



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella*
EN AVES DE CORRAL UTILIZANDO PRUEBAS BIOQUÍMICAS
Y PRUEBAS MOLECULARES.”**

AUTOR: RECALDE TIPANLUISA, JARE DOMINIQUE

DIRECTOR: PhD. AYALA NAVARRETE, LIGIA ISABEL

SANGOLQUÍ

2015



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella* EN AVES DE CORRAL UTILIZANDO PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PRUEBAS MOLECULARES**" realizado por la señorita **JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA** ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero de 2016

PhD. LIGIA ISABEL AYALA NAVARRETE

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA**, con cédula de identidad N° 171819534-8, declaro que este trabajo de titulación **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella* EN AVES DE CORRAL UTILIZANDO PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PRUEBAS MOLECULARES”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 27 de enero del 2016

JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA

C.C: 171819534-8



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Salmonella* EN AVES DE CORRAL UTILIZANDO PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PRUEBAS MOLECULARES**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero del 2016

JARE DOMINIQUE RECALDE TIPANLUISA

C.C: 171819534-8

DEDICATORIA

A mis adorados padres, que han sido el motor que me impulsa a superarme cada día más; que me han apoyado para que pueda terminar esta etapa de mi vida con el mayor de los éxitos; y que me han enseñado valores para enfrentar las situaciones de la vida.

A mis hermanos, por ser los compañeros que me alientan a seguir adelante y por compartir mis alegrías y tristezas.

Jare Dominique Recalde Tipanluisa

AGRADECIMIENTO

A mi Señor, por haberme regalado el don de la vida y porque a lo largo de mi camino por este mundo siempre me ha dado la fortaleza para seguir adelante y alcanzar mis metas.

A mis Padres, por brindarme la oportunidad de crecer cada día como ser humano.

A mis Maestros, que con nobleza y entusiasmo vertieron todos sus conocimientos en mí; y por haberme transmitido enseñanzas de vida a lo largo de mi paso por esta prestigiosa Institución.

A mi Universidad, porque en sus aulas recibí valiosas lecciones e inolvidables recuerdos.

Jare Dominique Recalde Tipanluisa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Hipótesis	3
1.5 Marco Teórico	3
1.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Salmonella spp.</i>	3
1.5.2 PATOGENICIDAD DE <i>Salmonella spp.</i>	6
1.5.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	11
1.5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR).....	12

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA.....	14
2.1 Participantes	14
2.2 Zona de estudio.....	14
2.3 Periodo de tiempo de investigación.....	14
2.4 Procedimiento	14
2.4.1 Muestreo	14
2.4.2 Procesamiento de las muestras.....	15
2.4.2.1 Pre-enriquecimiento.....	16
2.4.3 Identificación y Caracterización Bioquímica.....	17
2.4.4 Conservación de cepas purificadas	19
2.4.5 Caracterización molecular.....	19

CAPÍTULO III

RESULTADOS	25
3.1 Aislamiento de <i>Salmonella</i> y otras Enterobacterias	25
3.2 Caracterización Bioquímica.....	26
3.3 Caracterización Molecular	28
3.3.1 Extracción y Cuantificación de ADN genómico bacteriano ...	28
3.3.2 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR).....	28

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN	33
------------------------	-----------

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN	33
------------------------	-----------

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES	37
---------------------------	-----------

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES	38
REFERENCIAS	39

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Factores que afectan el crecimiento de <i>Salmonella spp.</i>	5
TABLA 2. Mercados seleccionados para el muestreo.....	15
TABLA 3. Características morfológicas de colonias que crecen en agar XLD y SS	17
TABLA 4. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas como parte de su caracterización	18
TABLA 5. Protocolo de incubación de la proteinasa K.....	20
TABLA 6. Primers seleccionados para la caracterización de <i>Salmonella</i>	21
TABLA 7. Criterios básicos para el diseño de primers	21
TABLA 8. Primers específicos para la identificación de <i>Salmonella enteritidis</i>	22
TABLA 9. Concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la caracterización de <i>Salmonella</i> con los primers US1F-US1R/S2012-S500	22
TABLA 10. Temperaturas y tiempos empleados para la amplificación de los genes <i>InvA</i> Y <i>FimC</i> de <i>Salmonella</i> realizado en un termociclador	22
TABLA 11. Concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la caracterización de <i>Salmonella</i> con los primers <i>SefA F/SefA R</i>	23
TABLA 12. Características de bacterias similares fenotípicamente a <i>Salmonella spp.</i> y controles positivos	25
TABLA 13. Características del control negativo y de otras enterobacterias aisladas	26
TABLA 14. Pruebas bioquímicas con dos repeticiones.....	26
TABLA 15. Prueba bioquímica API 20E	27
TABLA 16. Cuantificación de adn genómico de las bacterias aisladas. dónde: Se: <i>Salmonella enteritidis</i> , Si: <i>Salmonella infantis</i> , P: <i>Salmonella enterica</i> , En: <i>Enterobacter</i> , Ci: <i>Citrobacter</i> , Ps: <i>Pseudomona</i> Y Ec: <i>E. coli</i>	28

TABLA 17. Especificidad de las pruebas moleculares para la caracterización de <i>Salmonella</i>	29
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Antígenos de presentes en <i>Salmonella</i>	4
Figura 2. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	7
Figura 3. Mecanismo de invasión bacteriana a células eucariotas. A) Mecanismo de Cremallera B) Mecanismo de disparo.....	9
Figura 4. A. Pre-enriquecimiento Hisopados cloacales e hisopado de gallinero. B. Pre-enriquecimiento de muestras de heces.....	16
Figura 5. A. agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD). B. agar <i>Salmonella Shigella</i> (SS)	17
Figura 6. Colonias similares a <i>Salmonella</i> . A. <i>Salmonella enteritidis</i> . B. <i>Salmonella infantis</i> . C. Bacteria 1. D. Bacteria 2	25
Figura 7. Control negativo y otras enterobacterias aisladas. A. Bacteria 3. B. Bacteria 4. C. <i>E. coli</i>	26
Figura 8. Producto de PCR con los primers US1f /US1r que amplifican el gen de patogenicidad invA. Dónde: Se: <i>Salmonella enteritidis</i> , Si: <i>Salmonella infantis</i> , P: <i>Salmonella enterica</i> , En: <i>Enterobacter</i> , Ci: <i>Citrobacter</i> , Ps: <i>Pseudomona</i> , Sg(+): <i>Salmonella gallinarum</i> , Ec: <i>E. coli</i> y B: Blanco	29
Figura 9. Producto de PCR con los primers Salm3F/Salm4R que amplifican el gen de patogenicidad invA. Dónde: Se: <i>Salmonella enteritidis</i> , Si: <i>Salmonella infantis</i> , P: <i>Salmonella enterica</i> , En: <i>Enterobacter</i> , Ci: <i>Citrobacter</i> , Ps: <i>Pseudomona</i> , Sg(+): <i>Salmonella gallinarum</i> , Ec: <i>E. coli</i> y B: Blanco	30
Figura 10. Producto de PCR con los primers S212/S500 que amplifican el gen fimbrial fimC. Dónde: Se: <i>Salmonella enteritidis</i> , Si: <i>Salmonella infantis</i> , P: <i>Salmonella enterica</i> , En: <i>Enterobacter</i> , Ci: <i>Citrobacter</i> , Ps: <i>Pseudomona</i> , Sg(+): <i>Salmonella gallinarum</i> , Ec: <i>E. coli</i> y B: Blanco	30
Figura 11. Producto de PCR con los primers GSAL-F/GSAL-R que amplifican el operón de transporte de histidina. Dónde: Se: <i>Salmonella</i>	

enteritidis, **Si**: *Salmonella infantis*, **P**: *Salmonella enterica*, **En**: *Enterobacter*, **Ci**: *Citrobacter*, **Ps**: *Pseudomona*, **Sg(+)**: *Salmonella gallinarum*, **Ec**: *E. coli* y **B**: Blanco31

Figura 12. Producto de PCR con los primers ST11-ST15 que amplifican el gen JEO402-1. Dónde: **Se**: *Salmonella enteritidis*, **Si**: *Salmonella infantis*, **P**: *Salmonella enterica*, **En**: *Enterobacter*, **Ci**: *Citrobacter*, **Ps**: *Pseudomona*, **Sg(+)**: *Salmonella gallinarum*, **Ec**: *E. coli* y **B**: Blanco31

Figura 13. Producto de PCR con los primers sefAF/sefAR que amplifican el gen sefA. Dónde: **Se**: *Salmonella enteritidis*, **Si**: *Salmonella infantis*, **P**: *Salmonella enterica*, **En**: *Enterobacter*, **Ci**: *Citrobacter*, **Ps**: *Pseudomona*, **Sg(+)**: *Salmonella gallinarum*, **Ec**: *E. coli* y **B**: Blanco32

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TE	Buffer Tris EDTA
SS	Salmonella Shigella Agar
XLD	Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (Xilosa, Lisina, Desoxicolato)
TSI	Triple Sugar Iron (Agar triple azúcar-hierro)
MRVP	Rojo de metilo y Voges-Proskauer
IND	Indol
URE	Ureasa
LIS/LDC	Lisina descarboxilasa
ARG/ADH	Arginina deshidrolasa
ORN/ODC	Ornitina descarboxilasa
ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
CIT	Citrato
GLU	Glucosa
MAN	Manosa
INO	Inositol
SOR	Sorbitol

RHA	Rhamnosa
SAC	Sacarosa
MEL	Melobiosa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa

RESUMEN

La Salmonelosis es una enfermedad infecciosa que puede ser peligrosa e incluso mortal en personas y animales; es producida por bacterias del género *Salmonella*. El propósito de esta investigación es caracterizar bioquímica y molecularmente estas bacterias. Se recolectaron muestras de hisopados cloacales e hisopados del corral donde se encontraban las gallinas. Por otra parte, se tomaron muestras de diferentes órganos: molleja, intestino, bazo y corazón. Se realizó el aislamiento de *Salmonella* para lo cual se hizo un pre-enriquecimiento en agua triptona, posteriormente un enriquecimiento en caldo Tetracionato y caldo Rapaport Vasiliadis y finalmente se aislaron las cepas en agar XLD y en agar *Salmonella-Shigella*. Con las cepas aisladas se realizó una caracterización bioquímica y molecular. Como resultado de la caracterización bioquímica se logró determinar que las cinco bacterias más frecuentes correspondían a: 1) *Salmonella enterica*, 2) *Citrobacter freundii*, 3) *Enterobacter agglomerans* y 4) *Pseudomona fluorescens*. La caracterización molecular de *Salmonella* se realizó mediante PCR de cinco diferentes tipos de genes: *invA*, *fimC*, el operón de transporte de histidina, *JEO402-1* y *sefA*. Se observó la presencia de todos estos genes a excepción de *sefA*, lo cual demuestra que los mismos pueden ser utilizados para la detección de *Salmonella*, ya que tuvieron una alta sensibilidad y una alta especificidad.

