo cual no es un método útil hoy en día. Puesto que se tendría alrededor de 2,463 especies de *Salmonella*. Por lo que se hizo uso, de características bioquímicas y genómicas (Brenner, Villar, Angulo, Tauxe, & Swaminathan, 2000).

En 1973, se demostró por hibridación de ADN-ADN que todos los serotipos y subgéneros I,II, y IV, se relacionaban a nivel de especie. Con la excepción de *Salmonella bongori*. Por lo tanto esta se dividió en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, la cual está dividida en 6 subespecies, tal y como se muestra en la Figura 3. Además de ello estas cuentan con serovares o serotipos clasificados por su forma antigénica(Uribe & Suárez, 2006).

Figura 3: Esquema de nomenclatura utilizada para *Salmonella* spp.



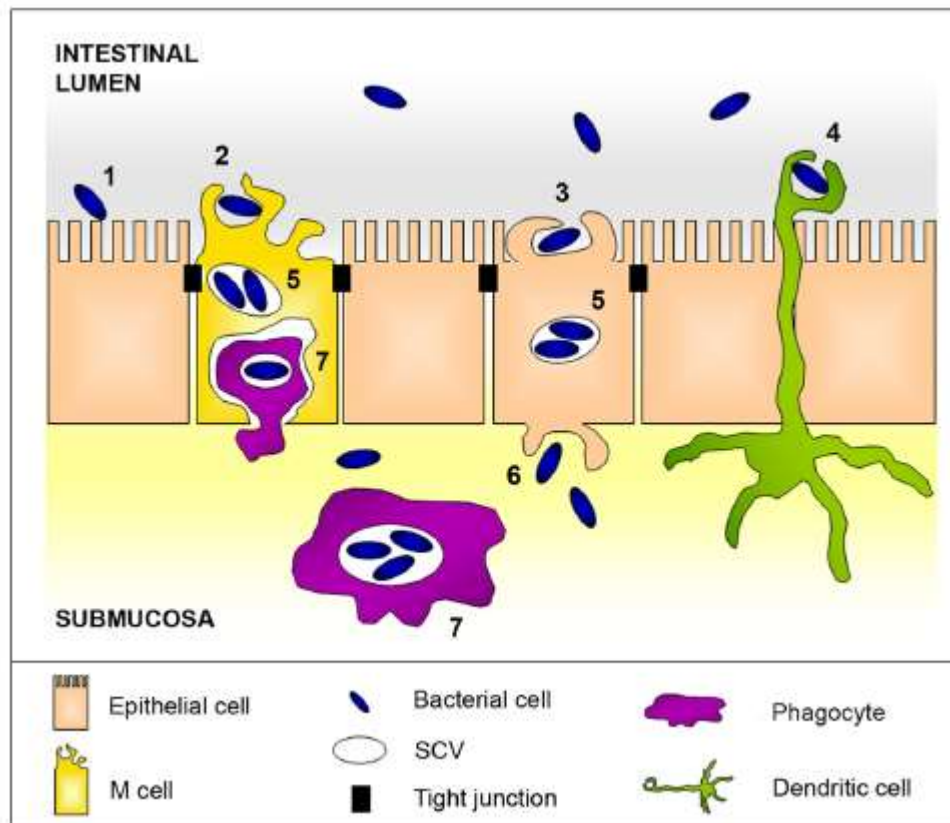
3. Patogenicidad. Las variedades de tipos de infecciones ocasionados por *Salmonella* van a depender del tipo de serotipo tal y como se mencionó anteriormente, además del estado de salud de la persona.

Las personas con mayor susceptibilidad a obtener salmonelosis, son niños que se encuentran en una edad de 5 años aproximadamente y pacientes inmunosuprimidos. El microorganismo llega a ser tan invasivo debido que tiene la habilidad de replicarse y sobrevivir perfectamente en las células del hospedero (Palmer & Schlauch, 2017).

El microorganismo al entrar al cuerpo, por medio de vía oral, ya sea en comida o agua; tiende a movilizarse a las células epiteliales del intestino o a las células M que son parte de las Placas de Peyer. Los efectores bacterianos activan la vía de transducción de señales y la reconstrucción del citoesqueleto de actina, dando como resultado la extensión hacia afuera de la membrana celular epitelial (Shu-Kee Eng, Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib & Kok-Gan Chan & Learn-Han Lee, 2015), tal y como se muestra en la Figura 4. Mientras esto ocurre *Salmonella* se protege con una capa llamada SCV (*Salmonella* Containing Vacuole, por sus siglas en inglés). La cual le ayuda a sobrevivir y replicarse (Fàbrega & Vila, 2013).

Esta capa protectora, SCV, se desintegra a la hora de encontrarse en la submucosa, en donde la bacteria será reclutada por fagocitos. Donde nuevamente se formara la SCV, para poder diseminarse por el torrente sanguíneo y a otros tejidos tales como el hígado (Fàbrega & Vila, 2013).

En humanos, una infección por *Salmonella* Typhimurium, puede llegar a causar síntomas tales como: infección gastrointestinal, fiebre y diarrea. Y en animales muchas veces es asintomático (Velge, Cloeckert, & Barrow, 2005).

Figura 4: Modelo de patogenicidad de *Salmonella* spp.

Para ayudar a la patogenicidad, *Salmonella* cuenta con estrategias de virulencia. Tales como: adhesinas, flagelos y genes (Fàbrega & Vila, 2013). En los cuales cabe mencionar a los PAIs (Pathogenicity Islands), los cuales son de suma importancia en la virulencia de una bacteria, debido a que codifica factores de virulencia. Tales como son los genes que codifican para adhesinas y factores de secreción (Gal-Mor & Finlay, 2006). Estos tienen la característica de diferir significativamente en la cantidad de G+C, presencia de genes de tRNA y presencia de secuencias de inserción, entre otras. Tal y como se muestra en la Figura 5, en donde se mencionan características importantes y cómo pueden ser medidas (Che, Hasan, & Chen, 2014).

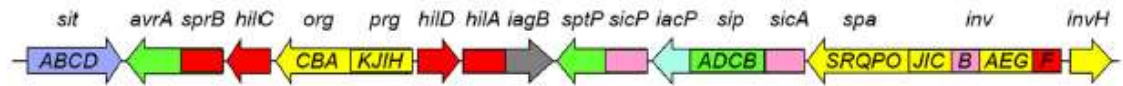
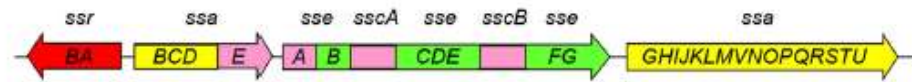
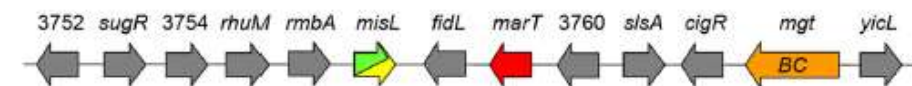
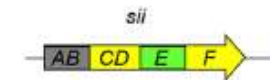
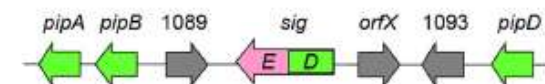
Figura 5: Características y métodos de detección asociado a Islas de Patogenicidad (PAIs, por sus siglas en inglés)

