



**UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Estandarización del método PMAxx™ qPCR para la cuantificación de la carga viable de *Salmonella spp.* en contenido cecal de origen avícola

---

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través De la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este proyecto de titulación forma parte del Proyecto “Aplicación del probiótico *Lactobacillus fermentum* con una dieta enriquecida con biomasa de microalgas como fuente de prebióticos para reducir la colonización con *Salmonella enterica* serovar Infantis en pollos broiler”, financiado por la Red CEDIA, ejecutado por las Universidades YACHAY Tech, UTA, UCE y UTC.

**Autor:** Joselyn Griselda Corrales Martinez

**Tutor:** Quim. William Ricardo Calero Cáceres, Ph.D.

**Ambato - Ecuador**

**Marzo 2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

### **CERTIFICA**

Que el presente Informe final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 16 de Febrero del 2022

.....

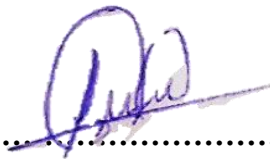
Dr. William Ricardo Calero Cáceres PhD.

C.I. 1714348859

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Joselyn Griselda Corrales Martínez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Joselyn', is written over a horizontal dotted line.

Joselyn Griselda Corrales Martínez

C.I.: 1805359583

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....  
Presidente del Tribunal

.....  
Dr. Mario Daniel García Solís  
C.I. 1103605471

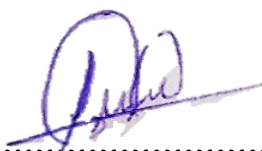
.....  
Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle  
C.I. 1802561595

Ambato, 11 de marzo de 2022

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además, apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....  
Joselyn Griselda Corrales Martínez

C.I.: 1805359583

**AUTOR**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme dado las fuerzas necesarias para salir adelante y permitido alcanzar esta gran meta en mi vida.

A mis padres Elena y Mesías que me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado y me han guiado por la vida con sus buenos consejos.

A mis abuelitos, a mi abuelita por ser la persona que ha estado conmigo en todo momento brindándome todo su cariño y consejos. A mi abuelito que nos cuida desde el cielo, gracias por ser un ejemplo a seguir.

A toda mi familia, por su apoyo y atención.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis papás y a mi abuelita por ser un pilar fundamental en mi vida y por apoyarme con este gran sueño. Gracias por creer en mí y ser mi mayor inspiración, espero que se sientan orgullosos de este gran logro. También, a mi familia Escudero-Castellano por ayudarme en todo este tiempo con su atención y ayuda en Quito.

A mi tutor, Dr. William Calero por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos, y sobre todo por su paciencia, tiempo y ayuda que me ha brindado al realizar este proyecto.

Gracias al equipo de UNIETAR por su colaboración al realizar este proyecto y por la gran oportunidad de colaborar con profesionales de excelencia. A mis amigos Cristina, Francis, Victoria e Iván por su gran apoyo y por las experiencias agradables en el laboratorio.

A la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, y a todos sus docentes quienes me han brindado sus grandes conocimientos.

A mis amigas Dianita, Eliana y Wendy quienes han estado conmigo en los buenos y malos momentos, siempre estarán en mi corazón.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	i
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	1
1.1.2. <i>Salmonella spp.</i> .....	1
1.1.3. <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Infantis y la actividad avícola <sup>3</sup>	
1.1.4. Métodos de detección y cuantificación de <i>Salmonella spp.</i> .....	4
1.1.4.1. qPCR .....	5
1.1.4.2. Monoazida de propidio y su uso en qPCR .....	6
1.1.5. Estandarización de métodos moleculares cuantitativos .....	6
1.2. Objetivos.....	9
1.2.1. Objetivo general .....	9
1.2.2. Objetivos específicos .....	9
CAPÍTULO II .....	10
METODOLOGÍA .....	10
2.1. Materiales .....	10
2.1.1. Equipos de laboratorio .....	10
2.1.2. Instrumentos de laboratorio.....	11



2.1.3.	Reactivos de laboratorio.....	12
2.1.4.	Insumos de laboratorio.....	13
2.1.5.	Materiales de escritorio.....	13
2.2.	Métodos.....	13
2.2.1.	Estandarización del método de cuantificación de células viables.....	14
2.2.1.1.	Cultivo y cuantificación de la cepa <i>S. Infantis</i> .....	14
2.2.1.2.	Teñido de células viables y no viables.....	14
2.2.1.3.	Extracción del ADN genómico de los cultivos puros.....	15
2.2.1.4.	Medición de la Concentración de ADN en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).....	17
2.2.1.5.	Construcción de las curvas estándar.....	17
2.2.1.6.	PCR cuantitativa.....	17
2.2.1.7.	Condiciones de reacción de qPCR.....	18
2.2.2.	Aplicación del método optimizado de qPCR y PMAxx™ para la cuantificación de <i>S. Infantis</i> en muestras avícolas.....	19
CAPÍTULO III.....		20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		20
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	20
3.1.1.	Extracción y cuantificación del ADN de los cultivos puros de <i>S. Infantis</i> .....	20
3.1.2.	Evaluación de los efectos inhibidores de PMAxx™ en la amplificación del gen objetivo.....	21
3.1.3.	Eficiencia y linealidad del método.....	22
3.1.3.1.	Curva estándar del gen <i>invA</i> con el ADN de <i>S. Infantis</i> obtenidas con el Spin Column Soil DNA Miniprep Kit.....	22
3.1.3.2.	Curva estándar del gen <i>invA</i> con el ADN de <i>S. Infantis</i> obtenidas con el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit.....	24