Palabras Clave:

- **SALMONELLA**
- **BIOQUÍMICA**
- **CARACTERIZACIÓN**
- **PCR**
- **ESPECIFICIDAD**

ABSTRACT

Salmonellosis is an infectious disease affecting humans and animals, it is dangerous and even fatal, which is produced by bacteria of the genus *Salmonella*. Therefore, the purpose of this research is to use biochemical and molecular tests to characterize this bacteria. Cloacal swab, stool samples and swabs from the coop were taken. In addition, samples of different organs were taken, such as: gizzard, intestine, spleen and heart. Pre-enrichment was performed in tryptone water. Then enrichment was done in Tetrionate and Rappaport Vasiliadis broth, finally the strains were isolated in XLD agar and Salmonella-Shigella agar. Afterward, the strains that were isolated received a biochemical and molecular characterization. As a result of biochemical characterization it was determined that the five most common bacteria corresponded to: 1) *Salmonella enterica*, 2) *Citrobacter freundii*, 3) *Enterobacter agglomerans* and 4) *Pseudomonas fluorescens*. Molecular characterization of *Salmonella* was performed by PCR detection of five different genes: *invA*, *FimC*, the histidine transport operon, *JEO402-1* and *SefA*. The presence of these genes except *sefA* was observed, indicating that they can be used for the detection of *Salmonella*, since they had high sensitivity and high specificity.

Keywords:

- **SALMONELLA**
- **BIOCHEMISTRY**
- **CHARACTERIZATION**
- **PCR**
- **SPECIFICITY**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos gram negativos de la familia Enterobacteriaceae, se caracterizan por ser anaerobios facultativos no esporuladores (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008). En la actualidad se conocen cerca de 2700 serovares, de las cuales, la única no motil es la serovariedad *gallinarum-pollorum*. La *Salmonella* está ampliamente distribuida en el mundo y puede infectar diversos tipos de huéspedes, los mismos que pueden o no presentar síntomas de la infección. (UERIA, 2011)

Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella bongori* (V) y *Salmonella enterica*, siendo esta última la de mayor importancia sanitaria. *Salmonella enterica* spp. a su vez, se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). La subespecie entérica habitualmente se encuentra en animales de sangre caliente mientras que las subespecies II, IIIa, IIIb, IV y VI generalmente se encuentran en animales de sangre fría y en el medio ambiente; sin embargo, todas estas pueden infectar a los seres humanos. (Public Health Agency of Canada, 2011)

El método comúnmente utilizado en la detección de *Salmonella* es el método de cultivo, el mismo que consiste en un pre-enriquecimiento no selectivo, seguido de enriquecimiento selectivo y que finaliza en agares selectivos y de diagnóstico. Las colonias sospechosas se confirman bioquímicamente y serológicamente; la prueba completa requiere de un máximo de siete días para obtener un resultado confirmado (Jeníková, Pazlarová, & Demnerová, 2000). Los parámetros para la caracterización bioquímica dependen de la expresión fenotípica de los rasgos examinados, éstas pueden variar en función de las condiciones de cultivo e incubación, lo cual dificulta la correcta caracterización de la bacteria. Por tanto, una serie de métodos rápidos para la detección de *Salmonella* se

han desarrollado, siendo los moleculares los que permiten un diagnóstico en menor tiempo, aumentando la sensibilidad. (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008)

1.2 Justificación del problema

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica que ha sido causante de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial, puesto que tiene un alto índice de morbilidad y mortalidad; es, además, una de las ETAS (enfermedades transmitidas por los alimentos) más comunes y agresivas. En el Ecuador, se reportaron 9.908 casos de salmonelosis en el año 1990; para el año 2001 la cifra aumentó súbitamente a 18.772; sin embargo, esta cifra ha ido disminuyendo paulatinamente, registrándose en 2013 solamente 5.972 casos. (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2015)

La salmonelosis es producida por la bacteria entérica *Salmonella*, la cual se aísla con mayor frecuencia de aves de corral y productos avícolas; problema que tiene un papel crucial en la actualidad, ya que la avicultura ha tenido un vertiginoso desarrollo. El sector avícola tiene una participación del 13% dentro del PIB y además genera fuentes de empleo por lo cual aporta a la seguridad alimentaria. En los últimos años, según estudios de población avícola realizados por CONAVE, desde 1990 hasta el 2012 se ha producido un incremento del consumo de carne de pollo de 360%, mientras que el consumo de huevos ha tenido un crecimiento de alrededor del 60%.

Este incremento en el consumo de carne de pollo ha ayudado a la diseminación de la Salmonelosis, lo cual requiere tomar medidas para evitar que se produzca un brote de la enfermedad. Algo muy importante dentro del control de la enfermedad es la caracterización del agente infeccioso. En el caso de *Salmonella*, todavía se utilizan con mayor frecuencia los métodos convencionales de cultivo, los mismos que requieren por lo menos 3-11 días. A pesar de ser un método con un alto nivel de especificidad depende de la expresión fenotípica de la bacteria y además requiere mucho tiempo su ejecución. Por tanto es necesario

buscar nuevas alternativas que optimicen la caracterización de esta bacteria.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Aislar bacterias del genero *Salmonella* de aves de corral utilizando pruebas bioquímicas y pruebas moleculares para su caracterización.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar la especificidad de pruebas bioquímicas para la caracterización de *Salmonella spp.*
- Establecer un protocolo de extracción de ADN genómico bacteriano.
- Implementar protocolo de PCR como prueba molecular para la caracterización de *Salmonella spp.*
- Determinar la especificidad de pruebas moleculares en la caracterización de *Salmonella spp.*

1.4 Hipótesis

Las pruebas moleculares podrían ser aplicadas como un método más eficiente en la caracterización de *Salmonella spp.*

1.5 Marco Teórico

1.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Salmonella spp.*

El género *Salmonella* está formado por bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Una característica significativa de estas bacterias es que son capaces de crecer y multiplicarse fuera del organismo huésped permitiéndole tener mayores posibilidades de supervivencia. Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura o superficie (Figura 1). (Ricci-Tam, 2008)

El antígeno flagelar o antígeno H es específico para el género *Salmonella*, es decir, que no se presenta en ninguna otra enterobacteria. Además es altamente inmonogénico y se asocia con la formación de anticuerpos después de la infección o inmunización. El antígeno H puede

presentarse de dos formas, fase I o fase específica y fase II o fase grupal; el organismo tiende a cambiar de una fase a otra, sin embargo, estudios demuestran que más del 80% de los antígenos flagelares son de Fase I y han sido designados con las letras minúsculas del alfabeto (a-z) y subsecuentemente de z1-z68. La presunta identificación de los serotipos se basa en la identificación de los antígenos en Fase I. Por otro lado, la Fase II se conoce como una fase grupal o no específica, ya que varias especies de *Salmonella* muestran los mismos antígenos cuando están en esta fase. (Parija, 2009)

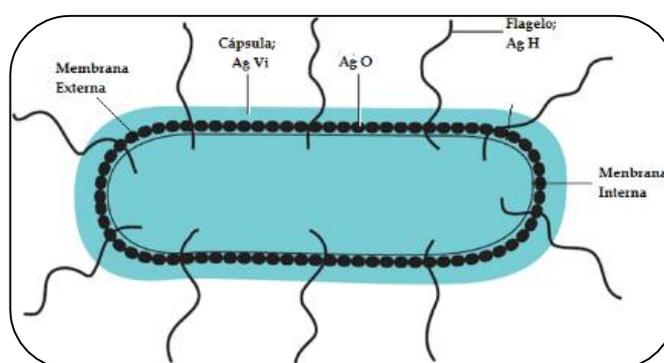


Figura 1. Antígenos de presentes en *Salmonella*
Adaptado de: (Mahon, Lehman, & Manuselis, 2011)

El antígeno somático o antígeno O se encuentran en la superficie de la membrana externa y está formado por secuencias de azúcares específicas de la pared celular. Este antígeno es un Lipopolisacárido (LPS) complejo y es una parte integral de la pared celular. Los antígenos somáticos son menos inmunogénicos que los antígenos flagelares; generalmente los anticuerpos O se producen después de la infección o la inmunización es más baja que la de los anticuerpos H. El antígeno O es un mosaico de dos o más factores antigénicos y hasta el momento se conocen 67 antígenos O. *Salmonella* se clasifica basándose en la presencia de un antígeno somático característico en la superficie celular, por lo cual se tiene 46 serotipos O en este género bacteriano. (Parija, 2009)

Dentro de los antígenos de superficie tenemos: antígeno M y N, antígeno F y Vi. Los antígenos M y N son polisacáridos que se encuentran en la superficie de la bacteria y previenen la aglutinación provocada por el

antisuero O. El antígeno F está presente en la fimbrias y puede presentarse en dos fases, una con el antígeno F y otra sin el mismo. El antígeno Vi se superpone al antígeno O, está relacionado con la virulencia de la bacteria y solo se presenta en algunos serotipos. Este antígeno es inmunogénicamente pobre y está asociado con una baja producción de anticuerpos durante la infección. (Parija, 2009)

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* no fermentan lactosa, producen ácido sulfúrico, hidrolizan urea y fenilalanina, reducen el nitrato a nitrito y son capaces de fermentar una gran variedad de hidratos de carbono. Otras características prominentes son que no producen indol y que dan un resultado negativo para la prueba de Voges-Proskauer. La mayoría de los serotipos utilizan citrato, dulcitol y pueden descarboxilar lisina, arginina y ornitina. (Kumar, 2012)

Además, estos microorganismos, tienen la capacidad de crecer en un rango de temperatura entre 7- 49°C; sin embargo, algunos serotipos pueden crecer a 5.9 °C. A temperaturas menores a 15 °C existe una reducción en el crecimiento bacteriano. Además, la *Salmonella* puede crecer a un pH que varía entre 4 y 9; la tolerancia al ácido va a depender del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo. (UERIA, 2011)

Tabla 1.
Factores que afectan el crecimiento de *Salmonella spp.*

Condiciones	Mínima	Óptima	Máxima
Temperatura (°C)	5,2	35-43	46,2
pH	3,8	7-7,5	9,5
Actividad acuosa (a_w)	0,94	0,99	>0,99

Fuente: (Food Safety Authority of Ireland, 2011)

Una característica cada vez más común de las cepas de *Salmonella* es que son más resistentes a los antibióticos. En lugar de una adaptación temporal, algunas cepas han desarrollado resistencia multi-fármacos (MDR), lo cual ha comenzado a formar parte de su genética fundamental. Hasta el momento se conoce que son resistentes a las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. (Ricci-Tam, 2008).

1.5.2 PATOGENICIDAD DE *Salmonella spp.*

Uno de los patógenos entéricos de mayor importancia es *Salmonella spp.*, la cual puede ser responsable de severas infecciones gastrointestinales que inclusive pueden llegar a comprometer la vida del paciente. El nivel de gravedad de la infección va a depender de la especie de *Salmonella*, tamaño del inóculo, factores de virulencia, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica.