PAI-Associated Features	Feature Measurement Methods
Different genomic sequence signature	Compute G+C content, GC-skew, codon usage, or other sequence signature tools
Presence of virulence factors	Search through virulence factor database such as VFDB
Presence of mobility genes (integrases, transposes)	Search through NCBI-nr/nt, UniprotKB, Pfam or COG database
High percentage of phage-related genes	Search through NCBI-nr/nt, UniprotKB, Pfam or COG database
Presence of tRNA genes	Use tRNA gene search tool of tRNAscan-SE
High percentage of hypothetical protein genes	Search through NCBI-nr/nt, UniprotKB, Pfam or COG database
Presence of direct repeats	Use repeat finder software REPuter
Presence of insertion sequences	Search through ISfinder database

(Che, Hasan, & Chen, 2014).

El grupo de PAIs más importantes en *Salmonella* son: SPI- 1 a SPI- 5. SPI-1 codifica proteínas efectoras las cuales ayudan en la invasión del patógeno. SPI-2, el cual está dividido en cuatro segmentos, y alberga cuatro tipos de genes. En los cuales se codifica chaperones , efectores y reguladores (Fàbrega & Vila, 2013).

Los tres restantes no se conoce con grandes rasgos, pero se puede mencionar que: SPI-3 está implicada en la sobrevivencia del patógeno, SPI-4 relacionada con la interacción del epitelio intestinal y SPI-5 que participa en la realización de varios procesos patogénicos durante la infección, tal y como se muestra en la Figura 6 (Fàbrega & Vila, 2013).

Figura 6: Genes implicados en la patogenicidad de *Salmonella***SPI-1****SPI-2****SPI-3****SPI-4****SPI-5**

4. Importancia en productos alimenticios. *Salmonella* tiene gran importancia en la parte industrial de alimentos, ya que esta tiende a contaminar productos que provienen de gallinas, cerdos y bovinos. Los cuales muchas veces son portadores asintomáticos. Debido a que de estos productos se obtienen otras materias tales como la mayonesa, crema, salsas, entre otros, se debe tener un control sobre la materia prima, que en este caso sería el huevo, para que no se tenga contaminación en una producción masiva (Guerra *et al.*, 2010).

Este microorganismo contamina principalmente huevos. Debido a que las vías de contaminación son mayores a cualquier otro producto. Estos se pueden contaminar de dos maneras: directa e indirecta. La primera se da cuando la contaminación ocurre dentro de la gallina. Mientras una contaminación indirecta será luego de la puesta del huevo, la cual se obtiene a través de los poros de la cáscara. Por ello se debe tener un control en la temperatura en la que se mantendrá el huevo y tomar en cuenta que el agua con que se realice la limpieza del mismo no se encuentre contaminada (Whiley & Ross, 2015).

Cabe mencionar algunos factores que hacen que una gallina sea más susceptible a contaminarse con *Salmonella*, como lo es: la edad de las gallinas, la capacidad del microorganismo de tener una respuesta ácido resistente, la efectividad de competencia de *Salmonella* con otras bacterias, el estado de salud de la gallina, factores ambientales, entre otros (White, Baker, & James, 1997).

Para ello se deben tomar medidas tales como la higiene del lugar en el que se encuentran las gallinas, la seguridad biológica, vacunación. Además de tomar en cuenta puntos control para evitar contaminación, tales como: control de temperatura, renovación de agua y un mantenimiento adecuado de la maquinaria (White *et al.*, 1997)

5. Tratamiento y prevención. Para poder evitar la contaminación por *Salmonella* en huevo, se debe de tomar en cuenta la temperatura y tiempo de almacenamiento. Puesto que estos factores son críticos en el incremento de microorganismos ya sea en la cáscara o en el interior del huevo. Al tener mucho tiempo de vida, un huevo viejo, la cutícula se contrae dejando los poros con mayor exposición a patógenos. Por lo tanto el crecimiento se ve favorecido, más aún si se tiene en temperaturas entre 25°C y 35°C (Roman *et al.*, 2014).

F. PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP.

1. Microbiológicas. La principal prueba empleada es el aislamiento de *Salmonella*. Este método no se basa en el conteo de colonias, simplemente se realiza para saber si hay presencia o ausencia de la bacteria. Para ello se hace uso de un medio de enriquecimiento, tal como lo es el agua peptonada. Agar Bismuto Sulfito (BS), en donde se ven las colonias de color marrón, gris o negras y produce un halo (Perez, 2007). Este es un medio selectivo para *Salmonella*, conteniendo peptona y extracto de carne, lo cual da nitrógeno, vitaminas y amino ácidos esenciales. Además de ello contiene dextrosa que provee carbono y un inhibidor de bacterias Gram positivo y coliformes: Bismuto sulfito (Pronadisa, 2014).

También se hace uso de medio Hektoen (HE), el cual produce colonias color azules o verdes azuladas. Este es un medio diferencial para patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella* y otros *Enterobacteriaceae*. Este contiene extracto de carne y extracto de levadura. Además de ello lactosa, sucrosa y salicin, el cual permite ser fuente de carbono y energía. El azul de bromotil y la fucsina ácida, funcionan como un indicador de pH. El tiosulfato de sodio brinda sulfuro citrato de amonio férrico, el cual será un indicador de la producción de ácido sulfhídrico (Pronadisa, 2014).

Y, por último, el medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) en la cual se puede observar las colonias con una coloración rosada con o sin centro negro, algunas colonias se ven totalmente negras. Posterior a ello se realiza también una batería, en donde los más importantes son agar

triple sugar (TSI) y agar lisina hierro (LIA), con los cual se podrá confirmar que las colonias formadas en las placas pertenecen a *Salmonella* (Perez, 2007). En el cuadro 2 muestra los tiempos y temperaturas de incubación para *Salmonella* en diferentes agares.