3.1.3.3. Ecuaciones de las rectas .....	25
3.1.4. Línea base (Threshold).....	26
3.1.5. Límite de cuantificación.....	26
3.1.6. Especificidad del método .....	26
3.1.7. Reproducibilidad del método .....	29
3.1.8. Evaluación de la estandarización de la PCR en tiempo real basado en PMAxx <sup>TM</sup> .....	30
3.1.9. Aplicación del método optimizado de PMAxx <sup>TM</sup> – qPCR para cuantificar muestras de origen avícola.....	34
CAPÍTULO IV .....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	35
4.1. Conclusiones.....	35
4.2. Recomendaciones .....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
ANEXOS .....	47
ANEXO A. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey .....	47
ANEXO D. Cálculo de la concentración de las muestras de contenido cecal de origen avícola expresado en log <sub>10</sub> copias de <i>Salmonella</i> .....	50
ANEXO E. Generación de la biomasa, Tinción con PMAxx <sup>TM</sup> y Extracción del ADN de los cultivos puros .....	51
ANEXO F. Elaboración de la qPCR en tiempo real.....	52
ANEXO G. Toma, procesamiento y extracción del ADN del contenido cecal de origen avícola.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Equipos de laboratorio .....	10
<b>Tabla 2.</b> Instrumentos de laboratorio.....	11
<b>Tabla 3.</b> Reactivos de laboratorio.....	12
<b>Tabla 4.</b> Insumos de laboratorio.....	13
<b>Tabla 5.</b> Materiales de escritorio .....	13
<b>Tabla 6.</b> Componentes de la reacción de qPCR .....	18
<b>Tabla 7.</b> Concentración de los estándares y ratios de pureza del ADN obtenidas con los dos kits .....	20
<b>Tabla 8.</b> Límite de cuantificación de Ct de el gen invA con los dos kits de extracción de ADN .....	26
<b>Tabla 9.</b> Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen invA obtenida con el kit 1.....	29
<b>Tabla 10.</b> Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen invA obtenida con el kit 2.....	30
<b>Tabla 11.</b> Número de copias u valores de Ct del gen invA con el ADN del Spin Column Soil DNA Miniprep Kit.....	48
<b>Tabla 12.</b> Número de copias u valores de Ct del gen invA con el ADN del QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit.....	49
<b>Tabla 13.</b> Cálculo de la concentración de contenido cecal.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Condiciones de reacción de Real – Time qPCR.....	18
<b>Figura 2.</b> Efecto del tratamiento de PMAxx <sup>TM</sup> sobre la amplificación del ADN diana del cultivo viable y no viable .....	21
<b>Figura 3.</b> Curva estándar de invA obtenida con el kit 1.....	23
<b>Figura 4.</b> Curva estándar de invA obtenida con el ADN del kit 2 .....	24
<b>Figura 5.</b> Ecuaciones de las rectas .....	25
<b>Figura 6.</b> Reporte de la especificidad de los primers para Salmonella spp.....	27
<b>Figura 7.</b> Curva de fusión de invA en ADN de cultivo puro obtenidos con los dos kits	28
<b>Figura 8.</b> Diagrama de toma de decisiones para la cuantificación de muestras de acuerdo al límite de detección .....	32
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de las muestras de contenido cecal de pollos broiler .....	35

## RESUMEN

Actualmente, la estandarización y validación de técnicas moleculares cuantitativas como la qPCR son importantes para los sectores de aseguramiento de calidad e investigación. Especialmente, es imprescindible la estandarización de protocolos de qPCR para la detección de *Salmonella spp.*, por el impacto que causa en la salud de la población. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar el método de qPCR basado en PMAxx™ para la detección y cuantificación de células viables de *S. Infantis* en muestras de contenido cecal de origen avícola. Primero, se realizó la tinción con el tinte de viabilidad bacteriana PMAxx (Trademark) de las muestras de cultivo puro de *Salmonella*, para inhibir la señal de células no viables. Luego de la extracción de ADN con dos kits distintos, se realizó un banco de diluciones seriadas, las cuales fueron usadas para la construcción de curvas estándar mediante el Termociclador Illumina Eco (Trademark) Real-Time PCR System. En el análisis de los resultados, la concentración y volumen de tinte usado, inhibió significativamente la señal de las células muertas. Las curvas estándar obtenidas con los dos kits de extracción de ADN presentaron una alta linealidad mayor a 0,99 y con un límite de cuantificación de Ct 31,4. No obstante, la mejor eficiencia se la obtuvo con el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, que fue de 84,99 por ciento. Por lo tanto, se utilizó la optimización del método obtenida con este kit por tener valores de rendimiento aceptables para la posterior cuantificación de *S. Infantis* en muestras de contenido cecal de origen avícola.

**Palabras clave:** Biología Molecular, técnicas moleculares cuantitativas, ETAS, viabilidad bacteriana, *Salmonella spp.*, contenido cecal, microbiología alimentaria, serovar.

## ABSTRACT

Currently, the standardization and validation of quantitative molecular techniques such as qPCR are important for the quality assurance and research sectors. Especially, the standardization of qPCR protocols for the detection of *Salmonella* spp. is essential, due to the impact it has on the health of the population. The present work aimed to standardize the PMAxx™-based qPCR method for the detection and quantification of viable cells of *S. infantis* in poultry cecal content samples. First, staining with PMAxx bacterial viability stain (Trademark) of pure *Salmonella* culture samples was performed to inhibit the signal of non-viable cells. After DNA extraction with two different kits, a bank of serial dilutions was made, which were used for the construction of standard curves using the Illumina Eco Thermal Cycler (Trademark) Real-Time PCR System. In the analysis of the results, the concentration and volume of dye used significantly inhibited the signal of dead cells. The standard curves obtained with the two DNA extraction kits showed a high linearity greater than 0.99 and a limit of quantification of Ct 31.4. However, the best efficiency was obtained with the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, which was 84.99 percent. Therefore, the optimization of the method obtained with this kit was used because it had acceptable yield values for the subsequent quantification of *S. infantis* in samples of poultry cecal contents.

**Keywords:** Molecular biology, quantitative molecular techniques, STD, bacterial viability, *Salmonella* spp, cecal contents, food microbiology, serovar.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) constituye una problemática mundial para los sistemas de salud pública. Alrededor del mundo, 1 de cada 10 personas contrae enfermedades por consumir alimentos contaminados y 420.000 mueren por su causa al año (**Antunes et al., 2016**). Las ETAS son causadas por agentes microbianos como bacterias, parásitos y virus; o sustancias químicas y toxinas que contaminan a los alimentos. Estos agentes patógenos pueden presentarse en la cadena productiva, transporte y preparación de los alimentos (**Bari & Yeasmin, 2018**). Según **Adley y Ryan (2016)**, la mayor parte de hospitalizaciones y muertes ocasionados por ETAS se deben a las bacterias, de las cuales *Escherichia coli.*, *Listeria monocytogenes.*, *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp.*, son los más representativos.

#### 1.1.2. *Salmonella spp.*

El género *Salmonella spp.* es considerado un agente etiológico bacteriano de relevancia por ser la causa de infecciones gastrointestinales importantes (**Vinueza et al., 2016**). Estas bacterias son bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, móviles y no formadores de esporas, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* del orden Enterobacterales. *Salmonella spp.* mide de 0,7 a 1,5 µm de ancho por 2 a 5 µm de largo y el tamaño de su genoma varía entre serovares, con rangos de 4.460 a 4.857 kb. (**Andino & Hanning, 2015**). Este patógeno es resistente, puede sobrevivir en diversos entornos y se encuentra en una amplia variedad de reservorios animales (**Voss et al., 2015**).

*Salmonella spp.* está formado por un grupo complejo de bacterias constituido por dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* (Barreto et al., 2016; Cosby et al., 2015). Esta última, consta de seis subespecies que incluyen más de 2.600 serovares descritos hasta la fecha (Voss et al., 2015) Los serovares de *S. enterica* pueden provocar infecciones en seres humanos que van desde gastroenteritis asociada con *Salmonella* no tifoidea (NTS por sus siglas en inglés) hasta fiebre tifoidea (Smith et al., 2016). La fiebre tifoidea es provocada por los serovares Typhi y Paratyphi A, B o C, que son patógenos especializados altamente adaptados a los seres humanos.