1.5.2.1 Factores de virulencia

Los factores responsables de la virulencia en *Salmonella* son complejos, por lo cual han sido objeto de especulación (Figura 2). Sin embargo, se han mencionado algunos factores de gran importancia, tal es el caso de las fimbrias, las cuales participan en la adhesión al inicio de la infección intestinal, se ha observado que las cepas con fimbrias son más virulentas que las cepas que no poseen dichas estructuras. Otro factor que contribuye a la virulencia de *Salmonella* es su capacidad para atravesar la mucosa intestinal. Además, un factor importante de virulencia es la enterotoxina, la cual es producida por ciertas cepas y es la responsable de la gastroenteritis. (Mahon, Lehman, & Manuselis, 2011)

Sistemas de secreción Tipo III (T3SS). Consisten en cerca de 20 proteínas que facilitan la secreción de factores de virulencia en las células huésped. Estas son codificadas por varias islas de patogenicidad de *Salmonella*, tales como las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y la isla de patogenicidad 2 (SPI-2). Se ha demostrado que la ausencia de estas hace que el organismo no sea virulento. T3SS es el mediador en la captación de la bacteria en las células epiteliales. SPI-1 interviene en la invasión de células no fagocíticas y SPI-2 facilita la supervivencia y la reproducción de *Salmonella* dentro de los macrófagos. (Parija, 2009)

Endotoxinas. Son parte de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y están asociadas con el complejo lipopolisacárido (LPS). La toxicidad se asocia con el componente lipídico y la inmunogenicidad se asocia con los componentes de polisacáridos. LPS es el

causante de provocar las respuestas inflamatorias en un animal. (Todar, 2012)

Fimbrias. Están compuestas de una mezcla heterogénea de proteínas y representan a un diverso grupo operones que regulan las diferentes etapas de la infección. Además son las que inician la interacción con la superficie celular del huésped. (Jones, 2013)

Gen de respuesta de tolerancia a los ácidos (ATR). Protege a la *Salmonella* de los ácidos del estómago y del pH ácido del fagosoma, facilitando así la supervivencia de las bacterias. (Mahon, Lehman, & Manuselis, 2011)

Catalasa y superóxido dismutasa. Son las enzimas que protegen a las bacterias de la muerte intracelular en los macrófagos. (Mahon, Lehman, & Manuselis, 2011)

Los diferentes factores de virulencia presentes en *Salmonella* se ilustran en la Figura 2.

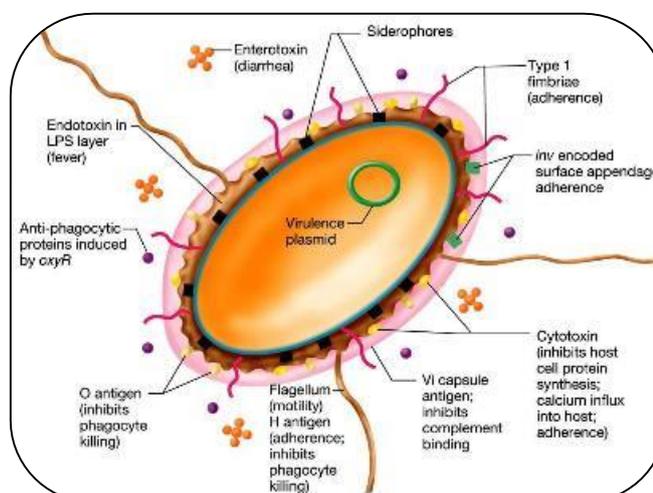


Figura 2. Factores de virulencia de *Salmonella*
Fuente: (Hannah)

1.5.2.2 Mecanismos de Adherencia

Una parte esencial en la patogenicidad de un microorganismo es su capacidad de supervivencia, la cual está definida por su habilidad para adherirse. Las bacterias poseen proteínas específicas denominadas adhesinas que les permiten reconocer receptores específicos para cada una

de ellas. En las bacterias Gram negativas las adhesinas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS). Existen reportes de que las *Salmonellas* expresan una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión. (Figueroa y Verdugo 2005)

Un patógeno bacteriano, después de ingresar al hospedador, puede adherirse directamente a la superficie de la célula o a la matriz extracelular. La Fimbria SEF17 es la que participa en este proceso de adherencia. Por otra parte, en cada una de las variedades de *S. enterica* se han encontrado diferentes operones que participan en la adhesión celular, los genes de cada uno de estos se expresan cuando las condiciones físico químicas dentro del hospedador son adecuadas. (Figueroa & Verdugo, 2005)

La interacción entre la bacteria y el hospedador estimula la activación de caminos de señalización en el huésped, lo cual puede alterar la superficie de la misma, proporcionando de esta manera receptores de adhesinas alternos al patógeno. La colonización y supervivencia de la bacteria va a depender de la especificidad del receptor por una determinada adhesina. (Figueroa & Verdugo, 2005)

1.5.2.3 Mecanismos de invasión

Salmonella puede inducir su propia entrada a los enterocitos, pero las células M y la expresión de CD18 por parte de los fagocitos también facilitan su translocación a través del epitelio intestinal. Durante la gastroenteritis, la colonización está restringida al tracto intestinal; sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de propagarse por medio del CD18 a sitios extraintestinales. (Rosselin, y otros, 2012)

Las bacterias patogénicas han desarrollado dos mecanismos diferentes para invadir las células huésped no fagocíticas, los cuales se basan en el secuestro de los procesos fisiológicos y en el reordenamiento de las fibras de actina en dichas células, como se muestra en la Figura 3. Algunas bacterias expresan proteínas de superficie que interactúan con los receptores de la membrana plasmática de la célula huésped, lo cual conduce a la activación de vías de señalización que originan un reordenamiento de las fibras de actina en el citoesqueleto. Este proceso se conoce como

mecanismo de Cremallera o Zipper y se caracteriza por inducir una reorganización de la membrana plasmática. (Rosselin, y otros, 2012)

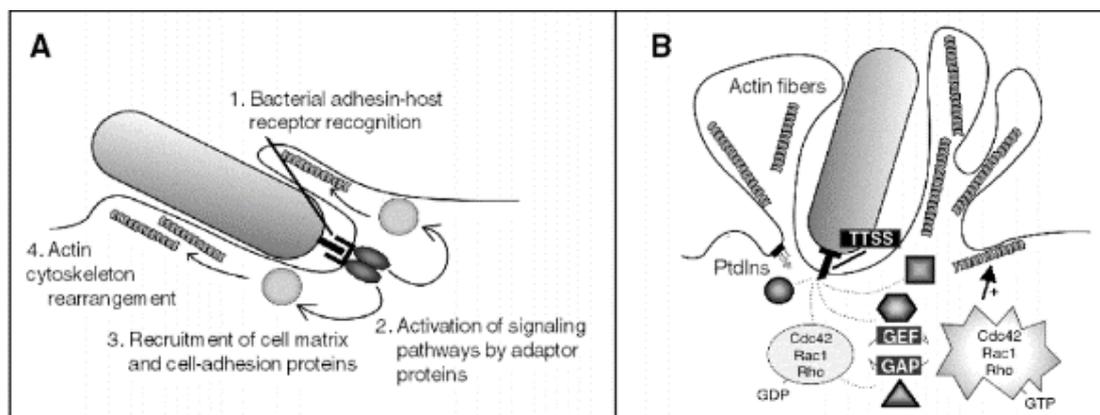


Figura 3. Mecanismo de invasión bacteriana a células eucariotas. A) Mecanismo de Cremallera B) Mecanismo de disparo

Fuente: (Alonso & Gracia, 2004)

Otras bacterias, por el contrario, no requieren un receptor sino que mediante un sistema especializado de secreción de proteínas pueden atravesar la membrana plasmática e inyectar proteínas al citoplasma. Estas proteínas translocadas permiten que las bacterias puedan secuestrar muchos procesos intracelulares esenciales e inducir una reorganización masiva del citoesqueleto de la célula atacada, dando lugar a la formación de un ondulamiento (ruffling) en su superficie y promoviendo de esta manera la internalización de las bacterias. Este proceso de invasión se conoce como un mecanismo de disparo. Estudios recientes demuestran que las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* pueden utilizar ambos mecanismos de invasión para ingresar a la célula huésped. (Rosselin, y otros, 2012)

1.5.2.4 Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)

Algunos genomas completos de *Salmonella* están reportados en las bases de datos, lo cual ha sido de gran importancia para estudios de epidemiología, especificidad del hospedero y patogénesis. Estos estudios han permitido detectar la presencia de pseudogenes, profagos funcionales, islas e islotes de patogenicidad, los cuales están formados por un grupo de genes que codifican factores específicos de virulencia. Hasta el momento se han descrito 17 islas de patogenicidad (SPI-1 a SPI-17). (Figuroa y Verdugo 2005)

En general, se conoce que SPI-1 contiene genes que se encargan de promover la invasión de las células epiteliales intestinales y de iniciar la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal; además tienen un papel importante en la sobrevivencia y persistencia de la bacteria a nivel sistémico del hospedero. Por otra parte, la isla de patogenicidad SPI-2 es la encargada de la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de los fagocitos, desde donde se diseminará la bacteria sistémicamente en los órganos del hospedero (Figueroa & Verdugo, 2005). Tanto SPI-1 como SPI-2 son responsables de la decodificación del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), el cual se constituye como una maquinaria de transporte de proteínas bacterianas semejante a una aguja hipodérmica hueca anclada a un cuerpo basal. (Ly & Casanova, 2007)

El T3SS está formado por 3 tipos de proteínas: componentes estructurales de sistema de inyección, efectores o sustratos de secreción y factores reguladores de la expresión de proteínas estructurales y efectoras (Vilches, 2007). Este sofisticado aparato de inyección está constituido por más de 20 proteínas que se ensamblan entre ellas y se extiende tanto por la membrana interna como por la membrana externa de la bacteria para posteriormente insertarse dentro de la membrana plasmática de la célula hospedadora y permitir la translocación de los efectores dentro de la misma (Ly & Casanova, 2007).