Cuadro 2: Tiempos y temperaturas de incubación para *Salmonella* en diferentes agares

Agar	Tiempo	Temperatura
BS	24-48 h	35 °C
HE	18- 24 h	35 °C
XLD	24 h	37 °C

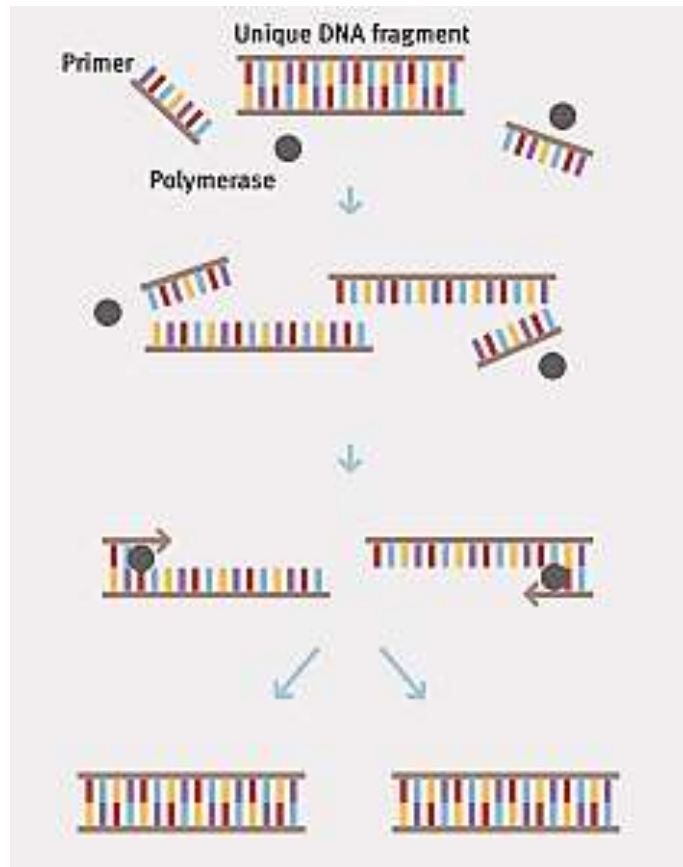
BS= bismuto sulfito HE= Hektoen

XLD= Xilosa Lisina Desoxicolato

2. PCR convencional. La técnica de Reacción en cadena de polimerasa es utilizada para obtener una amplificación exponencial de cantidades pequeñas de ADN. Para la amplificación de un gen específico se utiliza una mezcla que contiene una cantidad específica de ADN, los cebadores los cuales generalmente no son mayores a 30 bases que permiten amplificar una secuencia específica, la polimerasa Taq, dNTP`s y buffer. Posteriormente, se coloca la muestra en un termociclador en donde se inician distintos ciclos de reacción, normalmente 30 ciclos; en ellos se da la desnaturalización de ADN, el alineamiento de los cebadores y la extensión (Zavala Castro, 2005).

Para que un PCR sea exitoso deben tomarse en cuenta ciertas condiciones: la concentración del cloruro de magnesio, el cual actúa como un cofactor de la polimerasa; la pureza del ADN con el que se va a trabajar, ya que la presencia de sustancias puede llegar a inhibir a la polimerasa Taq; la concentración de dNTP`s (desoxirribonucleótidos trifosfato); utilizar tiempos largos de desnaturalización; y lo más importante calcular la temperatura de fusión en base a la cantidad de GC de los *primers* (Zavala Castro, 2005)

Figura 7: Reacción en cadena de polimerasa (PCR)



3. PCR en tiempo real (qPCR). El PCR en tiempo real está basado en los mismos principios de un PCR convencional. A diferencia del PCR normal, este hace una amplificación y detección de ADN utilizando sondas marcadas con fluorocromos de manera simultánea (Tevfik 2007).

El q-PCR, PCR en tiempo real cuantitativo, el cual utiliza primers marcados con fluoróforos. Estos llegan a emitir luz cuando se hibridizan con el ADN correspondiente. La emisión de esta luz es captada por un temociclador, lo cual llevará al posterior análisis de la muestra (Tevfik 2007).

Actualmente el PCR en tiempo real es el método más sensible que existe para cuantificación de ADN. Aún teniendo una pequeña cantidad, este puede garantizar sensibilidad, especificidad y eficiencia. Siendo el último factor el más importante para las empresas de análisis alimentario (De Dios, Ibarra, & Velasquillo C., 2013).

Existen dos métodos de detección: el específico y el no específico. El específico se basa en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (por sus siglas en inglés: FRET). El cual contiene un quencher y un fluoróforo para generar la señal deseada. Por otro lado el método no específico, se basa en moléculas oxidantes, que llegan a emitir la señal. La cual se da por

fluorescencia, y es captada en el paso de extensión. Siendo esta proporcional al número de copias de ADN en cada ciclo (De Dios *et al.*, 2013).

4. Bax® System. Este es un método de detección automatizado para microorganismos en muestras alimentarias. Lo cual llega a lograrlo por medio del uso de qPCR. Este sistema simplifica el procesamiento de muestras, debido a que los reactivos se encuentran compactados en una pastilla dentro de tubos especiales de PCR. Estos contienen lo que es: oligonucleótidos o *primers* (en inglés), polimerasa, nucleótidos y el control positivo, el cual permite validar los resultados obtenidos de muestras negativas y detectar fallas en la reacción (Dupont, 2016).

Cabe mencionar que el sistema utiliza fragmentos de ADN específicos del organismo que se quiere amplificar, por ello su clasificación de kits, dependiendo del organismo blanco. Además de ello tiene beneficios como lo es la disminución del tiempo para el procesamiento de muestras y una sensibilidad mayor del 98% (Dupont, 2016).

VII. METODOLOGÍA

A. MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Muestra. Las muestras que se utilizaron en la investigación fueron huevos comerciales que se obtuvieron de supermercado. En donde el primer grupo son huevos de patio libres de antibióticos, y el segundo grupo: huevos en donde se hace uso de antibióticos.

2. Limpieza de lugar de trabajo y material. Debido a que se quiere evitar contaminación para la extracción de ADN. Se limpió la mesa de trabajo con cloro y etanol. Antes de abrir el paquete de huevos sobre la mesa limpia, se desinfectó con etanol. El paquete se abrió con tijeras estériles*.

*De no ser necesario el uso de tijeras, asegurarse de tener guantes para realizar el trabajo.

3. Desinfección de huevos. Para poder empezar con el proceso de contaminación artificial, se examinaron los huevos, en cuanto pequeñas astillas o grietas que pueda tener la cáscara. Luego se desinfectó el huevo. Esto se realizó con una solución de etanol al 70%, antes de colocar los huevos en la campana de flujo laminar.

4. Confirmación de contaminación en huevo con *Salmonella*. Para poder realizar la contaminación artificial, se confirmó la presencia y ausencia de *Salmonella*. Para ello se tomaron 20 huevos, los cuales fueron quebrados, de manera individual y aséptica, colocándolos dentro de un vaso de precipitado de 100 ml, en donde se mezclaron las muestras hasta que todo estuviera homogéneo. Luego se pre enriqueció la muestra de cada huevo adicionando 100 ml de caldo TSB (temperatura ambiente), se homogenizó con ayuda de stomacher. Esto se debe cubrir e incubar durante 24h a 35°C.

Al pasar el tiempo de incubación, se agitó la muestra, asegurándose de tener tapa cerrada del recipiente. Se transfirió 0.1 ml de mezcla a 10 ml de caldo de tetratoato (TT). Vórtex. Se incubó a 35°C por 24 h.

Del caldo incubado (TT) se toman 10 µL y se coloca esta cantidad en placas de agar Hektoen (HE). En el Cuadro 3 se muestra las características que deben presentar las colonias en un medio HE:

Cuadro 3: Resultados de *Salmonella* en Agar HE

Agar	Resultado
HE	Colonias azul-verde con o sin centros negros. Pueden verse como colonias con centros grandes y brillantes o completamente negras.