La salmonelosis causada por serovares de NTS es una enfermedad principalmente gastrointestinal que no está restringida solo para humanos, pues también tiene reservorios en animales. La misma, no necesita de un tratamiento médico para recuperarse, aunque puede complicarse en el caso de ser provocada por cepas invasivas. Los principales serovares de NTS relacionadas con infecciones en humanos son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Sin embargo, *S. enterica subsp. enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) se ha posicionado entre los cinco serovares más relevantes a nivel mundial desde el 2006 (Antunes et al., 2016; EFSA, 2021; Vinueza et al., 2019; Voss et al., 2015).

Se estima que las NTS causan más de 93,8 millones de infecciones y 155.000 muertes por año a nivel global (Schultz et al., 2021; WHO, 2015). En Europa, la salmonelosis ha sido considerada la segunda zoonosis más común luego de la campylobacteriosis. Esta última se considera la enfermedad más notificada, puesto que representó más del 60% de todos los casos (120.946) de ETAS reportadas en 2020 (EFSA & ECDC, 2021; Yoshida et al., 2016). Por otro lado, América Latina, África y Asia, reportan alrededor de 200 a 500 casos relacionados con *Salmonella spp.* por cada 100.000 habitantes por año (Quesada et al., 2016). Según el Ministerio de Salud Pública en el reporte de la semana epidemiológica treinta y siete, en Ecuador se reportaron 587 de casos de salmonelosis durante el 2021, la cual presenta una disminución significativa con respecto a la incidencia observada en años anteriores (MSP, 2021).



### **1.1.3. *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Infantis y la actividad avícola**

La industria avícola se ha expandido y globalizado en los últimos 50 años. El aumento significativo y la alta demanda de este sector se debe a factores críticos como la asequibilidad de los productos, el ciclo de producción corto y la necesidad de superficies pequeñas para su desarrollo (Nkukwana, 2018; Wahyono & Utami, 2018). A nivel mundial, la carne de aves de corral alcanzó una producción de 133.3 millones de toneladas en 2020 (FAO, 2021). En la Unión Europea, se produjo 13,6 millones de toneladas de carne de pollo, donde Polonia, España y Francia fueron los principales productores (eurostat, 2021). De acuerdo con Efremova (2018), Estados Unidos de América está entre los mejores productores de carne de pollo de engorde con una producción total mundial del 18%. En Ecuador, los productos avícolas son fuentes importantes de proteína animal, con consumo anual de 30, 4 kg per cápita y una producción de 800.000 toneladas de carne de ave (CONAVE, 2020).

Los productos de origen avícola juegan un papel importante en la causa de brotes de ETAS asociadas a *Salmonella spp.* desde la década de 1950 (FAO/WHO, 2009; Nair & Johnny, 2019; Saravanan et al., 2015). El consumo de carne de ave y huevos contaminados contribuyen al aumento de la incidencia de salmonelosis en seres humanos, ya que existen procesamientos antihigiénicos y condiciones de almacenamiento abusivas en la cadena de producción (Nidaullah et al., 2017). Esto conduce finalmente a la transmisión horizontal de la infección a otras aves y la contaminación de canales durante el sacrificio (Dar et al., 2017; Yulistiani et al., 2019). Así, varios serovares de *Salmonella spp.* han sido reportados en productos de origen aviar para el consumo humano, sin embargo, *S. Infantis* ha sido reconocido como un patógeno emergente en los últimos años (Alba et al., 2020).

*S. Infantis* ha sido reportado en bovinos y porcinos, pero las aves de corral, en especial pollos de engorde y sus productos, se han identificado como fuentes de infección en humanos (García et al., 2020). En Europa, este serovar es muy común en parvas de pollos

de engorde (46-57%) y carne de pollos de engorde (37-51%), y su prevalencia en gallinas ponedoras va en aumento (EFSA, 2017). En EE. UU *S. Infantis* se encuentra entre los diez primeros serovares causante de infecciones más notables relacionados con aves de corral desde el 2010 (Tyson et al., 2021). En relación con el Ecuador, algunos estudios demuestran que existe un 83,9% y 94% de prevalencia de *S. Infantis* en lotes de pollos de engorde en empresas avícolas (Vinueza et al., 2016, 2019). La propagación de este serotipo representa una posible amenaza para la salud pública, pues a más que se encuentra en alrededor del 90% del total de aislados en pollos, presenta una diversidad de resistencia a los antibióticos (Nagy et al., 2020).

La dosis infectiva para causar salmonelosis en humanos adultos está entre  $10^4$  a  $10^6$  células o más, pero la dosis de infección puede ser tan baja como  $10^1$  a  $10^2$  células en individuos altamente sensibles (Cosby et al., 2015). Es por esta razón que, los criterios de seguridad alimentaria de la mayor parte de países indican que los resultados del control de *Salmonella spp.* en carne de aves de corral y sus derivados, requieren cumplir una ausencia del patógeno en “25 o 10 gramos de la muestra” (EFSA & ECDC, 2018). Por lo tanto, los métodos de detección de este patógeno en productos comerciales se basan en pruebas microbiológicas para descartar la presencia del mismo (Logacho, 2015). Caso contrario sucede con *Escherichia coli*, donde los reglamentos de seguridad alimentaria permiten una concentración de 50 a 500 UFC/g en productos cárnicos de origen aviar (Moragas et al., 2019).

#### 1.1.4. Métodos de detección y cuantificación de *Salmonella spp.*

La evaluación de la supervivencia y transmisión de patógenos requiere métodos de cuantificación altamente específicos, precisos y sensibles (Chen et al., 2011). Los protocolos estándar para el aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* se basan en técnicas microbiológicas que propician el crecimiento de la bacteria en medios enriquecidos y selectivos (Xiao et al., 2015). *Salmonella spp.* puede ser aislada directamente en medios selectivos cuando se tienen muestras con un alto número de

bacterias. Caso contrario, sucede con los alimentos, piensos y muestras ambientales, donde el número de células es bajo. Por lo que, se requiere de un pre-enriquecimiento con agua peptonada y posterior enriquecimiento con medios de cultivo selectivos (**Logacho, 2015; World Organisation for Animal Health, 2013**).

Los métodos tradicionales de aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* requieren una considerable cantidad de tiempo. Además, la cuantificación de este patógeno por estos medios se ve limitada por la necesidad de un pre-enriquecimiento no selectivo. Por consiguiente, diferentes técnicas de biología molecular (PCR, qPCR, hibridación de ADN, etc.) se utilizan ampliamente para la detección de *Salmonella* o se estudian como opciones de cuantificación (**Leza, 2020**).