Una de las proteínas más importantes para el ensamblaje del Sistema de Secreción Tipo III es la proteína *invA* dependiente del gen de invasión (*invA*), el cual forma organelas que permiten el ingreso de los efectores al citoplasma de las células del hospedador (Figueroa y Verdugo 2005). Por otra parte tenemos que las proteínas efectoras suelen interferir con vías de transducción de señales de la célula infectada para posibilitar la entrada o la supervivencia del patógeno. La virulencia de estas bacterias depende en gran medida de las islas de patogenicidad SPI1 y SPI2, ya que entre los dos secretan más de 30 efectores. (Ramos, y otros, 2014)

Las condiciones ambientales en el íleon distal inducen la expresión coordinada tanto de la SPI-1 T3SS y las proteínas efectoras que son transportados a través de él. Mientras que un subconjunto de los efectores

translocados están codificados dentro del locus SPI-1. A su llegada a la superficie epitelial, cada bacteria expresa entre 10 y 100 ensamblajes de T3SS y un arsenal de moléculas efectoras solubles listas para ser liberadas. (Ly & Casanova, 2007)

Recientes experimentos de imagen en tiempo real han demostrado que el cúmulo almacenado de dos efectores diferentes, como *SipA* y *SopE*, se traslocan completamente dentro de 80 a 200 s. Aparentemente esta translocación regulada requiere el montaje de un poro de translocación o translocón en la membrana plasmática de la célula huésped, que se cree que está compuesto por las proteínas bacterianas *SipC* y *SipB*. Recientes estudios demuestran que el colesterol celular es necesario para la translocación de las proteínas efectoras y sugieren que el colesterol puede desencadenar el montaje del translocón. (Ly & Casanova, 2007)

1.5.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

En la actualidad se siguen utilizando métodos convencionales para la identificación bacteriana, ya que su realización y coste los hace más accesibles. Estos esquemas tradicionales de identificación están basados en las características fenotípicas de las bacterias, tales como son la morfología, propiedades bioquímicas y metabólicas. Es importante tomar en cuenta que se debe hacer una adecuada elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación, ya que de estas condiciones va a depender la expresión de parámetros que serán analizados. (Fernández, y otros 2010)

Las pruebas bioquímicas son sistemas fenotípicos para identificar bacterias y son los que más comúnmente se utilizan, sin embargo, tienen varios inconvenientes, ya que en ocasiones pueden ser inestables y la expresión puede depender de cambios en las condiciones ambientales, por ejemplo, sustrato de crecimiento, la temperatura y los niveles de pH. Otro inconveniente que presentan estos sistemas es que no reflejan con precisión toda la extensión de la complejidad genómica de una especie dada. (Janda y Abbott 2002)

1.5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR)

Las técnicas moleculares han superado algunas de las limitaciones de los procedimientos fenotípicos tradicionales para la detección y caracterización de bacterias. Mediante el uso de ensayos basados en ADN se puede detectar fácilmente cepas bacterianas directamente de muestras clínicas o de pequeñas cantidades de células bacterianas cultivadas independientemente de las condiciones ambientales, lo cual demuestra que es una prueba altamente sensible; además permite disminuir el tiempo requerido para la identificación bacteriana. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido es particularmente útil en este sentido, ya que se basa en secuencias de cebadores diseñados para reconocer cualquier nivel de especificidad: cepa, especie o género. (Premier Biosoft, 2015)

La reacción en cadena de la polimerasa tiene como objetivo obtener muchas copias de un fragmento de ADN, para lo cual utiliza un mecanismo de la replicación in vitro: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. (Somma y Querci s.f.)

Básicamente es un proceso que se lleva a cabo en un ciclo repetitivo de tres fases: En primer lugar es necesario la desnaturalización de ADN, que es la separación de las dos cadenas que conforman a esta molécula. Esta primera fase se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C. Posteriormente se produce un descenso de la temperatura, lo cual permite que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde. Esta segunda fase se conoce como Hibridación. Finalmente, se produce la fase de elongación o extensión, que consiste en la incorporación de nucleótidos complementarios, por parte de la enzima polimerasa, a partir del extremo 3' libre de la región en donde genera la hibridación. (Pérez s.f.)

Existen cuatro componentes básicos que son necesarios incorporar en la PCR:

- *ADN Molde*. Es la secuencia a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que queremos amplificar.
- *Taq DNA polimerasa*. Es una enzima termoestable que cataliza la polimerización de nucleótidos. La reacción se lleva a cabo en un tampón

apropiado para el funcionamiento de la enzima y se debe añadir cationes divalentes como cofactores de la reacción, generalmente se emplea cloruro de magnesio. (Pérez s.f.)

- *Iniciadores, cebadores o primers*. Son secuencias de oligonucleótidos, los cuales delimitan la secuencia que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Por lo general, su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia, caso contrario, se podrían formar dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo 2013)
- *dNTPs*. Son los elementos estructurales del ADN y son los que van a formar la cadena complementaria a la cadena molde, proceso que es llevado a cabo por la ADN polimerasa, la misma que va incorporando los nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. (Pérez s.f.)

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Participantes

El presente proyecto “Aislamiento de bacterias del género *Salmonella* de aves de corral utilizando pruebas bioquímicas y pruebas moleculares para su caracterización” fue financiado por el Laboratorio de Inmunología y Virología perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas – E.S.P.E.

Los controles positivos de *Salmonella* se obtuvieron de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. Además, se adquirió ADN de *Salmonella gallinarum* del Group Leader "Signalling, carriage and bacterial virulence" de INRA - Nouzilly Universidad de Tours, situada en Tours, Francia.

2.2 Zona de estudio

Para la ejecución del presente proyecto, se recolectaron muestras de hisopados cloacales y heces de pollos de una granja artesanal ubicada en la parroquia Alangasí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. Las muestras de órganos se obtuvieron de 3 lugares seleccionados aleatoriamente: Mercado de la Ofelia, ubicado en el Norte del cantón Quito; Mercado del Camal, ubicado en el sur de la capital y el Mercado de San Pedro, cantón Rumiñahui.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

La investigación tuvo un tiempo de duración de 12 meses.

2.4 Procedimiento

2.4.1 Muestreo

Se recolectaron muestras de hisopados cloacales, para lo cual se humedecieron hisopos estériles con suero fisiológico y se realizó un frotis en la cloaca de las gallinas, también se efectuó un frotis del gallinero. Los hisopos con la muestra se colocaron en tubos con agua triptona. En total se muestrearon 8 gallinas. En el mismo lugar se tomaron muestras de heces y

se colocaron en frascos estériles. Finalmente las muestras refrigeradas fueron transportadas al laboratorio.

Las muestras de órganos se refrigeraron y se llevaron al laboratorio. En la tabla 2, se indica los mercados seleccionados y el tipo de muestra recolectada en cada uno.

Tabla 2.
Mercados seleccionados para el muestreo

Origen muestra	Tipo de muestras
Mercado de la Ofelia	Hígado, corazón, molleja
Mercado de Cotocollao	Hígado, corazón, molleja
Mercado el Camal	Intestino, bazo, hígado
Peladora de pollos de San Pedro	Intestino, bazo, hígado

Fuente: Recalde, 2015

Los controles positivos de *Salmonella*, *S. infantis* y *S. enteritidis*, se obtuvieron de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, ubicada en el Distrito Metropolitano de Quito. De acuerdo con los datos proporcionados, se conoce que dichas bacterias son patogénicas y fueron aisladas de muestras de pollos. El control negativo fue una *E. coli* aislada del río San Pedro.

2.4.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron en función del protocolo dado por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15:2009: Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*, método de detección (Instituto ecuatoriano de normalización, 2009). El procedimiento comienza con un pre-enriquecimiento en agua Peptona, lo cual permite que las bacterias se recuperen de daños producidos por el estrés de causado por el transporte. Luego, se realizó un enriquecimiento con dos caldos selectivos, esto con el objeto de permitir el crecimiento selectivo de *Salmonella* y sus formas compatibles, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias intestinales y coliformes. Se finalizó con la siembra en dos medios de cultivo sólidos selectivos, lo cual inhibe el crecimiento de otras bacterias y permite el

reconocimiento de *Salmonella* por medio de características bioquímicas diferenciales propias de ella.

2.4.2.1 Pre-enriquecimiento

Hisopados cloacales e hisopado de gallinero. Las muestras se incubaron en agua Triptona (Figura 4) con agitación a 37 °C por 24 horas.

Heces. Se tomó aproximadamente 1 gr. de muestra y se colocó en 10 mL de agua Triptona (Figura 4) e incubó con agitación a 37 °C por 24 horas.



Figura 4. A. Pre-enriquecimiento Hisopados cloacales e hisopado de gallinero. B. Pre-enriquecimiento de muestras de heces
Fuente: Recalde, 2015

Órganos. Se realizaron dos métodos de pre-enriquecimiento. En el primer método, 5 gr. de intestino, hígado, molleja, corazón y bazo se cortaron asépticamente en pedazos finos y se añadieron en fundas plásticas con 45 mL de agua Triptona, se dejó en suspensión por 3 horas y posteriormente se transfirió el líquido a un frasco estéril. Para el segundo método, se hizo una modificación del método anterior, se homogenizó 5 gr. de cada órgano licuándolos por 1 minuto en 50 mL de agua Triptona. Los frascos con las muestras procesadas con ambos métodos se incubaron a 37 °C durante 18 h.

2.4.2.2 Enriquecimiento

Luego de las 18 horas de pre-enriquecimiento, se transfirió 100 µL del cultivo a 10 mL de caldo Rapaport Vassiliadis y se dejó incubar con

agitación a 41 °C durante 24 y 48 horas. Adicionalmente, en otro tubo se agregó 1mL de agua peptona tamponada a 9 mL de caldo Tetrionato y se incubó con agitación 37 °C durante 24 y 48 horas.

2.4.2.3 Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos

Después del tiempo de incubación, se homogenizaron las muestras de los tubos y se sembró por estriación mediante un asa de inoculación, en dos medios selectivos, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y agar *Salmonella Shigella* (SS) (figura 5). Finalmente, se incubaron las muestras a 37°C por 24 horas.

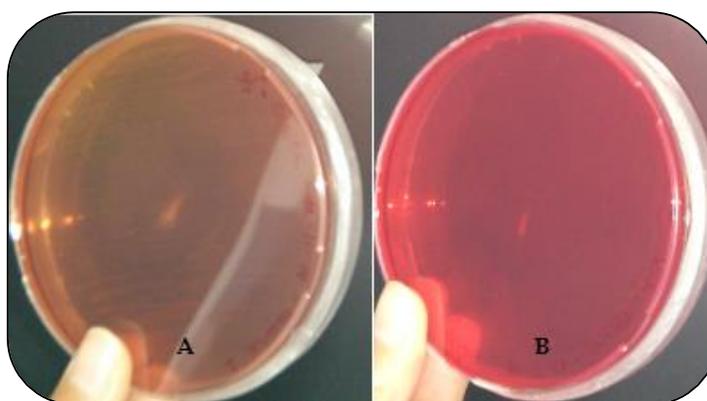


Figura 5. A. agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD). B. agar *Salmonella Shigella* (SS)
Fuente: Recalde, 2015

2.4.3 Identificación y Caracterización Bioquímica

Se aislaron y purificaron colonias en medio XLD y SS (Tabla 3).

Tabla 3.

Características morfológicas de colonias que crecen en agar XLD y SS

Medio de Cultivo	<i>Colonias Salmonella</i>	<i>Colonias Shigella</i>	<i>Colonias Coliformes</i>
Agar XLD	Rosas o rojas con o sin punto central negro	Transparentes sin punto central negro	Pequeñas y amarillas por la fermentación de lactosa
Agar SS	Incoloras con o sin punto central negro	Incoloras, sin punto central negro	Pequeñas y amarillas por la fermentación de lactosa

Fuente: (Universidad de Sevilla, s.f.)

Se hizo un sub cultivo en caldo nutritivo de los cultivos puros de las bacterias aisladas y se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizaron 13 pruebas bioquímicas para la identificación de cada bacteria (Tabla 4).