Si se llega a tener crecimiento bacteriano en el medio HE, se debe tomar dos colonias, las cuales serán inoculadas en TSI (triple sugar iron agar) y LIA (lysine iron agar). Estos se incuban a 35°C por 24 h. Los resultados para ambos agares se muestran en el Cuadro 4:

Cuadro 4: Resultados en agar TSI y LIA

	Resultado
TSI	Extremo inclinado rojo y ácido color amarillo. Produce H ₂ S
LIA	En el extremo del tubo produce una reacción alcalina (púrpura) producción de H ₂ S

5. Contaminación artificial con *Salmonella* Typhimurium. Para poder realizar la contaminación artificial, se utilizó el método anterior, con algunas modificaciones. Por lo que se tomó una porción de ensayo, 25 ml, a lo cual se le inoculó con 2 ml de una serie de diluciones, 10⁸, 10⁶ y 10⁴ CFU/ml de *Salmonella* Typhimurium. Además de ello se tuvo un control de contaminación, el cual no fue inoculado. La sensibilidad del qPCR, se definió como la concentración más baja en CFU/ml que produjo un resultado positivo.

6. Preparación de la muestra. Se tomaron 25 g de muestra y agregó 225 ml de BPW. Se mezcló de manera que el contenido estuviera homogéneo. Luego se incubó a 35°C por 24h

7. Lisis. Antes de empezar, se tenía preparado el reactivo de lisis. El cual requiere 150 µL de proteasa y 12 ml de Buffer. En tubos de reacción se agregó 200 µL del reactivo de lisis. A cada uno de ellos se le agregó 5 µL de muestra previamente enriquecida.

Los tubos colocaron en un bloque de calor a 37°C por 20 min. Luego se pasó a una temperatura de 95°C por 10 minutos y por último se colocó en un bloque frío, hasta iniciar el programa de equipo*.

*Si las muestras no serán leídas por el equipo el mismo día del procesamiento de muestras, es recomendable dejarlo en el reactivo de lisis. En donde las muestras tienen una semana de vida.

8. PCR. Se encendió el termociclador para precalentar. De lado izquierdo del equipo se encontrará el botón de "POWER", este fue presionado. Luego se abrió la bandeja presionando la hendidura ubicada de lado derecho. Se hizo click en "next". Mientras el equipo se preparaba para leer las muestras, se colocaron los tubos de reacción en un rack de enfriamiento el cual contenía la plantilla metálica de color negro del termociclador. Es recomendable marcar el primer tubo de cada hilera para no confundir la posición.

Con ayuda de la herramienta para retirar las tapas de los tubos, se quitaron las tapas de los tubos de lisis que se encuentran en el rack de enfriamiento. Y con ayuda de la herramienta gris se retiró cuidadosamente las tapas de los tubos de reacción y fueron eliminadas.

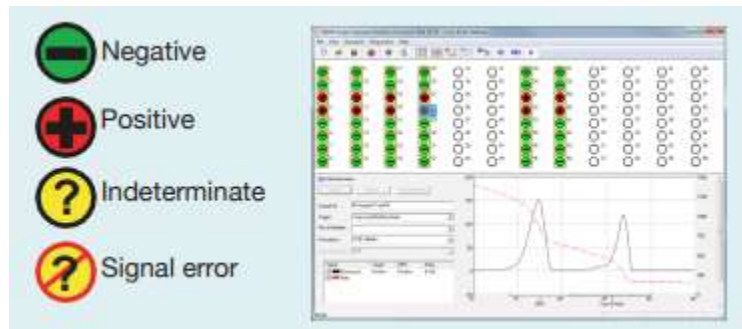
Con una pipeta multicanal se introdujo las puntas en los tubos de lisis (las que contienen el lisado) y se debe homogenizó y se midió 50 µL. Este fue agregado a cada tubo de reacción en la posición correspondiente sin tocar la pastilla de reacción. Luego los tubos fueron tapados con tapas ópticas con ayuda de la herramienta gris.

Las muestras fueron llevadas al equipo al aparecer en la pantalla que el equipo ha alcanzado la temperatura de carga. Se abrió la bandeja del termociclador, y se introdujo la muestra con la plantilla metálica ubicándolo de la misma manera que fue ingresado en la PC. Se cerró la bandeja del termociclador.

La reacción toma un tiempo de 2 a 3 horas. Una vez terminado se dio un clic en "finish", para posteriormente imprimir la hoja de resultados y guardar el archivo. Los tubos fueron retirados del termociclador y eliminados en un bote de ecotermo. Finalmente se apagó el equipo.

9. Interpretación de resultados. En los resultados se observaron símbolos como los que se muestran en la Figura 8. El signo menos significa ausencia de *Salmonella*, el signo más es un resultado positivo. El signo de interrogación es un resultado indeterminado, el cual ocurre cuando el control interno no alcanza el nivel necesario para ser considerado válido.

Figura 8: Interpretación de resultados de qPCR



VIII. RESULTADOS

Para poder obtener los resultados respecto a la detección de *S. Typhimurium* se empezó por analizar los huevos seleccionados para inoculación artificial; comprobando que estos no estuvieran contaminados con *Salmonella* spp. Lo cual se logró realizando un enriquecimiento TSB y luego un enriquecimiento en caldo TT. Posterior a ello se sembró en placas de agar BHI, teniendo un resultado negativo para todas las muestras (22 huevos).

Cuadro 5: UFC/ml de diluciones seriadas de *S. Typhimurium*.

Dilución	Colonias	UFC/ml	UFC/ml inicial
10 ⁻⁶	262	2X10 ³	2X10 ⁹
	169		
	84		
10 ⁻⁷	54	4X10 ²	4X10 ⁹
	36		
	34		
10 ⁻⁸	7	8X10 ¹	2X10 ¹⁰
	1		
	15		

En el Cuadro 5 se detalla la cantidad de colonias que fueron contadas en la siembra de la dilución en medio BHI, lo cual se realizó en triplicado. Con ello se pudo obtener los UFC/ml de cada dilución y el dato inicial luego de incubación. La cual fue incubada durante 2 h a 35°C en shaker, con una alícuota de un cultivo de 16 h.

A partir de ello se realizaron diluciones que tuvieran una concentración de: 10⁸, 10⁶ y 10⁴ UFC/ml; para inocular artificialmente en huevos comerciales y de granja.