#### **1.1.4.1. qPCR**

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una de las técnicas más usadas en ensayos de laboratorio. Su eficiencia se basa en la capacidad que tiene para amplificar un segmento de ADN específico mediante un par de cebadores, con la cual se obtienen grandes cantidades de productos específicos (**Feng & Zhu, 2019**).

Recientemente, se han presentado variaciones de PCR convencional como la PCR en tiempo real (qPCR) (**Jarquin et al., 2009; Monteiro et al., 2019**). Esta técnica es rápida y proporciona una alta sensibilidad con ensayos que pueden detectar 30 células o menos por muestra (**Svec et al., 2015**). Sin embargo, la qPCR no tiene la capacidad de diferenciar células viables de las no viables. Esto dificulta un análisis certero de patógenos alimentarios que, podría conducir a la retirada innecesaria de productos y pérdidas económicas (**Barbau-Piednoir et al., 2014**). Para superar esta limitación, se han optado el uso de ensayos de viabilidad, el azul tripán, kits de viabilidad bacteriana y monoazida de propidio (PMA) basados en qPCR, que pueden ser usados para cuantificar carga microbiana viable (**Zhang et al., 2020**).

#### **1.1.4.2. Monoazida de propidio y su uso en qPCR**

La monoazida de propidio (PMA) es un colorante fotorreactivo capaz de unirse selectivamente al ADN de células con integridad de membrana comprometida (muertas). Tras la exposición a la luz visible intensa, el tinte reacciona covalentemente con el ADN de las células muertas, inhibiendo su amplificación por PCR (**Biotium, 2017**). Esta técnica resulta útil para la detección selectiva de células patógenas viables, pues el tinte se intercala eficazmente a las células muertas y baja la supresión de las células vivas (**Connolly, 2021; J. Zhang et al., 2020**).

La qPCR de viabilidad basada en PMA<sub>xx</sub> resulta útil para monitorizar niveles de *Salmonella* en entornos preocupantes (**Biotium, 2017**). PMA<sub>xx</sub> es una versión mejorada del colorante PMA que es más eficaz en discriminar entre células vivas y muertas. El gen objetivo de estos métodos es *invA*, porque está presente en varios serovares y es responsable de codificar proteínas de invasión de células epiteliales (**Abdel-Aziz, 2016**). **Zhang et al. (2020)** mencionan en su estudio que, la cuantificación de *Salmonella* mediante qPCR basada en PMA<sub>xx</sub> fue muy sensible para cuantificar la carga viable en muestras de suelo de entorno agrícola en comparación con la técnica de cultivo tradicional. Estos resultados indican que el ensayo tiene aplicabilidad en el diagnóstico de *Salmonella* en aves de corral.

#### **1.1.5. Estandarización de métodos moleculares cuantitativos**

Actualmente, la validación de técnicas moleculares cuantitativas como la qPCR son importantes para los sectores de aseguramiento de calidad e investigación (**Valle, 2019**). Puesto que, al optimizar y validar una técnica se lograrán obtener resultados fiables y reproducibles, en menor tiempo y con mayor facilidad de análisis. Especialmente, es imprescindible la estandarización de protocolos de qPCR para la detección de *Salmonella spp.*, por el impacto que causa en la salud de la población (**Carrero, 2021**).

La qPCR cuantifica una muestra de ADN mediante la cuantificación relativa o absoluta. En la primera, el analito (ARNm o microARN) se transcribe inversamente y se cuantifica en relación con una referencia endógena, mientras que en la segunda el ADN diana se mide en relación con un conjunto de estándares usadas para la construcción de una curva estándar (Svec et al., 2015). La curva estándar también se utiliza para evaluar el rendimiento del ensayo qPCR, habitualmente la eficiencia óptima está entre 90 y 110% y la eficiencia aceptable entre 80 a 120%; la misma dependerá de la calidad de la muestra y mezcla de reactivos (T. Zhang & Fang, 2006). La estimación de eficiencia implica generar una serie de diluciones y se analizan mediante qPCR midiendo el ciclo de cuantificación (Ct). Se construye un gráfico Ct vs el logaritmo de la concentración objetivo y se espera una linealidad negativa. En este caso, los indicadores de eficiencia que se consideran en la obtención estándar son: una pendiente ideal de -3.33 (100% de eficiencia) y con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) mayor o igual a 0.98 (Applied Biosystems, 2010; Valle, 2019).

Lo descrito se puede evidenciar en el estudio realizado por Dmitric et al. (2018), quienes optimizaron con éxito un protocolo modificado de PCR en tiempo real para la detección del gen de invasión A *InvA* y *ttr* de *Salmonella* en alimentos. En la investigación obtuvieron tasas de sensibilidad y veracidad del 100% y 96,8%, respectivamente. Asimismo, González-Escalona et al. (2012) evaluaron un ensayo multiplex de qPCR dirigido al locus *ttrRSBCA* y al gen *invA* para la detección precisa de *Salmonella spp.* en huevos. Se obtuvieron curvas estándar lineales con un  $r^2 \geq 0.99$ , con una eficiencia de 92 y 91% para las dianas *invA* y *ttrRSBCA*, y un límite de detección correspondiente de ~13 copias. De igual forma, en un ensayo qPCR basado en PMAxx™ para la cuantificación de *Salmonella Typhimurium* en muestras de suelo de origen avícola. Los resultados mostraron una eficiencia del 92% en las diluciones de 10 veces con una  $r^2$  de 0.99 y un límite mínimo de detección de  $10^1$  y  $10^2$  células Zhang et al. (2020).

A partir de lo antes mencionado, este proyecto se centra en estandarizar y aplicar un método de qPCR basado en PMAxx™ para la detección y cuantificación de células viables de *S. Infantis* en muestras de contenido cecal de origen avícola. La detección de este patógeno se basará en una región específica del gen *invA*, debido a que está relacionado con cuadros de virulencia y por la alta estabilidad genética que presenta. Por consiguiente, este estudio podría aparecer como una metodología idónea para investigaciones posteriores que requieran comprobar la factibilidad de sus tratamientos con alimentos o dietas alternativas para eliminar o reducir la colonización de *S. Infantis* en pollos. Conjuntamente, puede servir como sistema de seguimiento de producción primaria y muestreo microbiano, para la detección de *S. Infantis* en muestras avícolas, la misma que no ha sido descrita en estudios previos.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Estandarizar el método PMAxx™ qPCR para la cuantificación de la carga viable de *Salmonella spp.* en contenido cecal de origen avícola.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Optimizar la composición de la mezcla de reacción de qPCR basada en PMAxx™ y condiciones de reacción del termociclador en tiempo real.
- Obtener la ecuación de la recta, línea base (threshold), eficiencia y límite de cuantificación del método.
- Evaluar la aplicabilidad del método para la detección de la carga viable de *S. Infantis* en muestras avícolas.