Tabla 4.
Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas como parte de su caracterización

Prueba	Medio de cultivo		Resultado	
			Positivo	Negativo
Motilidad	SIM		Difuminación de la bacteria hacia los lados	La bacteria sólo crece en la línea de inoculación
Catalasa	1 gota de H ₂ O ₂ a una colonia		Efervescencia	Permanece igual
Oxidasa	Discos de oxidasa		Color púrpura o negro	No hay cambio de color
MRVP (rojo de metilo)	Caldo MR-VP	2 a 3 gotas de Rojo de Metilo	Rojo	Amarillo
MRVP (Voges-Proskauer)	Caldo MR-VP	10 gotas de α naphthol 5 gotas KOH 40%	Color rosa	Sin cambio de coloración
Indol	SIM	2 a 3 gotas del reactivo de Kovac	Rojo (anillo)	Amarillo
H₂S	SIM		Negro	Medio de cultivo se qued igual
	Agar de Tres azucares y Hierro (TSI)		Negro	Medio de cultivo se qued igual
Citrato	Citrato Simmons		Azul	Verde
Producción de gas	Campana de durham	Caldo Glucosa	Burbuja en la campana	No se produce burbuja
Glucosa	Pruebas de fermentación			
Lactosa	de hidratos de carbono (Rojo Fenol)	Caldo nutritivo modificado	Amarillo	Rojo
Maltosa				
Sacarosa				
TSI	Agar de Tres azucares y Hierro (TSI)		Utilización de glucosa: Rojo/Am Utilización de Lactosa y/sacarosa: Am/Am	Utilización de peptonas: Rojo/Rojo

Fuente: (Benson, 2001)

Para confirmar los resultados obtenidos, se inocularon las colonias aisladas en el Kit API 20E para la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos; se incubó durante 24 a 48 h a 37 °C. Se leyó las galerías a las 24 y 48 horas de incubación y se comparó con el perfil bioquímico obtenido con la base de datos del sistema API 20E.

2.4.4 Conservación de cepas purificadas

Las cepas purificadas se conservaron en caldo nutriente con 20% de su volumen de glicerol. Cada cepa se incubó en caldo nutritivo por 24 horas, luego se colocó 800 μ L en un tubo de 2ml, después se agregó 200 μ L de glicerol. Finalmente se congeló en nitrógeno líquido y se lo conservó a -80 °C.

2.4.5 Caracterización molecular

2.4.5.1 Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN genómico bacteriano se estableció en función de los protocolos descritos en: “Rapid and Sensitive Strategy for *Salmonella* Detection Using an InvA Gene-Based Electrochemical DNA Sensor” (Li, y otros 2012) y “An optimized affordable DNA-extraction method from *Salmonella enterica enteritidis* for PCR experiments” (Karimnasab, y otros 2013).

Se colocó 1.5 mL del cultivo bacteriano de 24 horas de crecimiento en un tubo eppendorf y se centrifugó a 4000 r.p.m. por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y en el mismo tubo, se agregó nuevamente 1.5 mL del cultivo bacteriano re-suspendiendo el pellet por pipeteo. Se repitió el mismo procedimiento (pasos 2,3 y 4) hasta obtener una considerable cantidad de pellet. Luego se añadió 500 μ L de Buffer TE 1X para lavar el pellet, se centrifugó a 4000 r.p.m. por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

El pellet re-suspendido en 200 μ L de TE 1X, se sometió a un shock térmico colocando los tubos en agua hirviendo por 15 minutos y enseguida sumergiéndoles en agua con hielo por 5 minutos. Terminado este proceso se centrifugó a 12000 r.p.m. por 10 minutos, se tomó 54 μ L del sobrenadante, se colocó en un tubo de 0,2 μ L y se agregó 6 μ L de Proteínasa K (10 mg/mL). Finalmente se incubó en el Termociclador C1000 Touch™ de Bio Rad; la incubación se hizo siguiendo el protocolo que se muestra a continuación en la tabla 5.

Tabla 5.
Protocolo de Incubación de la Proteinasa K

	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	60 °C	1 hora
Desnaturalización	95 °C	15 minutos
Holding	12 °C	∞

Fuente: Recalde, 2015

2.4.5.2 Determinación de la concentración y pureza de las muestras de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con el NANODROP™ 2000 y se siguió el procedimiento establecido en el manual del equipo. En primer lugar se seleccionó la aplicación de Ácidos nucleicos del menú inicial del sistema del espectrofotómetro, además se designó ng/μL como unidad de la cuantificación, factor de dilución 1 y ADN 50 como factor para medir. A continuación, se limpió el lector con papel absorbente y con una pipeta se colocó 2μL de TE 1X, buffer con el que se diluyó el ADN extraído, lo cual permitió la calibración del equipo y para encerrarlo. Luego se colocó 2μL de la muestra y se realizó la medición anotando los valores de concentración en ng/μL. Para cada nueva lectura se realizó una limpieza del equipo con TE.

Luego de la cuantificación de ADN, se diluyeron las muestras a una concentración de 100 ng/μL, esto con la finalidad de que haya homogeneidad en el protocolo de PCR.

2.4.5.3 Selección y diseño de primers

En función de la revisión bibliográfica se seleccionaron diferentes genes de importancia para la detección de *Salmonella spp.*, entre los que se encuentran: un gen determinante de patogenicidad denominado *invA*; genes que codifican fimbrias de adherencia como *fimC* y *sefA*, también se seleccionó al gen *JEO402-1* y al operón de transporte de histidina, ya que son regiones altamente conservadas en todas las especies de *Salmonella* (Tabla 6).

Tabla 6.
Primers seleccionados para la caracterización de *Salmonella*

Primer	Secuencia	Tamaño	Gen	Referencia
GSAL-F	ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGGTG	496 bp	Operón de transporte de histidina	(Cohen, Neibergs y McGrud 1993)
GSAL-R	ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA			
S212	AAACGTTTATCGTTACGCCG	289 bp	<i>fimC</i>	(Drahovská, y otros 2001)
S500	ATCTTGAGATGGTTGCCGAC			
ST11	AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA	429 bp	<i>JEO402-1</i>	(Aabo, y otros 1993)
ST15	GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG			
SALM-3F	GCTGCGCGCGAACGGCGAAG	389 bp	<i>invA</i>	(Ferretti, y otros 2001)
SALM-4R	TCCCGGCAGAGTTCCCAT			
SelfA2	GCCGTACACGAGCTTATAGA	310 bp	<i>sefA</i>	(Amini, y otros 2010)
SelfA4	ACCTACAGGGGCACAATAAC			
US1f	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCA A	290 bp	<i>invA</i>	(Malorny, Bunge y Helmut 1993)
US1r	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC			

Fuente: Recalde, 2015

Además, para la identificación de *Salmonella enteritidis*, se diseñó un par de primers en base a la secuencia del gen *SefA* descrita en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y cuyo número de acceso es CP008928.1/ región: 2867677-2868174. Los primers se diseñaron utilizando el programa Primer3web versión 4.0.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>), donde se ingresó la secuencia en formato FASTA y se establecieron los criterios para la generación de las secuencias de primers (Tabla 7).

Tabla 7.
Criterios básicos para el diseño de Primers

Características	Rango o criterio óptimo
Tamaño de primer	20 - 23 pb
Tamaño del amplicón	300 - 400 pb
Temperatura de Fusión	60 °C - 65 °C
% G-C	40% - 60%

Fuente: Recalde, 2015

En función de los criterios citados se seleccionó el mejor par de primers (Tabla 8). Se comprobó la especificidad del mismo a través de un

alineamiento en el programa bioinformático Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 8.

Primers específicos para la identificación de *Salmonella enteritidis*

Primers	Longitud	Secuencia	Gen	Tamaño Amplicón
SefA F	23	GGTAACAAAGCAGAGGTTTCAGGC	SefA	302
SefA R	23	GCAAGCCCGTCAATTCCAGTATT		

Fuente: Recalde, 2015

Las secuencias de los primers fueron enviadas a sintetizar a la casa comercial Invitrogen™ a través de un distribuidor autorizado en el país. Los primers se re-suspendieron a una concentración de 100 µM en buffer TE 1X y se almacenaron a -20 °C.

2.4.5.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Las concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la caracterización de *Salmonella* con los pares de primers US1f- US1r y S2012-S500, específicos para los genes *invA* y *fimC*, respectivamente se detallan en la tabla 9 y el programa utilizado en la tabla 10.

Tabla 9.

Concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la caracterización de *Salmonella* con los primers US1f- US1r/S2012-S500

Reactivo	Stock	Concentración Final	Volumen por reacción (µL)
H2O	N/A	N/A	12
Buffer	10X	1X	2
MgCl2	50 Mm	1,5 Mm	0,6
dNTPs	40 mM	0,8 Mm	0,4
Primer Forward	10 µM	0,2 µM	0,4
Primer Reverse	10 µM	0,2 µM	0,4
Taq	5 U/µL	0,05 U	0,20
ADN	100 ng/ µL		4
Volumen Total			20 µL

Fuente: Recalde, 2015

Tabla 10.

Temperaturas y tiempos empleados para la amplificación de los genes *invA* y *fimC* de *Salmonella* realizado en un termociclador

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5 min	1

	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación de los primers	65	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	1 min	1
Holding	4	∞	1

Fuente: Recalde, 2015

Para los pares de primers, ST11/ST15, Salm3F/Salm4R y GSAL-F/GSAL-R, específicos para los genes *JEO402-1*, *invA* y el operón de transporte de Histidina, respectivamente. Se utilizaron los mismos volúmenes de reacción; adicionalmente se agregó glicerol al 5% (v/v) como coadyuvante para estabilizar la DNA polimerasa y proporcionar mayor especificidad a los primers. Las temperaturas y tiempos empleados para la amplificación de estos genes fueron iguales a los que se muestran en la tabla 10, a excepción del número de ciclos, que en algunos casos se disminuyó a 30.

La amplificación del gen *sefA* con el par de primers selfA2/selfA4 se realizó utilizando las concentraciones y los volúmenes de reacción especificados en la tabla 9, con la variación de la concentración final de los primers, ya que aumentó a 0,5 μM . Se efectuó un gradiente de temperatura de 50 °C a 60 °C con el mismo programa de termociclador detallado en la tabla 10.

Para el par de primers *sefA F/sefA R* se utilizó las concentraciones y los volúmenes de reacción que se detallan en la tabla 11 y el programa de termociclador fue igual al que se muestra en la tabla 10, a excepción de la temperatura de hibridación y número de ciclos disminuyó a 58 °C y 30, respectivamente.

Tabla 11.

Concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la caracterización de *Salmonella* con los primers *sefA F/sefA R*

Reactivo	Stock	Concentración Final	Volumen por reacción (μL)
H ₂ O	N/A	N/A	10,45
Buffer	10X	1X	2
MgCl ₂	50 mM	1,5 Mm	0,6

Reactivo	Stock	Concentración Final	Volumen por reacción (µL)
dNTPs	40 mM	0,8 mM	0,4
Primer Forward	10 µM	0,5 µM	1
Primer Reverse	100 µM	0,5 µM	0,10
Taq	5 U/µL	0,05 U	0,20
Glicerol			1,25
ADN	100 ng/ µL		4
Volumen Total			20

Fuente: Recalde, 2015

La estandarización de los protocolos para la caracterización de *Salmonella* se realizó en el Termociclador C1000 Touch™ de Bio Rad, con reactivos de Invitrogen™. Los productos de la amplificación se fraccionaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v), preparados con buffer TBE 1X y teñidos con 0,03 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™) por cada mL de buffer. En el gel se cargó 7 µL de muestra con 2 µL de Blue juice 10X (Invitrogen™) como buffer de carga.