Cuadro 6: Resultados de qPCR de inoculación artificial en huevo con *Salmonella* Typhimurium a diferentes concentraciones, en huevos comercial y huevos de granja^a

	Concentración de inóculo de huevo (CFU/ml)	Ct S. Typhimurium ^c	Promedio de Ct de S. Typhimurium	IPC Ct ^b	Promedio de Ct de IPC	Resultado final
Huevos comerciales	10 ⁴	32.1	29.3 (±2.62)	38.0	36.8 (± 1.15)	Positivo
		28.9		36.7		Positivo
		26.9		35.7		Positivo
	10 ⁶	27.4	27.1 (±0.46)	34.9	36.0 (±1.49)	Positivo
		26.6		37.7		Positivo
		27.4		35.4		Positivo
	10 ⁸	27.7	27.9 (±0.23)	36.2	36.5 (±1.09)	Positivo
		28.1		35.7		Positivo
		28.1		37.8		Positivo
Huevos de Granja	10 ⁴	27.3	29.0 (±2.66)	37.8	35.5 (±2.08)	Positivo
		27.7		35.1		Positivo
		32.1		33.7		Positivo
	10 ⁶	28.8	27.9 (±0.78)	33.8	35.1 (±1.25)	Positivo
		27.4		35.3		Positivo
		27.5		36.3		Positivo
	10 ⁸	28.9	29.6 (±2.52)	35.2	38.9 (±3.20)	Positivo
		32.4		40.7		Positivo
		27.5		40.8		Positivo

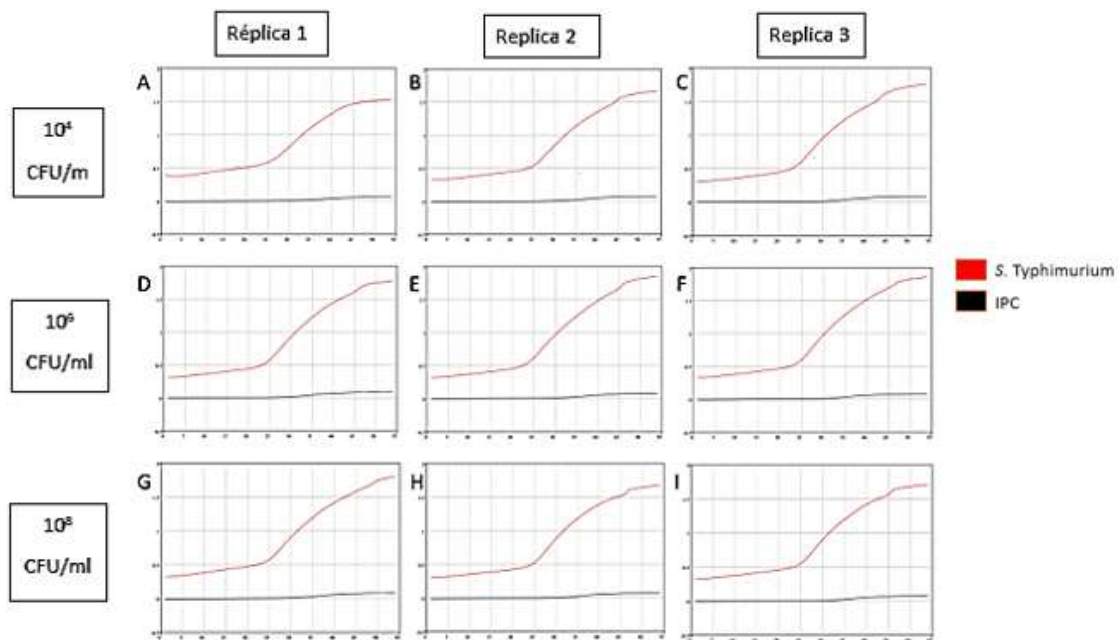
a= Control negativo: Ct de S. Typhimurium, 42.9. Ct de IPC, 34.0. Dando un resultado positivo débil.

b= Valores usualmente se encuentran entre 30 a 40

c= Valores usualmente se encuentran entre 20 a 50

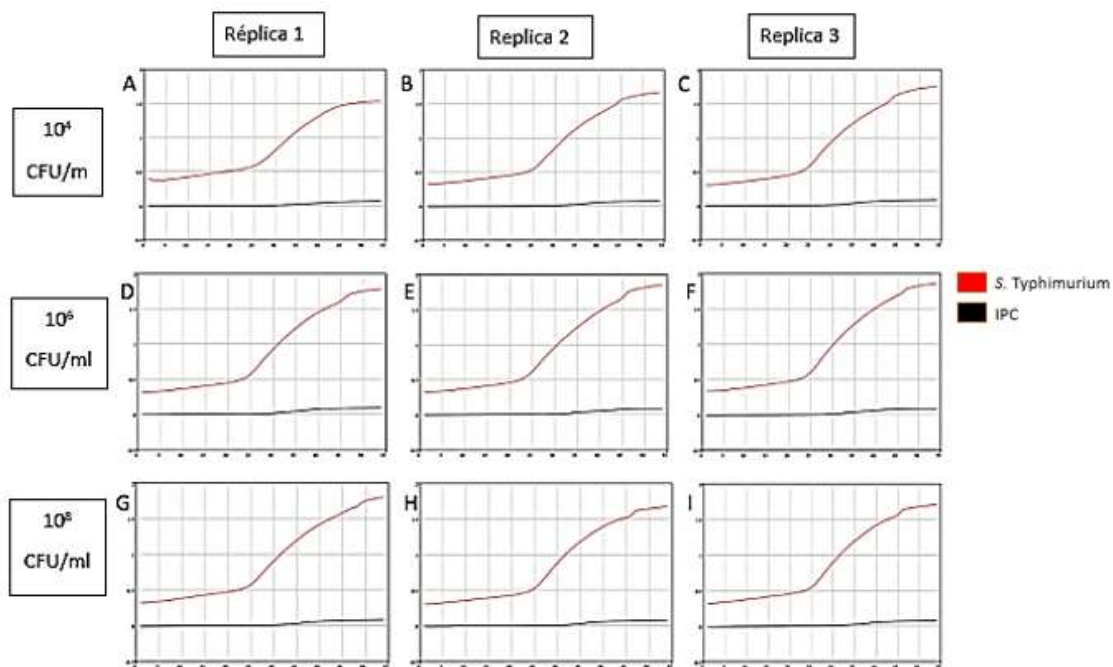
En el Cuadro 6 se muestran los valores Ct de *S. Typhimurium* y del control interno positivo. Con lo cual se puede determinar que el resultado final es positivo para todas las muestras en las tres concentraciones inoculadas: 10⁴, 10⁶ y 10⁸. Además de ello se detalla el valor Ct para el control negativo, teniendo como un resultado final: positivo débil. Determinando así contaminación del mismo.

Figura 9: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control interno positivo y *S. Typhimurium* inoculado en huevos comerciales.