## CAPÍTULO II METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Equipos de laboratorio

**Tabla 1.** Equipos de laboratorio

Detalle	Cantidad
Autoclave Yamato SE300	1
Balanza analítica Sartorius ENTRIS224I-1S	1
Termociclador Illumina Eco™ Real-Time PCR System	1
Incubador bacteriológico de 37 °C	1
SpeedVac ThermoScientific	1
Mechero Bunsen	5
Nevera (4 °C)	1
Congelador (-20 °C)	1
Ultracongelador (-80 °C), BioBase 400L	1
Cámara de flujo laminar Tipo II, BioBase	1
Microcentrífuga ThermoScientific	1
Centrífuga refrigerada	1
Termobloque ThermoScientific	1
Pipeteador automático Accu-jet® pro	1
Cámara de flujo laminar Tipo I (ADN), BioBase	1
Cámara de flujo laminar Tipo I (Master Mix), BioBase	1
Pipeta de 0,5-10 µL	2
Pipeta de 2-20 µL	1
Pipeta de 10-100 µL	2
Pipeta de 100-1000 µL	2



<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Vortex Digital	1
Iluminador de luz azul Invitrogen <sup>TM</sup>	1
Espectrofotómetro	1
Espectrofotómetro Nanodrop ThermoScientific	1

### **2.1.2. Instrumentos de laboratorio**

**Tabla 2.** Instrumentos de laboratorio

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Asas de inoculación	10 unidades
Tupos Eppendorf 1,5 mL o 2,5 mL	200 unidades
Tubos Falcon 50 mL	100 unidades
Tubos Falcon 15 mL	100 unidades
Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 $\mu$ L	200 unidades
Pipetas graduadas de plástico de 10 y 25 mL	200 unidades
Pinzas	1
Cajas Petri desechables	5 fundas de 20 cajas
Tijeras	1
Placas de 48 pocillos	20
Gradillas para tubos Falcon	3
Gradillas para tubos de microcentrífuga	3

### 2.1.3. Reactivos de laboratorio

**Tabla 3.** Reactivos de laboratorio

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Agar MacConkey	25 gramos
Agar XLD	50 gramos
Agua peptonada	1 litro
Solución salina	2 litros
Agua destilada	1 litro
Agua Mili-Q	1 litro
Agua libre de nucleasas	1 mL
Alcohol 90-100%	500 mL
Cloroformo	2 mL
PBS 10X	300 mL
Cepa de <i>Salmonella</i> Infantis U1068 S	1 vial congelado
Spin Column Soil DNA Miniprep Kit (Biobasic, Markham, Canadá)	3
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania)	1
Kit de Viabilidad bacteriana de qPCR PMA™ (biotium, Estados Unidos)	1

#### 2.1.4. Insumos de laboratorio

**Tabla 4.** Insumos de laboratorio

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Guantes de nitrilo	2 cajas
Parafilm	1 rollo
Papel aluminio	1 caja
Alcohol antiséptico	2 cajas
Cinta adhesiva	1 unidades

#### 2.1.5. Materiales de escritorio

**Tabla 5.** Materiales de escritorio

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Computadora	1
Calculadora	1
Esferos y lápices	1 paquete
Rotuladores	3
Cuaderno	1

## 2.2. Métodos

La metodología fue desarrollada en dos fases, la primera fue la estandarización del método de cuantificación de células viables PMAxx<sup>TM</sup>- qPCR y la segunda se trató de la aplicación del método estandarizado en la cuantificación de muestras de contenido cecal de origen avícola.

## **Fase 1**

### **2.2.1. Estandarización del método de cuantificación de células viables**

#### **2.2.1.1. Cultivo y cuantificación de la cepa de *S. Infantis***

En la estandarización del protocolo y elaboración de la curva de calibración se utilizó cultivos puros de *Salmonella* de origen aviar. Para ello, se usó la cepa U1068s del banco de microorganismos del laboratorio de la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR). El genoma completo de esta cepa que encuentra depositado en la base de datos del NCBI con el número de acceso DAEUGI0000000000.1 y su tamaño es de 5.003.989 bp. Esta cepa se recuperó en un medio selectivo diferencial Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) a 37 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se seleccionó una colonia característica para la generación de biomasa en agua peptonada como medio de cultivo líquido y se incubó a 37 °C de 18 a 24 horas con agitación constante.

El crecimiento recuperado del cultivo líquido se colocó en tubos Falcon y se centrifugó a 2.100 rpm por 45 minutos para concentrar la biomasa. Por último, con el pellet obtenido se creó una dilución en solución salina y se llegó a una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 1. Esta solución de trabajo se utilizó para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) mediante diluciones seriadas de 10 veces. En donde, se inoculó 100 µL de cada dilución en medio XLD, se esparció la alícuota con el asa de Digralsky y se incubó a 37 °C por toda la noche (n=3) (J. Zhang et al., 2020).

#### **2.2.1.2. Teñido de células viables y no viables de *Salmonella***

La solución de trabajo que se obtuvo en el paso anterior se utilizó para preparar dos muestras diferentes: *Salmonella spp.* viable y no viable, en microtubos de 1,5 mL. Para el cultivo no viable, se expuso 1 mL de la solución de trabajo a 95 °C durante 5 min en un termobloque; mientras que, al cultivo viable no se le realizó ningún tratamiento previo (J.

**Zhang et al., 2020**). Se verificó la muerte de las bacterias sembrando en placa 100  $\mu\text{L}$  de la muestra no viable en agar XLD y 10  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:100 de la muestra viable en otra placa. Se incubó durante la noche a 37 °C y se comprobó el crecimiento de colonias después de 24 o 48 horas. Luego, se descongeló rápidamente y con poca luz el stock PMAxx<sup>TM</sup> (Biotium, California, EUA) de 20 mM para preparar una solución de trabajo diluyéndolo en agua hasta una concentración de 5 mM. Se agregó 6.5  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo de PMAxx<sup>TM</sup> y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo PMA Enhancer (Biotium, California, EUA) a 1 mL del cultivo bacteriano de células viables y no viables y se dejó un control (células no viables sin tratar con el tinte). Posteriormente, las muestras tratadas se incubaron en la oscuridad durante 10 min y fueron expuestas a la luz (500 voltios) a una distancia de 20 cm durante 15 min con inversión intermitente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13.300 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante dejando los sedimentos bacterianos para la extracción del ADN.

### **2.2.1.3. Extracción del ADN genómico de los cultivos puros**

La extracción del ADN de *Salmonella spp.* del cultivo puro se llevó a cabo mediante dos kits, el kit 1 fue Spin Column Soil DNA Miniprep Kit (Biobasic, Markham, Canadá) y el kit 2 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania).