Adicionalmente se cargó 4 µL del marcador molecular de 100 pb (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder Invitrogen™) para comparar el tamaño de las bandas obtenidas. La corrida del gel se realizó a 100 V y 300 mA durante 55 minutos y se observó en el transiluminador bajo luz UV. Se fotodocumentaron los resultados para su análisis.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Aislamiento de *Salmonella* y otras Enterobacterias

Se seleccionaron dos bacterias con características fenotípicas similares a *Salmonella spp.*, (tabla 12, figura 6). Además se aislaron dos diferentes enterobacterias que tuvieron una alta prevalencia en las muestras obtenidas. En la tabla 13 y en la figura 7 se muestran las características de dichas bacterias así como del control negativo de río San Pedro.

Tabla 12.

Características de bacterias similares fenotípicamente a *Salmonella spp.* y controles positivos

Característica	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella infantis</i>	Bacteria 1	Bacteria 2
Origen	FMVZ *	FMVZ *	Granja Artesanal de Alangasí	Peladora de San Pedro
Tipo de muestra	Colonias en plato Petri	Colonias en plato petri	Gallinero	Hígado
Tipo pre-enriquecimiento	----	----	Hisopado	Agua
Tiempo de enriquecimiento	----	----	24 horas	48 horas
Medio de aislamiento	XLD	XLD	XLD	XLD
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
Color	Centro negro, bordes rosados	Centro negro, bordes rosados	Rosada	Centro negro, bordes transparentes
Tinción Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador

Fuente: Recalde, 2015

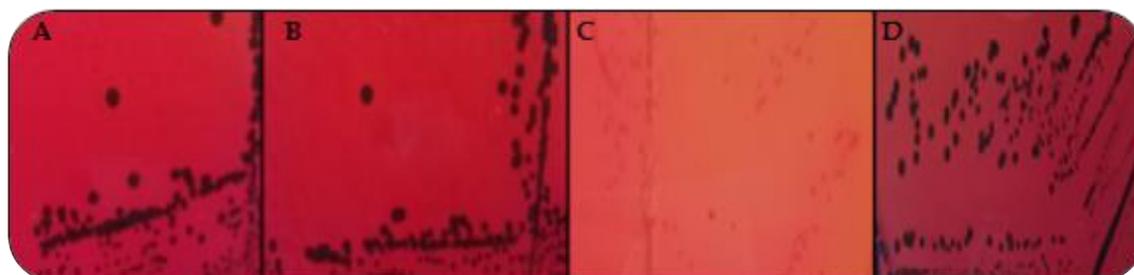


Figura 6. Colonias similares a *Salmonella*. **A.** *Salmonella enteritidis*. **B.** *Salmonella infantis*. **C.** Bacteria 1. **D.** Bacteria 2

Fuente: Recalde, 2015

Tabla 13.
Características del control negativo y de otras enterobacterias aisladas

Característica	Bacteria 3	Bacteria 4	<i>E. coli</i>
Origen	Mercado de la Ofelia	Mercado el Camal	Río San Pedro
Tipo de muestra	Hígado	Intestino	Agua
Tipo pre-enriquecimiento	Licuada	Hisopado	---
Tiempo de enriquecimiento	24 horas	24 horas	---
Medio de aislamiento	XLD	XLD	XLD
Forma	Circular	Irregular	Circular
Color	Blanca con halo amarillo	Moradas	Blanca con halo amarillo
Tinción Gram	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: Recalde, 2015

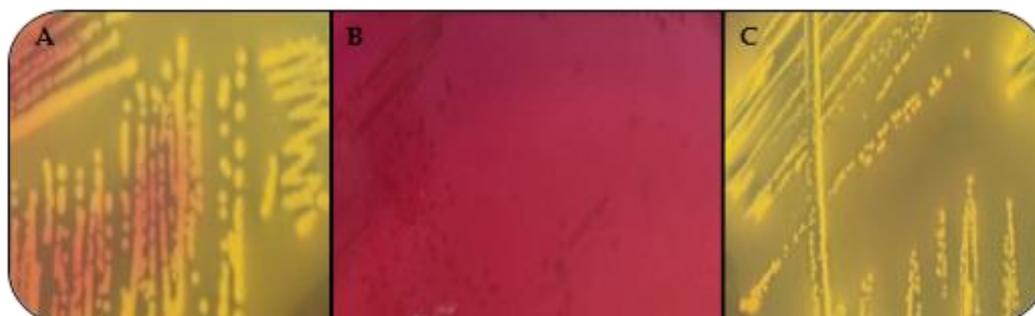


Figura 7. Control negativo y otras enterobacterias aisladas. **A.** Bacteria 3. **B.** Bacteria 4. **C.** *E. coli*

Fuente: Recalde, 2015

3.2 Caracterización Bioquímica

Los controles y las bacterias seleccionadas pasaron a través de varias pruebas bioquímicas, los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14.
Pruebas bioquímicas con dos repeticiones

Prueba	<i>S. infantis</i>	<i>S. enteritidis</i>	Bacteria 1	Bacteria 2	Bacteria 3	Bacteria 4	<i>E. coli</i>
--------	--------------------	-----------------------	------------	------------	------------	------------	----------------

	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Citrato	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Producción de gas	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

Fuente: Recalde, 2015

Los resultados comparados con la clave de (Koneman, et al., 2008) muestran que probablemente la Bacteria 1 sea un tipo de *Salmonella* o *Proteus*; la Bacteria 2 podría pertenecer al género *Salmonella* o al género *Citrobacter*; la Bacteria 3 podría ser una *Serratia* o una *Enterobacter* y que la bacteria 4 sea un tipo de *Pseudomona* o un tipo de *Moraxella*. Además se comprobó la pureza de los cultivos de *S. enteritidis*, *S. infantis* y *E. coli*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se verificaron mediante la prueba API 20E, los mismos se muestran en la tabla 15.

Tabla 15
Prueba Bioquímica Api 20E

Bacteria	Oxidasa	Código Api	Resultado
----------	---------	------------	-----------

		20E	Bacteria	% identidad
Salmonella infantis	Negativo	6704752	<i>S. enterica</i>	99%
Salmonella enteritidis	Negativo	6704752	<i>S. enterica</i>	99%
Bacteria 4	Positivo	2226006	<i>Pseudomona fluorescens</i>	85%
Bacteria 1	Negativo	4204112	<i>S. enterica</i>	77%
Bacteria 3	Negativo	5235773	<i>Enterobacter agglomerans</i>	99%
Bacteria 2	Negativo	3624512	<i>Citrobacter freundii</i>	91%
Bacteria 7	Negativo	1164573	<i>Escherichia coli</i>	81%

Fuente: Recalde, 2015

3.3 Caracterización Molecular

3.3.1 Extracción y Cuantificación de ADN genómico bacteriano

Los resultados de la cuantificación del proceso de extracción de ADN genómico de las bacterias aisladas se describen en la tabla 16.

Tabla 16.

Cuantificación de ADN genómico de las bacterias aisladas. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona* y **Ec:** *E. coli*

Muestra	Concentración (ng/μl)	Pureza	
		260/280	260/230
Se1	414.8	1.95	1.24
Se2	908.6	1.97	1.17
Si1	390.2	1.95	1.28
Si2	584.1	1.92	1.15
P1	372	1.96	1.21
P2	549.7	1.95	1.15
En1	300.7	1.88	0.99
En2	388.2	1.88	0.94
Ci1	548.4	1.97	1.37
Ci2	583.6	1.96	1.26
Ps1	643.3	1.89	1.38
Ps2	1320.3	1.96	1.44
Ec1	278.9	1.91	1.08
Ec2	354.1	1.91	0.99

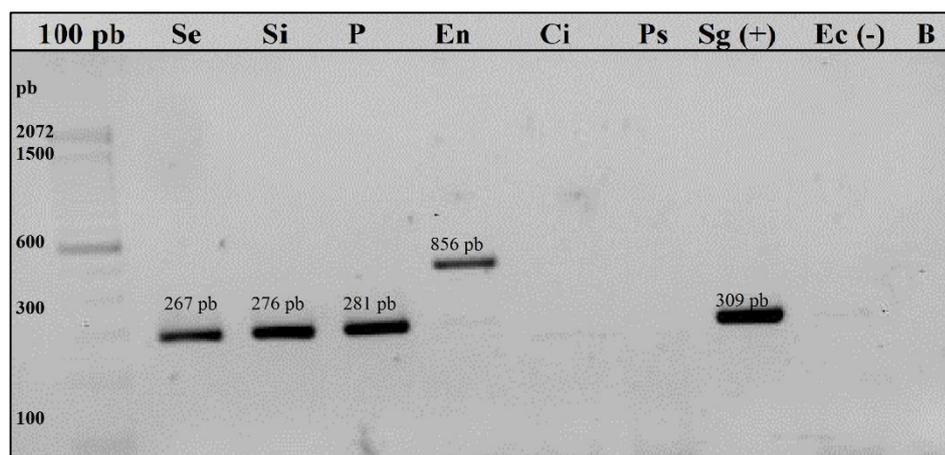
Fuente: Recalde, 2015

3.3.2 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en la amplificación de los genes seleccionados con sus respectivos primers, en la cual se muestra la especificidad de cada una de ellas.