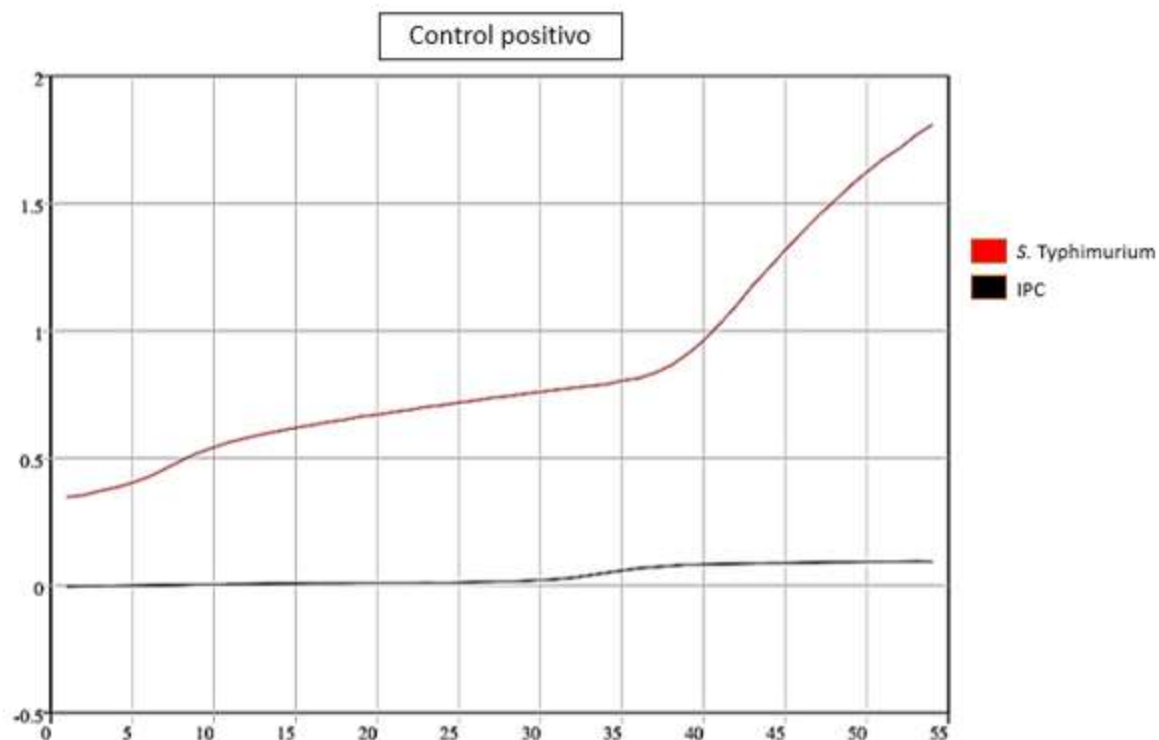
En la Figura 9 se puede afirmar el resultado positivo de las muestras, debido a que la curva de bacteria (color rojo) se encuentra por arriba de la curva del control interno positivo (color negro); además de tener un Ct que se encuentra bajo los parámetros establecidos por el proveedor. Las gráficas A, B y C pertenecen a la inoculación artificial de una concentración de 10⁴; los gráficos D, E y F pertenecen a la inoculación artificial de una concentración de 10⁶; y por último las gráficas G, H e I, a una concentración de 10⁸.

Figura 10: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control interno positivo y *S. Typhimurium* inoculado en huevos de granja.



En la Figura 10 se puede afirmar el resultado positivo de las muestras, debido a que la curva de bacteria (color rojo) se encuentra por arriba de la curva del control interno positivo (color negro); además de tener un Ct que se encuentra bajo los parámetros establecidos por el proveedor. Las gráficas A, B y C pertenecen a las inoculación artificial de una concentración de 10⁴; los gráficos D, E y F pertenecen a la inoculación artificial de una concentración de 10⁶; y por último las gráficas G, H e I, a una concentración de 10⁸.

Figura 11: Gráficos de temperatura contra fluorescencia de control positivo externo



En la Figura 11 se muestra la gráfica de temperatura contra fluorescencia, en la cual se observa una contaminación por *S. Typhimurium*

Cuadro 7: Resultados estadísticos para comparar datos de detección de *Salmonella Typhimurium* entre huevos comerciales y de granja.

Tipo	Media	DE ^a	IC ^b 95%	Valor α	Valor z	Valor p
Comercial	28.13	1.64	(27.06;29.20)	5%	1.96	0.42
Granja	28.84	2.01	(27.52;30.16)			

a= Desviación estándar

b=Intervalo de confianza

En el Cuadro 7 se muestran los resultados estadísticos obtenidos, los cuales comparan la detección a partir de los valores Ct, entre huevos comerciales y de granja. Por lo que teniendo un valor $p > \alpha$ (0.05). Se puede aceptar la hipótesis nula. Concluyendo así que no existe diferencia significativa en la detección de *Salmonella Typhimurium* entre huevos comerciales y de granja, con un nivel de confianza del 95%

IX. DISCUSIÓN

La determinación de microorganismos en alimentos es de suma importancia en las empresas alimentarias. Para llevar un control en el proceso de la producción del alimento, para brindar un producto de calidad al consumidor.

Uno de los microorganismos que se monitorea con el control de calidad de productos alimenticios, debido a su alta patogenicidad en el humano, es la *Salmonella* spp. Sobre todo *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Los alimentos que se ven mayormente afectados son: lácteos, carne de aves, pescado y huevo (Instituto de Estudios del Huevo, 2006). Es por ello que hoy en día se buscan técnicas que puedan detectar fácilmente la bacteria. Usando equipos que les ahorre tiempo de trabajo y brinde mayor sensibilidad en el proceso de obtención de resultados.

Uno de los métodos que se usa para una detección rápida de microorganismos en alimentos tal como lo es *Salmonella*, es Bax® System. Este es usado por la *United States Department of Agriculture* (por sus siglas en inglés, USDA). Esto debido a que el equipo permite tener resultados reproducibles, simplicidad de procesamiento de muestras y consistencia en los resultados (Dupont, 2015). El análisis que se llevó a cabo en el estudio buscaba la optimización de la detección de *Salmonella* en huevo con ayuda del método Bax® System.

El análisis del proceso comenzó con determinar si había presencia de *Salmonella* en los huevos a analizar. Lo cual fue resultado con siembras en placas de agar HE, dando un resultado negativo, debido a que no hubo crecimiento bacteriano, luego de pasar por un proceso de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*: caldo TT. Por lo tanto se pudo proceder a realizar la contaminación artificial con cepa ATCC de *S. Typhimurium* (Lote: 363-245) de Globalquiality. Esta fue sembrada en placas de agar BHI. Siendo estas colonias de color blanco, de tamaño mediano, redondas y de borde irregular.

Para realizar la contaminación artificial, se realizaron diluciones las cuales permitieran tener concentraciones de 10^8 , 10^6 y 10^4 . Lo cual se obtuvo de un inóculo inicial de 10^9 UFC/ml, tal y como se muestra en el Cuadro 4.

En esta parte del proceso es de suma importancia que se realice como mínimo un triplicado, debido a que no todas las colonias llegan a formarse individualmente, causando así un error por parte del investigador a la hora de hacer el conteo de colonias formadoras. Además de ello cabe mencionar que el sembrado debe ser simultáneo a la contaminación artificial, para que se pueda ser más exacto en cuanto al crecimiento bacteriano en el tiempo.

Cabe mencionar que la frecuencia de contaminación con *Salmonella* de huevos individuales es de 1 en 20,000 huevos (Braden Christopher, 2006). Dando así mayor importancia a la contaminación directa, debido a que es necesaria una concentración aproximada de 5×10^4 de *Salmonella* para infectar un 50% de gallinas dentro de su recinto (Holt, 2003).