Para el primer kit, se precalentó la solución SCL (Biobasic, Markham, Canadá) a 65 °C en un termobloque y se añadió 0,5 mL de esta a los sedimentos bacterianos obtenidos anteriormente. Se agitó enérgicamente la solución durante 3 minutos y se incubó a 65 °C por 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó las muestras a 13.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante en un nuevo microtubo. A continuación, se añadió un volumen igual de solución SP (Biobasic, Markham, Canadá), se mezcló mediante inmersión y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Después de esto, se centrifugó a 13.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante en un nuevo microtubo. Seguidamente, se añadió 0,2 mL de cloroformo, se mezcló bien mediante vortex y se centrifugó a 13.000 x g durante 3 minutos a temperatura

ambiente, para luego transferir el sobrenadante en un nuevo microtubo. Luego, se adicionó 1,5 volúmenes de solución SB (Biobasic, Markham, Canadá) y se homogenizó bien mediante vortex.

Inmediatamente y con mucho cuidado, se transfirió la mezcla obtenida a la columna de centrifugado EZ-10 (Biobasic, Markham, Canadá) y se centrifugó a 12.000 x g durante 30 segundos. Después de esto, se añadió 0,7 mL de solución de lavado y se centrifugó a 12.000 x g durante 30 segundos. Posteriormente, la columna EZ-10 se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se adicionó de 75 a 100 µL de solución de elución. Para finalizar, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos, se centrifugaron a 12.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente y se almacenó el ADN a -20 °C. La composición y nombre de las soluciones SP, SCL y SB no son proporcionadas por el fabricante del kit, por lo cual solo se mencionan sus abreviaturas **(BIO BASIC, 2017)**.

En el kit 2, se añadió 1 mL del buffer InhibitEX (Qiagen, Alemania) a cada muestra de sedimentos bacterianos obtenida. Se agitó la mezcla continuamente durante 1 min hasta que la muestra estuvo completamente homogénea y se centrifugó a 13.300 rpm durante 1 min. Se pipeteó 25 µL de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añadió al mismo 600 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior. Luego, se añadió 600 µL del buffer AL (Qiagen, Alemania), se agitó durante 15 segundos y se incubó la mezcla a 70 °C por 10 min. Se añadió 600 µL de etanol (96-100%) al lisado y se mezcló mediante vortex. Seguidamente, se colocó 600 µL del lisado del paso anterior en la columna de centrifugado QIAamp (Qiagen, Alemania) y se centrifugó a 13.300 rpm durante 1 min. Se colocó la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recogida de 2 mL y se desechó el tubo con el filtrado. Se abrió con cuidado la columna de centrifugado QIAamp, se añadió 500 µL de buffer AW1 (Qiagen, Alemania) y se centrifugó a 13.300 rpm durante 1 min. Se colocó la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recogida de 2 mL y se desechó el tubo con el filtrado. Se abrió con cuidado la columna de centrifugado QIAamp, se añadió 500 µL de buffer AW2 (Qiagen, Alemania) y se centrifugó a 13.300 rpm durante 3 min. Se desechó el filtrado, se colocó la columna de centrifugado QIAamp en un nuevo tubo de recogida y se centrifugó en seco a 13.300 rpm durante 3 min. Finalmente, se

transfirió la columna de centrifugado en un nuevo tubo de microcentrífuga, se colocó 200  $\mu$ L de buffer de elución y se almacenó el ADN a -20 °C.

#### **2.2.1.4. Medición de la Concentración de ADN en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.)**

Se abrió el programa Nanodrop 2000 y se seleccionó ácidos nucleicos. Se levantó la tapa del equipo, se cargó con 2  $\mu$ L de la solución blanco (buffer de elución) y se pulsó BLANK. A continuación, se cargó 2  $\mu$ L de cada muestra ingresando sus correspondientes códigos y se pulsó MEASURE. Los resultados de la concentración de cada muestra se encuentran en ng/ $\mu$ L y la relación 260/280 para verificar la calidad del ADN.

#### **2.2.1.5. Construcción de las curvas estándar**

Se generó una curva estándar en un termociclador en tiempo real Illumina utilizando el software Eco™ Real-Time PCR, a partir de diluciones en serie de 10 veces del ADN de los cultivos puros extraídos anteriormente. Estas diluciones estuvieron en un rango de  $10^1$  a  $10^{-10}$  con un volumen final de 450  $\mu$ L, donde cada dilución se colocó en tubos de PCR y se realizó con al menos 5 réplicas de diluciones (J. Zhang et al., 2020).

#### **2.2.1.6. PCR cuantitativa**

Las diluciones realizadas fueron utilizadas para realizar la qPCR utilizando los cebadores proporcionados por el kit de Viabilidad bacteriana de qPCR PMA™ (Biotium, Estados Unidos). La secuencia de los cebadores son las siguientes: Forward 5'-ATTCTGGTACTAATGGTGATGATC-3' y Reverse 5'-GCCAGGCTATCGCCAATAAC-3', las cuales amplificaron el fragmento del gen *invA* de *Salmonella spp.* La mezcla de reacción de PCR se preparó agregando los componentes a cada tubo de PCR o pozo de acuerdo con la Tabla 7 y controles negativos con dH<sub>2</sub>O estéril.

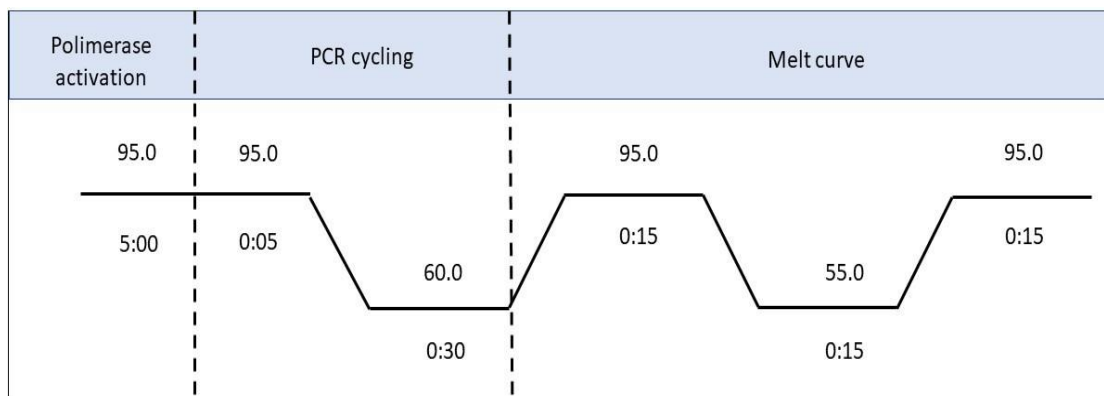
**Tabla 6.** Componentes de la reacción de qPCR

Componentes de la reacción	Cantidad por 20 $\mu$ L de reacción ( $\mu$ L)	Concentración final
2X Forget-Me-Not Master Mix	10	1X
<i>invA</i> primer mix	2	0,5 $\mu$ M
Plantilla de ADN	5	X
ROX	Opcional	-
dH <sub>2</sub> O	20	-

### 2.2.1.7. Condiciones de reacción de qPCR

La reacción de qPCR del *invA* de *S. Infantis* se desarrolló en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos de amplificación que consistió en 95 °C por 5 s y 60 °C por 60 s. La detección de la fluorescencia se llevará a cabo al final de cada paso de hibridación, y se incluirá un paso de análisis de la curva de fusión (en una rampa de 55 a 95 °C). Los resultados obtenidos se interpretaron mediante el análisis de gráficas.