Tabla 17.Especificidad de las pruebas moleculares para la caracterización de *Salmonella*

Bacteria	US1f/ US1r	SALM3F/ SALM4R	S212/ S500	GSALF/ GSALR	ST11/ ST15	sefA F/ sef R	selfA2/ selfA4
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Salmonella infantis</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Salmonella entérica</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomona</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Figura 8	Figura 9	Figura 10	Figura 11	Figura 12	Figura 13	---

Fuente: Recalde, 2015**Figura 8.** Producto de PCR con los primers *US1f /US1r* que amplifican el gen de patogenidad *invA*. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec:** *E. coli* y **B:** Blanco**Fuente:** Recalde, 2015

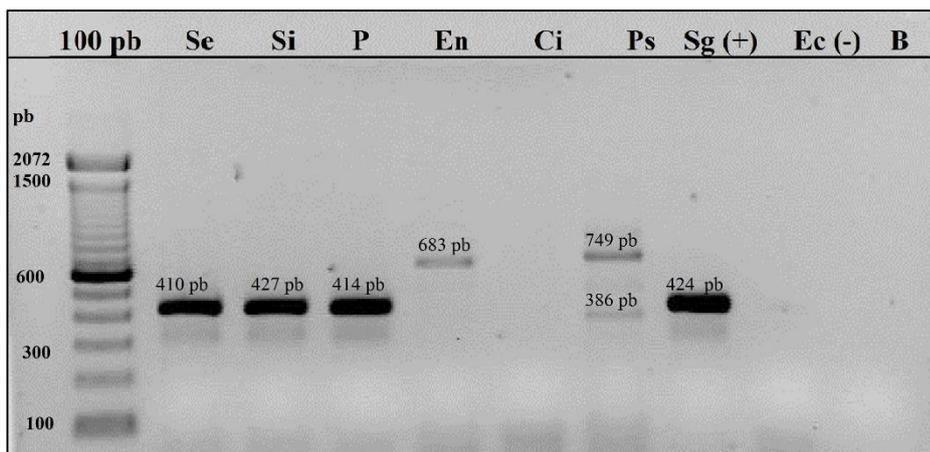


Figura 9. Producto de PCR con los primers *Salm3F/Salm4R* que amplifican el gen de patogenicidad *invA*. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec:** *E. coli* y **B:** Blanco
Fuente: Recalde, 2015

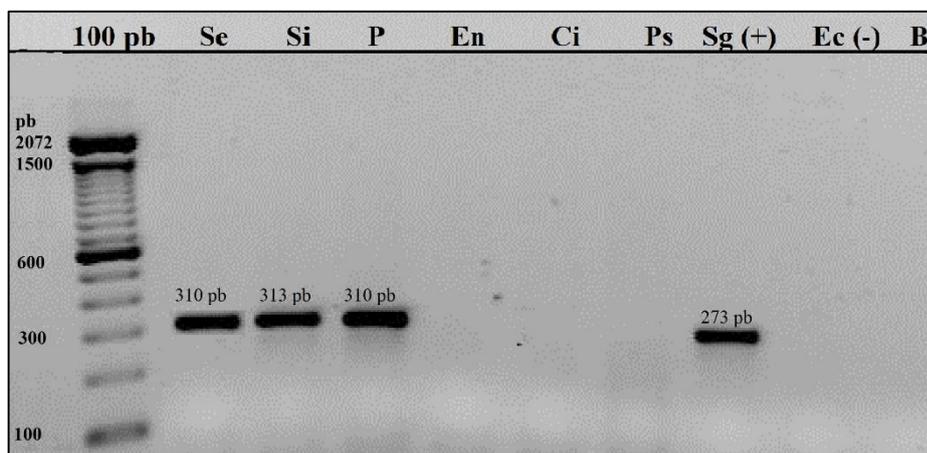


Figura 10. Producto de PCR con los primers *S212/S500* que amplifican el gen fimbrial *fimC*. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec:** *E. coli* y **B:** Blanco
Fuente: Recalde, 2015

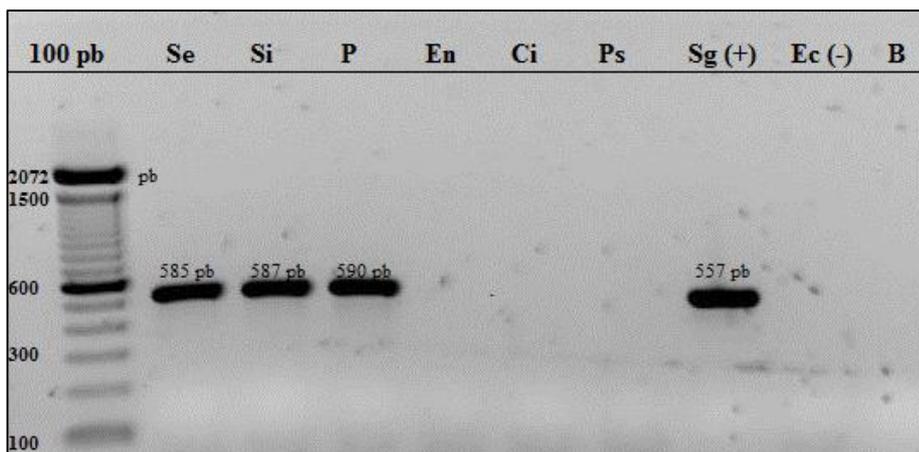


Figura 11. Producto de PCR con los primers *GSAL-F/GSAL-R* que amplifican el operón de transporte de histidina. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec(-):** *E. coli* y **B:** Blanco
Fuente: Recalde, 2015

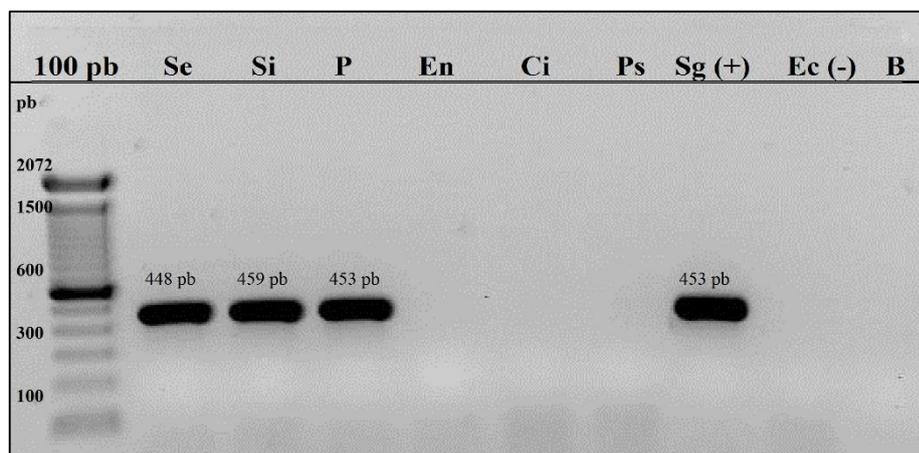


Figura 12. Producto de PCR con los primers *ST11-ST15* que amplifican el gen *JEO402-1*. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec(-):** *E. coli* y **B:** Blanco
Fuente: Recalde, 2015

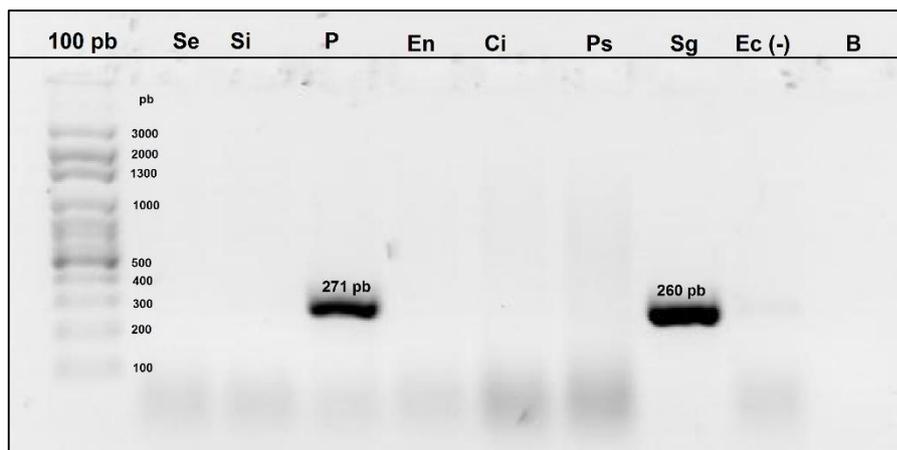


Figura 13. Producto de PCR con los primers *sefAF/sefAR* que amplifican el gen *sefA*. Dónde: **Se:** *Salmonella enteritidis*, **Si:** *Salmonella infantis*, **P:** *Salmonella enterica*, **En:** *Enterobacter*, **Ci:** *Citrobacter*, **Ps:** *Pseudomona*, **Sg(+):** *Salmonella gallinarum*, **Ec:** *E. coli* y **B:** Blanco
Fuente: Recalde, 2015

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Para el aislamiento de *Salmonella* se requiere del uso de medios de cultivo que tengan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de saprófitos y además una capacidad de discriminación que permita que la bacteria sea reconocida entre las otras especies que también son capaces de crecer en el medio (Sharath, Archana, & Dhanashree, 2010). Esta reflexión resulto muy apropiada en este trabajo ya que, a pesar de utilizar medios selectivos que favorecen el crecimiento de *Salmonella* y que tienen una alta capacidad inhibitoria para otras bacterias, existió un excesivo crecimiento de otras especies, especialmente fermentadoras de lactosa. Con esto en consideración se realizó el método de detección propuesto en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15:2009, y se logró el aislamiento de una sola cepa de *Salmonella*.

Posiblemente estos resultados se debieron a que según Taskila (et al 2012) ningún medio es 100 % selectivo para *Salmonella*, ya que la selectividad va a depender de las características y la concentración de los microorganismos que cohabitan con la bacteria de interés. Además, para que la *Salmonella* sobreviva en las condiciones de selectividad es necesario una cierta concentración mínima de células. (Taskila, Tuomola, & Ojamo, 2012)

La presencia de otras bacterias Gram negativas fue un factor importante que afectó el aislamiento de *Salmonella*, ya que se produjo el efecto Jameson, en el que el crecimiento de la población menor es suprimida por otras poblaciones. (Taskila, Tuomola, & Ojamo, 2012)

Las pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización de las bacterias aisladas y las donadas por la Universidad Central del Ecuador (UCE) se compararon con la clave de Koneman, y otros (2008) y se obtuvo un resultado preliminar del posible tipo de bacterias; sin embargo, no todas las pruebas bioquímicas concordaron con la bibliografía antes mencionada, por tal motivo fue necesario realizar una prueba confirmatoria mediante el

sistema API 20E que permitió discriminar de una mejor manera el grupo al que pertenecía cada bacteria y aun utilizando este sistema el rango del porcentaje de identidad en la caracterización estuvo entre un 77 % para la bacteria aislada a 99 % para las bacterias donadas por la UCE.

Esta discrepancia entre los resultados obtenidos y los teóricos se debe básicamente a que este tipo de pruebas son sistemas fenotípicos que están sujetos a la expresión de los parámetros analizados, los cuales dependen del tipo de medio crecimiento así como de las condiciones de incubación, por tanto pueden ser inestables y la expresión puede variar en función de cambios en las condiciones ambientales (Janda & Abbott, 2002).

En cuanto a la caracterización molecular se analizó la presencia de cinco tipos de genes. En primer lugar del gen de patogenicidad *invA*, el cual está involucrado en el ensamblaje del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) y en la translocación de las proteínas efectoras a la célula huésped (Figueroa & Verdugo, 2005). Este gen se seleccionó puesto que está presente en la mayoría de cepas de *Salmonella* y porque la PCR tiene una alta sensibilidad ya que según Rahn y otros (1992) de 630 cepas estudiadas, 626 presentaron el gen.