Al tener establecido las concentraciones a utilizar, se procedió a la inoculación del huevo con *S. Typhimurium*. Para ello se usó huevos industriales y de patio. Esto debido a que se conoce por literatura que en la industria se hace uso de antibióticos a la hora de alimentar a las gallinas para erradicar *Salmonella* en huevos. Por lo tanto estos grupos fueron de importancia para determinar si había diferencia el crecimiento bacteriano con las dos matrices.

Fueron analizados de manera individual, tomando 25 ml e inoculando 2 ml de cada una de las concentraciones establecidas. Con ello se pudo obtener resultados de la presencia de la bacteria en el huevo, tal y como se muestra en el Cuadro 5. Como se puede observar se tienen Ct de la bacteria en el rango establecido por el proveedor al igual que el control interno positivo. Dando un resultado positivo para todas las concentraciones inoculadas. Cabe mencionar, que el método logró ser de alta sensibilidad. Dados los Ct obtenidos, los cuales no difieren entre concentraciones, ni tipo de huevo: industrial o de patio.

En los resultados de Ct para *Salmonella Typhimurium*, se puede notar que todos los valores se encuentran cercanos unos con otros a pesar de pertenecer a grupos diferentes: tipo de huevo y concentración. Por lo que se puede inferir que el proceso tiene un límite de sensibilidad mínima de 10^4 CFU/ml, debido al enriquecimiento previo a la extracción. Ya que las bacterias a pesar de estar a diferentes concentraciones, tendrán todos los nutrientes necesarios disponibles para una replicación exitosa.

Por lo tanto, se puede decir que el sistema podrá detectar concentraciones mínimas, debido a que el enriquecimiento le permite a la bacteria replicarse hasta la fase estacionaria, en el tiempo de incubación usado.

En cuanto al control negativo externo, se tuvo un resultado positivo débil, Figura 11. Confirmando contaminación de la muestra. La cual pudo haber ocurrido en el proceso de colocar el lisado en las pastillas de PCR. Esto debido a que los tubos no contaban con tapaderas individuales que permitieran el sellado de las muestras antes de colocar el control negativo externo.

Es por ello que se recomienda, que los tubos de pastillas de PCR, se dividan inicialmente para evitar contaminación entre muestras e incluir un control negativo al principio y al final del proceso.

A pesar de que se sabe por la literatura, que el uso de antibióticos es aplicado a productos tales como el huevo. Para evitar crecimiento bacteriano y para promover un crecimiento rápido. Se puede observar en el Cuadro 6, que no existe diferencia significativa en la detección de la bacteria entre huevos industriales y de patio, debido a que se obtuvo un $p > \alpha$, por lo que no se rechaza la hipótesis nula .

Dado que no hubo diferencia entre las dos matrices, no se puede afirmar que exista diferencia entre los huevos industriales y de patio en la presencia de inhibidores de crecimiento de *Salmonella*. Para futuros estudios se recomienda hacer un análisis de la presencia de antibiótico y la concentración del mismo, para poder determinar si existen dosis inhibitorias en los huevos industriales.

Con todo ello se puede decir que el método Bax[®] System es sensible, es decir que tiene la capacidad de detectar el patógeno en muestras positivas; para concentraciones de $10^4 - 10^8$ CFU/ml de huevo.

A pesar de ello la concentración mínima utilizada, es alta para poder mencionar la eficiencia del equipo en cuanto a una detección inmediata de contaminación del patógeno. Puesto que una concentración de 10^4 la llegará a tener un huevo que se encuentre totalmente contaminado por *Salmonella*. Con ello se recomienda que en próximos estudios se realice una contaminación artificial con una concentración menor a la utilizada, para conocer el mínimo de detección del equipo, sin realizar un enriquecimiento previo.

X. CONCLUSIÓN

- A. Se creó un Procedimiento Operacional Estándar para la obtención de muestra y detección de *Salmonella* (Ver Anexo).
- B. El método Bax[®] System, permitió la detección de *Salmonella* Typhimurium a diferentes concentraciones: 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/ml. En huevos industriales y de patio.
- C. Bax[®] System permitió la detección de *Salmonella* en huevo, obteniendo Ct del patógeno que se encuentran bajo los parámetros del proveedor, entre 26.6 y 32.4.
- D. El método es sensible para cualquier concentración entre 10^4 - 10^8 UFC/ml de *Salmonella*.
- E. No existe una diferencia significativa en la detección mediante Ct del patógeno, en huevos industriales y de patio, lo cual se pudo confirmar teniendo un $p < \alpha$ (0.05); por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Realizar desde un inicio un esquema de flujo de trabajo. De ser posible, separar los ambientes en donde se realizará la contaminación artificial y extracción de ADN. Lo cual disminuirá el riesgo de contaminación de muestras. Sobre todo en el control negativo externo.
- B. Separar los tubos de PCR con pastilla de reactivos en el momento de colocar la muestra para evitar contaminación cruzada y de control negativo.
- C. Colocar un control negativo al principio y al final de la placa de PCR, para verificar contaminación durante el procesamiento.
- D. Para estudios de implementación de kit comercial, teniendo como muestra: huevos. Es recomendable realizar una prueba de detección de antibióticos. Para poder confirmar la repercusión del uso en cuanto al crecimiento bacteriano.
- E. Se recomienda realizar contaminación artificial con concentraciones menores a las utilizadas: 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/ml. Para conocer cuál es el mínimo de detección por parte del equipo.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., ... Brisse, S. 2012. <<Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*>>. *Plos Pathogens*,8(6):1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. 2011. <<Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología>>. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*,29(8):601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Braden Christopher. 2006. <<Salmonella enterica Setotype Enteritis and Eggs: A National Epidemic in the United States>>. *Food Safety*,43:512–517. Retrieved from https://watermark.silverchair.com/43-4-512.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAZ0wggGZBqkqhkiG9w0BBwagggGKMIIbhgIBADCCAX8GCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEEAS4wEQQMUqHv1mKJcwwgl7DbAgEQgIIBUBbN6dm6pYJ9YZ5OtsAmkPTZx02n-Bq_7i7n86PPTgimUI
- Brands, D. A., Alcamo, I. E., & Heymann, D. L. 2006. *Salmonella*. Chelsea House Publishers. Retrieved from https://books.google.com.gt/books?id=zASmHprYYnEC&printsec=frontcover&dq=salmonella&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjn3en9_MnWAhVC4CYKHdxkDa0Q6AEIJzAA#v=onepage&q=salmonella&f=false
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. 2000. <<Salmonella Nomenclature>>. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*,38(7):2465–2467. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86943/pdf/jm002465.pdf>
- Carbajal, Á. 2006. <<Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud>>. *Dpto Nutrición. Fac. Farmacia. UCM. Revista de Nutrición Práctica*,10:73–76. Retrieved from <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-11-26-CARBAJAL-NutrPractica-2006.pdf>
- Che, D., Hasan, M. S., & Chen, B. 2014. <<Identifying pathogenicity islands in bacterial pathogenomics using computational approaches.>>. *Pathogens (Basel, Switzerland)*,3(1):36–56. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010036>
- COGUANOR. 2017. <<Coguanor -- Comision Guatemalteca de Normas, Guatemala -->>. Retrieved September 28, 2017, from <http://coguanor.gob.gt/index.php?id=0>
- Cota-Rubio, E., Hurtado-Ayala, L., Pérez-Morales, E., & Alcántara-Jurado, L. 2000. <<Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano Revisión sistemática>>. Retrieved from <http://www.reibci.org/publicados/2014/mayo/4569156.pdf>
- De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo C. 2013. <<Fundamentos de la reacción en cadena de la

- polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real>>. *Tecnología En Salud*, 2(2):70–78. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Dupont. 2015. *DUPONT™ BAX® SYSTEM PRECISE AND POWERFUL MOLECULAR PATHOGEN DETECTION*. USA. Retrieved from https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/16173154/contents
- Dupont. 2016. *Dupont Bax System Q7 Instrument. User Guide*. (2nd ed.). USA. Retrieved from <https://docs.camunda.org/stable/guides/user-guide/>
- Erica Maggi. 2010. *Cadenas alimentarias: huevos y derivados*. Argentina. Retrieved from http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/42/cadenas/r42_10_Huevos.pdf
- Fàbrega, A., & Vila, J. 2013. <<Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation>>. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2):308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. 2006. <<Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence>>. *Cellular Microbiology*, 8(11):1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
- Guerra, A., Teruya, M., & Ramos, J. carlos. 2010. <<Estudio de la presencia de Salmonella sp. en huevos frescos de gallina>>. *Biotempo*, 10:39–43. Retrieved from <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/article/view/855/771>
- Holt, P. S. 2003. <<Molting and Salmonella Enterica Serovar Enteritidis Infection: The Problem and Some Solutions>>. *Poultry Science Association*, 82:1008–1010. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1027.7230&rep=rep1&type=pdf>
- Instituto de Estudios del Huevo. 2009. *El gran libro del huevo*. (Editorial Everest, Ed.). Madrid. Retrieved from www.institutohuevo.com
- Instituto de Estudios del Huevo. 2006. *Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos*. (I. de estudio de Huevo, Ed.). Madrid. Retrieved from http://www.federovo.net/portal1/images/content/seguridad_alimentaria_huevos_ovoproductos.pdf
- MAGA. 2017a. <<Historia – Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación>>. Retrieved September 28, 2017, from <http://web.maga.gob.gt/historia/>
- MAGA. 2017b. <<Misión y visión – Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación>>. Retrieved September 28, 2017, from <http://web.maga.gob.gt/mision-y-vision/>
- MINECO. 2017. <<Comisión Guatemalteca de Normas>>. Retrieved September 28, 2017, from <http://www.mineco.gob.gt/comisión-guatemalteca-de-normas>
- Palmer, A. D., & Slauch, J. M. 2017. <<Mechanisms of *Salmonella* pathogenesis in animal models>>. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, :1–16. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1353903>
- Perez, J. . y G. L. . 2007. <<Detección del virus de la tristeza de los cítricos en clones de pomelo

- (citrus paradisi Macf.), seleccionados en los departamentos de San Pedro y Concepción>>.:2–6.
- Pronadisa. 2014. *Applications of dehydrated Culture Media* (4ta edicio). Retrieved from https://www.chemie-brunschwig.ch/documents/suppliers-information/pdf/downloads/PN_DehydratedMedia_Manual.pdf
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Ruiz Español, A., Colantonio, L. D., Burrone, M. S., Quesada, A., ... Burrone, M. S. 2016. <<Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano>>. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*,33(1):32. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>
- Revisión, P. 2013. *NORMA TÉCNICA GUATEMALTECA COGUANOR NTG 29001*. (COGUANOR, Ed.). Guatemala. Retrieved from www.mineco.gob.gt
- Rivera Calderón, C., Gabriel, L., Delgado, M., Andrés, P., Urbano, C., & Farley, M. 2012. <<Resistance of Salmonella to conventional antimicrobials for their treatment>>. *Revista CES Medicina Veterinaria Y Zootecnia*,7:116–129. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428107010.pdf>
- Roman, Y., Ramirez, R., Diana, P., Rincón, A., Johana, C., & Vargas, M. 2014. <<Salmonella enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia)>>. *Salud Soc. Uptc*,2:22–27.
- Salas, J.-, Camacho M A, Quijano-Vicente G, Lozano-Trejo S, Sosa-Montes E, & Ruiz-Luna J. 2014. <<CARACTERÍSTICAS DEL HUEVO DE GALLINAS DE TRASPATIO ALIMENTADAS CON UNA FORMULACIÓN ALTERNATIVA CON O SIN VERDOLAGA (Portulaca oleracea L.)>>. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*,:158–160. Retrieved from http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2014/Trabajo061_AICA 2014.pdf
- Shu-Kee Eng, Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib, H.-L. S., & Kok-Gan Chan & Learn-Han Lee. 2015. <<Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance>>. *Frontiers in Life Science*,8(3):284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- The Pathological Society of Great Britain. 1992. <<Nomenclature of Salmonella>>. *J. Med. Microbiol.*,37:361–363. Retrieved from <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/37/6/medmicro-37-6-361.pdf?expires=1517691531&id=id&accname=guest&checksum=1D274BF3776F89445476F8B0A541D1F1>
- Uribe, C., & Suárez, M. 2006. <<Salmonellosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar>>. *Colombia Médica*,37(2). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/283/28337211/>
- Velge, P., Cloeckaert, A., & Barrow, P. 2005. <<Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other

- major serotypes>>. *267 Vet. Res.*,36:267–288. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005005>
- Whiley, H., & Ross, K. 2015. <<Salmonella and eggs: from production to plate.>>. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,12(3):2543–56. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302543>
- White, P. L., Baker, A. R., & James, W. O. 1997. <<Strategies to control Salmonella and Campylobacter in raw poultry products Summary>>. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*,16(2):525–541. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/6d7f/b2d629529f11e8a053d143da3d8d719fbda6.pdf>
- Zaheer, K. 2015. <<An Updated Review on Chicken Eggs: Production, Consumption, Management Aspects and Nutritional Benefits to Human Health>>. *Food and Nutrition Sciences*,6(6):1208–1220. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.613127>
- Zavala Castro, J. 2005. *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. (Universidad Autónoma de Yucatán, Ed.). Universidad Autónoma de Yucatán, Dirección General de Desarrollo Académico, Coordinación General de Extensión, Departamento Editorial. Retrieved from <https://books.google.com.gt/books?id=RcMak8yKAHcC&printsec=frontcover&dq=Castro,+Jorge.+2005.+Manual+de+técnicas+básicas+de+Biología+Molecular.+Ediciones+de+la+Universidad+Autónoma+de+Yucatán:+México.+195+pp&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjvhdtyzcnWAhWF0iYKHWKBB0>