**Figura 1.** Condiciones de reacción de Real – Time qPCR





## **Fase 2:**

### **2.2.2. Aplicación del método optimizado de qPCR y PMAxx™ para la cuantificación de *S. Infantis* en muestras avícolas**

Se tomó el ciego de pollos broiler sacrificados y se realizó una desinfección exterior con alcohol al 96%. Se pesó 1 g del contenido cecal (una muestra por animal) en Falcon de 50 mL y se agregó 9 mL de buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Las muestras se centrifugaron a 900 x g durante 1 min a 4 °C para eliminar materiales no disueltos. Se transfirieron los sobrenadantes en tubos nuevos, se centrifugaron a 2200 x g por 30 min a 4 °C y de los sedimentos bacterianos se trataron con PMAxx™. Posteriormente, se extrajo el ADN mediante el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit y se realizó la qCPR cómo se describió anteriormente. Finalmente, se utilizará la curva estándar generada con anterioridad para cuantificar el número de copias de ADN, a partir de los valores de cuantificación del ciclo (Ct) y los datos de qPCR (log<sub>10</sub> de número de copias de ADN). Dichos datos se expresarán como carga viable *Salmonella* por gramo de muestras de materia cecal.

## CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1. Extracción y cuantificación del ADN de los cultivos puros de *S. Infantis*

El ADN del cultivo puro de *S. Infantis* extraído con los dos kits fue cuantificado utilizando el Nanodrop 2000 y concentrado mediante el Speedvac (Thermo Scientific). Las concentraciones y ratios de pureza del ADN se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 7.** Concentración de los estándares y ratios de pureza del ADN obtenidas con los dos kits

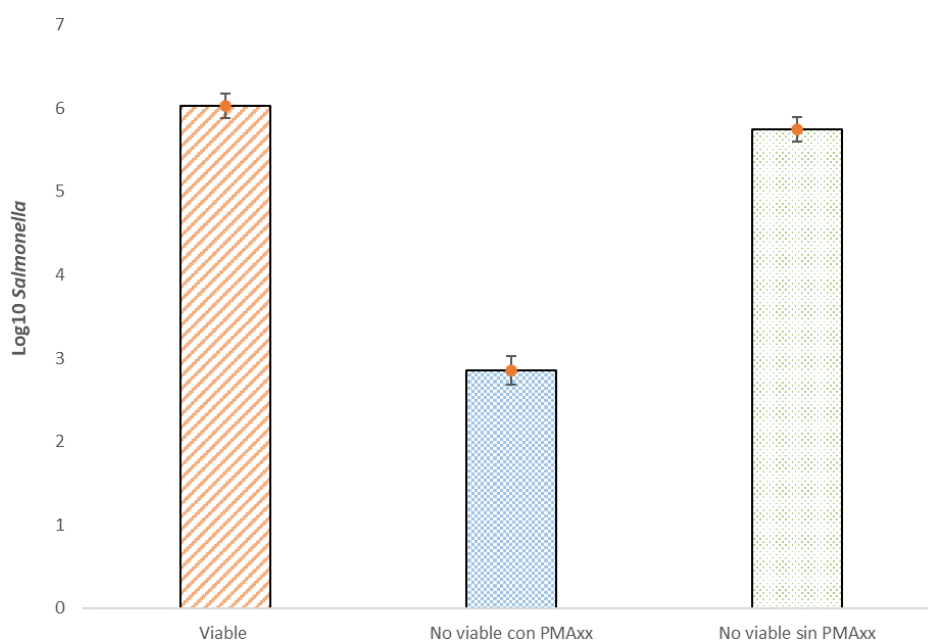
Kits de extracción	Concentración ng/μL	Ratio 260/280 nm	Ratio 260/230 nm
Spin Column Soil DNA Miniprep Kit (Biobasic, Markham, Canadá)	29	2.09	0,26
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania)	15.7	2.04	0,27

Las concentraciones descritas en la Tabla 7, se encuentran dentro de los valores óptimos para su uso en PCR. **Lorenz (2012)** indica que la concentración de la plantilla de ADN genómico o plasmídico está en el rango de 5-100 ng/μL para la elaboración de curvas de calibración de qPCR. No obstante, los ratios de calidad de ADN indican presencia de contaminación en las muestras.

### 3.1.2. Evaluación de los efectos inhibidores de PMAxx<sup>TM</sup> en la amplificación del gen objetivo

La evaluación de los efectos inhibitorios de PMAxx<sup>TM</sup> se realizó mediante la qPCR del ADN obtenido del cultivo viable y no viable de *Salmonella*. Los resultados observados en la Figura 2 muestran que con 6,25 µL del tinte PMAxx<sup>TM</sup> a una concentración de 5 mM se inhibe la amplificación del ADN del cultivo no viable de *Salmonella* tratada con el tinte en comparación con el cultivo no viable no tratado. Además, la carga de *Salmonella* más alta del grupo de células viables confirmó que el PMAxx<sup>TM</sup> penetró solamente el ADN de las células con membrana celular comprometida (Biotium, 2017). De acuerdo con el ANOVA completamente aleatorio, la inhibición de la amplificación fue significativa  $P < 0,05$  (95%) (Anexo A). La prueba de Medias de Tukey indicó que el tratamiento con PMAxx<sup>TM</sup> tiene un efecto significativo en la inhibición de amplificación de células muertas, ya que se ubica en la categoría (B).

**Figura 2.** Efecto del tratamiento de PMAxx<sup>TM</sup> sobre la amplificación del ADN diana del cultivo viable y no viable