Los primers del gen *InvA* amplificaron la banda esperada para cuatro cepas de *Salmonella*; sin embargo, también amplificaron productos de diferente tamaño, no específicos en otro tipo de bacterias: *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*. Estos productos no específicos tuvieron un peso molecular mayor en ambos casos y fueron fácilmente distinguibles de los productos de la amplificación para *Salmonella*. La aparición de estos productos no específicos se puede dar por la presencia de genes ortólogos en dichos microorganismos. Los genes ortólogos son una clase particular de genes homólogos que se originan a partir del mismo gen ancestral y que se separaron por un evento de especiación, es decir, que se encuentran en diferentes especies pero que comparten similitudes en sus secuencias. (Carlberg & Molnár, 2014)

La importancia de analizar el gen *invA*, es que el mismo es esencial para la invasión a células eucariotas, siendo éste un paso fundamental para la

patogenicidad y supervivencia de las bacterias. El estudio realizado por Galan, Ginocchio y Costeas (1992), demuestra que bacterias mutantes que carecen de este gen son menos efectivas al momento de invadir y activar la vía de transducción de señal que conduce a la endocitosis de los microorganismos afectando de esta manera el ciclo de infección.

Además se analizó la presencia del gen *fimC*, el cual codifica una chaperona implicada en la síntesis de fimbrias tipo 1, los mismos que son necesarios para la invasión y supervivencia de la bacteria. Todos los serotipos de *Salmonella* a excepción de *S. gallinarum* y *S. pollorum* expresan este tipo de fimbrias (Jones, 2013). Los primers S212/S500 que se utilizaron para la amplificación de este gen fueron específicos para las cuatro cepas de *Salmonella* analizadas incluyendo a *S. gallinarum*, aunque esta serovariedad no exprese fimbrias tipo 1. Este resultado concuerda con lo observado por Drahovská y otros. (2001)

El *operón* de transporte de histidina y el gen *JEO402-1* son regiones altamente conservadas en todas las especies de *Salmonella* (Aabo, Rasmussen, Rossen, Sørensen, & Olsen, 1993); (Cohen, Neibergs, & McGrud, 1993). La presencia de estos dos tipos de genes fue propia de las cuatro cepas de *Salmonella* analizadas y no se presentaron productos inespecíficos en las otras cepas, lo cual demuestra la especificidad de la caracterización de *Salmonella* con dichos genes.

Para la detección del antígeno fimbrial *sefA* de *S. enteritidis* se utilizó el par de primers SelfA2/ SelfA4, el cual es recomendado en numerosos estudios para la detección de dicho gen, algunos investigadores sugieren que estos primers son altamente específicos para *Salmonella serovar enteritidis* mientras que los resultados obtenidos por otro investigadores sugieren que no pueden detectar claramente a *S. enteritidis* aisladas. En el presente estudio no se detectó la presencia del gen *sefA* con este par de cebadores.

Por otro lado, se diseñó el par de primers *sefAF/sefAR* para amplificar específicamente el gen *sefA*, para lo cual se utilizó una secuencia del gen descrita en la base de datos NCBI. Sin embargo, se obtuvo productos de

amplificación para la *Salmonella enterica* aislada de Alangasí y *S. gallinarum* más no para *S. enteritidis*, lo cual sugiere que los primers utilizados no fueron específicos para el gen *sefA* que se encuentra únicamente en *S. enteritidis* sino que amplifican un gen homólogo al mismo presente en las otras cepas.

Las pruebas moleculares demuestran tener una alta especificidad para la detección y caracterización de *Salmonella spp.*, Al compararlas con las pruebas bioquímicas tradicionales se puede concluir, que las primeras tienen una mayor sensibilidad, son más efectivas y su ejecución toma menos tiempo. Sin embargo, Todos los sistemas que se utilizan para identificar las bacterias, sea fenotípica o genotípicamente, tienen limitaciones, por lo cual es necesario que ambas pruebas se complementen y de esta manera garantizar resultados fehacientes en cuanto a la identificación del patógeno.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se aisló una *Salmonella enterica*, la cual fue encontrada en Alangasí, mientras que en las otras muestras analizadas se encontraron principalmente bacterias fermentadoras de lactosa.

Las bacterias entéricas aisladas en aves de corral fueron: 1) *Salmonella enterica*, 2) *Citrobacter freundii*, 3) *Enterobacter agglomerans* y 4) *Pseudomona fluorescens*

El gen de patogenicidad *invA* reportado en *Salmonella spp.* estuvo presente tanto en los controles positivos (*S. enteritidis*, *S. infantis* y *S. gallinarum*) así como en la *Salmonella enterica* aislada en Alangasí. Además se presentó un gen similar en la bacteria *Enterobacter agglomerans*.

Los primers de los genes *invA*, *fimC*, el operón de transporte de histidina, *JEO402-1* pueden ser utilizados para la identificación de bacterias patógenas, ya que tuvieron una alta sensibilidad y una alta especificidad.

Las pruebas moleculares mostraron ser capaces de ser más eficientes y específicas en la caracterización de *Salmonella*.

Se implementó un banco de cepas bacterianas en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

Las condiciones y los medios de enriquecimiento van a determinar el aislamiento o no de *Salmonella*, por lo tanto se debe hacer una adecuada selección de los mismos para permitir una detección más sensible y específica de la bacteria.

Es recomendable hacer la serotipificación de la cepa de *Salmonella* aislada, para de esta manera conocer qué tipo de bacteria que se tiene.

Se deberían secuenciar los productos obtenidos en la PCR, para de esta manera comprobar los genes de interés así como definir las posibles diferencias en las secuencia de cada cepa para desarrollar marcadores más específicos.

REFERENCIAS

- Aabo, S., Rasmussen, O., Rossen, L., Sørensen, P., & Olsen, J. (1993). Salmonella identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 171-178.
- Alonso, A., & Gracia, F. (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *International Microbiology*.
- Amini, K., Salehi, T. Z., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., & Ashrafganjooei, S. B. (2010). • Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research*.
- Benson, H. (2001). *Microbiological Applications Lab Manual* (Octava ed.). The McGraw-Hill.
- Caffer, M., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). *Manual de procedimientos para el diagnóstico y la caracterización de salmonella*. Obtenido de <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=TBG6ogqxF1U%3D&tabid=783&mid=1713&language=es-ES>
- Cohen, N. D., Neiberghs, H. L., & McGrud, E. D. (1993). Genus-specific detection of salmonellae using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (4 de Febrero de 2015). Ministerio de Salud Pública. *Anuario de Vigilancia Epidemiológica 1994 - 2013*.
- Drahovská, H., Turňa, J., Píknová, L., Kuchta, T., Szitásová, I., Škarková, A., & Sásik, M. (2001). Detection of Salmonella by polymerase chain reaction targeted to fimC gene. *Biología*.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

- Ferretti, R., Mannazzu, I., Cocolin, L., Comi, G., & Clementi, F. (2001). Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Figuroa, I. M., & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.
- Food Safety Authority of Ireland. (Septiembre de 2011). *Salmonella species*. Obtenido de <https://www.fsai.ie/salmonellaspecies.html>
- Hannah, J. (s.f.). *studyblue*. Obtenido de A & D Virulence Factors: <https://www.studyblue.com/#flashcard/view/9266859>
- Janda, M., & Abbott, S. (2002). Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *Journal of Clinical Microbiology*.
- Jeníková, G., Pazlarová, J., & Demnerová, K. (2000). *Detection of Salmonella in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay*. Obtenido de <http://130.206.88.107/revistes224/index.php/IM/article/viewFile/4c457c1adcdf9.002/9281>
- Jones, M. A. (2013). Fimbriae and Flagella of *Salmonella enterica*. En P. A. Barrow, & U. Methner (Edits.), *Salmonella in Domestic Animals* (Segunda ed.).
- Karimnasab, N., Tadayon, K., Khaki, P., Moradi Bidhendi, S., Ghaderi, R., Sekhavati, M., & Asadi, F. (2013). An optimized affordable DNA-extraction method from *Salmonella enterica* Enteritidis for PCR experiments.
- Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger, & Woods. (2008). *Diagnóstico microbiológico* (Sexta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Kumar, R. (2012). *Cochin University of Science and Technology*. Obtenido de Biochemical and molecular investigations on Salmonella Serovars from seafood: <http://hdl.handle.net/10603/4888>
- Li, Q., Cheng, W., Zhang, D., Yu, T., & Ding, S. (2012). Rapid and Sensitive Strategy for Salmonella Detection Using an InvA Gene-Based Electrochemical DNA Sensor. *International Journal of Electrochemical science*.
- Ly, K. T., & Casanova, J. (2007). Mechanisms of Salmonella entry into host cells. *Cellular Microbiology*.
- Mahon, C., Lehman, D., & Manuselis, G. (2011). *Textbook of Diagnostic Microbiology* (Cuarta ed.). Elsevier.
- Malorny, B., Bunge, C., & Helmut, R. (1993). Evaluation of Salmonella spp. specific primer-sets for the validation within the Food PCR project. *Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine*,.
- Parija, S. C. (2009). *Textbook of Microbiology & Immunology*. Elsevier.
- Pérez, A. M. (s.f.). *Universidad de Valencia*. Obtenido de Reacción en cadena de la Polimersa: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%F3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=1>
- Public Health Agency of Canada. (18 de 02 de 2011). *Public Health Agency of Canada*. Obtenido de Salmonella Enterica SPP.: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>
- Rahn, k., De Grandis, S., Clarke, R., McEwen, S., Galán, J., Ginocchio, C., . . . Gyles, C. (1992). Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polimerase chain reaction as especific method of detection of Salmonella. *Molecular and Cellular Probes*.
- Ramos, F., Bernal, J., Cardenal, E., Cordero, M., Baisón, F., & Aguilera, J. (Diciembre de 2014). *Microbiología Molecular*. Obtenido de Efectores

de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica*:
http://semicrobiologia.org/pdf/actualidad/58/32_MM11_Ramos.pdf

Ricci-Tam, C. (July de 2008). *Salmonella – description, pathogenesis, symptoms*. Obtenido de <http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2008/cluster7/ricci-tam.pdf>

Rosselin, M., Abed, N., Namdari, F., Virlogeux-Payant, I., Velge, P., & Wiedemann, A. (2012). The Different Strategies Used by *Salmonella* to Invade Host Cells. En B. Annous, & J. Gurtler (Edits.), *Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies* (pág. 516). InTech.

Sharath, K., Archana, D., & Dhanashree, B. (2010). Comparison of culture media for the isolation of *Salmonella* spp. from stool samples. *Journal of Advance Researches in Biological Sciences*.

Somma, M., & Querci, M. (s.f.). *JRC*. Obtenido de Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sección 6: Reacción en Cadena de la Polimerasa: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n6.pdf>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.

Taskila, S., Tuomola, M., & Ojamo, H. (2012). Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food control*.

Todar, K. (2012). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Obtenido de Bacterial Endotoxin : <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>

UERIA. (2011). *Instituto Nacional de Salud*. Obtenido de Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/PERFIL%20SALMONELLA%20SPP.pdf>

Universidad de Sevilla. (s.f.). *Microbiología Clínica*. Obtenido de Medios de cultivo: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/34/medios-de-cultivo.pdf>

Vilches, S. (2007). *Sistema de secreción de tipo III en Aeromonas mesófilas*. Tesis doctorales en red. Obtenido de Universidad de Barcelona:
http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2406/01.SVS_TESIS.pdf?sequence=1