### **3.1.3. Eficiencia y linealidad del método**

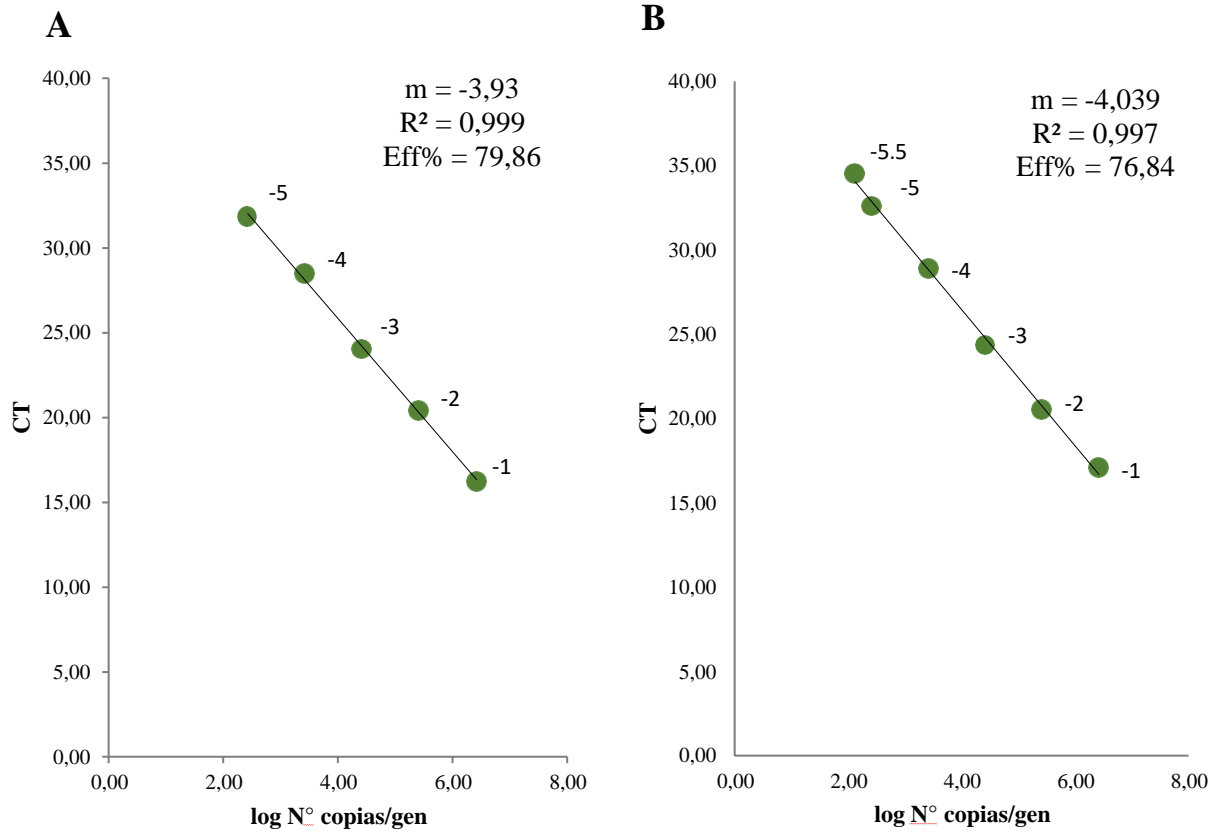
#### **3.1.3.1. Curva estándar del gen *invA* con el ADN de *S. Infantis* obtenidas con el Spin Column Soil DNA Miniprep Kit**

Para realizar la curva estándar del gen *invA*, se partió de las diluciones -1 a -10. Las diluciones -8 a la -10 no se aprecian, pues el resultado fue indeterminado, y las diluciones -6 y -7 no amplificaron el gen objetivo de acuerdo con la curva de fusión. En la Figura 3 A se evidencia una tendencia lineal en las diluciones, con un coeficiente de correlación de 0,999 y con una eficiencia del fuera del rango óptimo y aceptado (79,86%).

Se realizó nuevamente la qPCR elaborando una dilución extra para obtener un mayor límite de detección, la cual estuvo a en una relación 1:2 de la dilución -5. Con esta modificación, la curva estándar resultante obtuvo un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.997 y una eficiencia de 76,84% (Figura 3 B). No obstante, la eficiencia sigue estando por debajo de lo sugerido 80 – 120%.

Posteriormente, se realizaron al menos 5 réplicas de la cuantificación con estos 6 puntos con el fin de evaluar la reproducibilidad del método.

**Figura 3.** Curva estándar de *invA* obtenida con el kit 1

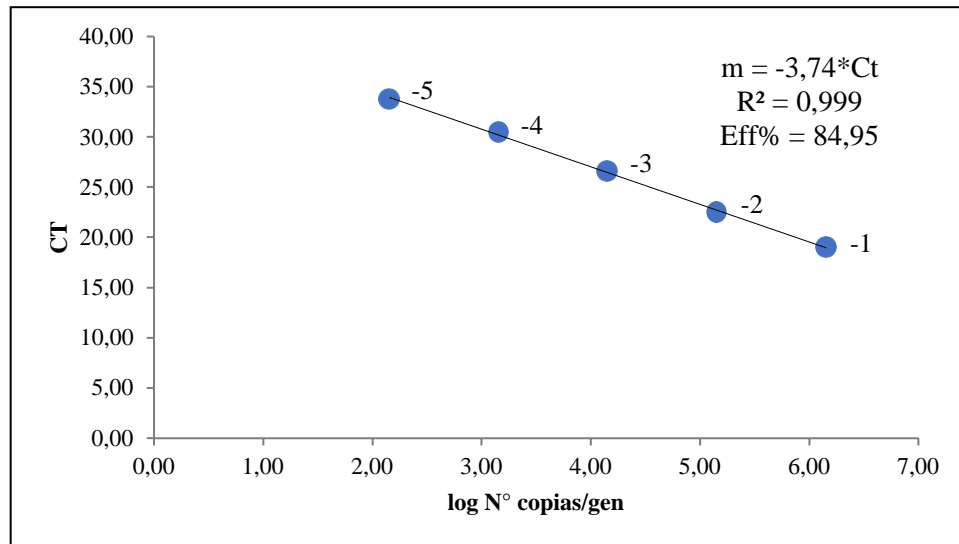


*Nota.* **A** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs el número del ciclo umbral, usando 5 diluciones seriadas:  $1 \times 10^1$ - $1 \times 10^5$ . Pendiente = -3,93,  $r^2 = 0,999$  y eficiencia de 79,86%. **B** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs el número del ciclo umbral, usando 6 diluciones seriadas:  $1 \times 10^1$ - $1 \times 10^{5.5}$ . Pendiente = -4,039,  $r^2 = 0,997$  y eficiencia de 76,84%.

### 3.1.3.2. Curva estándar del gen *invA* con el ADN de *S. Infantis* obtenidas con el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

Para realizar la curva estándar del gen *invA*, se partió de las diluciones -1 a -9. Las diluciones -9 a la -6 no se aprecian, pues el resultado fue indeterminado y no amplificaron el gen objetivo de acuerdo con la curva de fusión. En la Figura 4 se evidencia una tendencia lineal en las diluciones, con un coeficiente de correlación de 0,9994 y con una eficiencia del 84,95%. Esta eficiencia se encuentra dentro del rango aceptado que menciona **T. Zhang & Fang (2006)** y es mejor que la obtenida con el ADN del Spin Column Soil DNA Miniprep Kit. Posteriormente, se realizaron al menos 5 réplicas de la cuantificación con estos 5 puntos con el fin de evaluar la reproducibilidad del método.

**Figura 4.** Curva estándar de *invA* obtenida con el ADN del kit 2

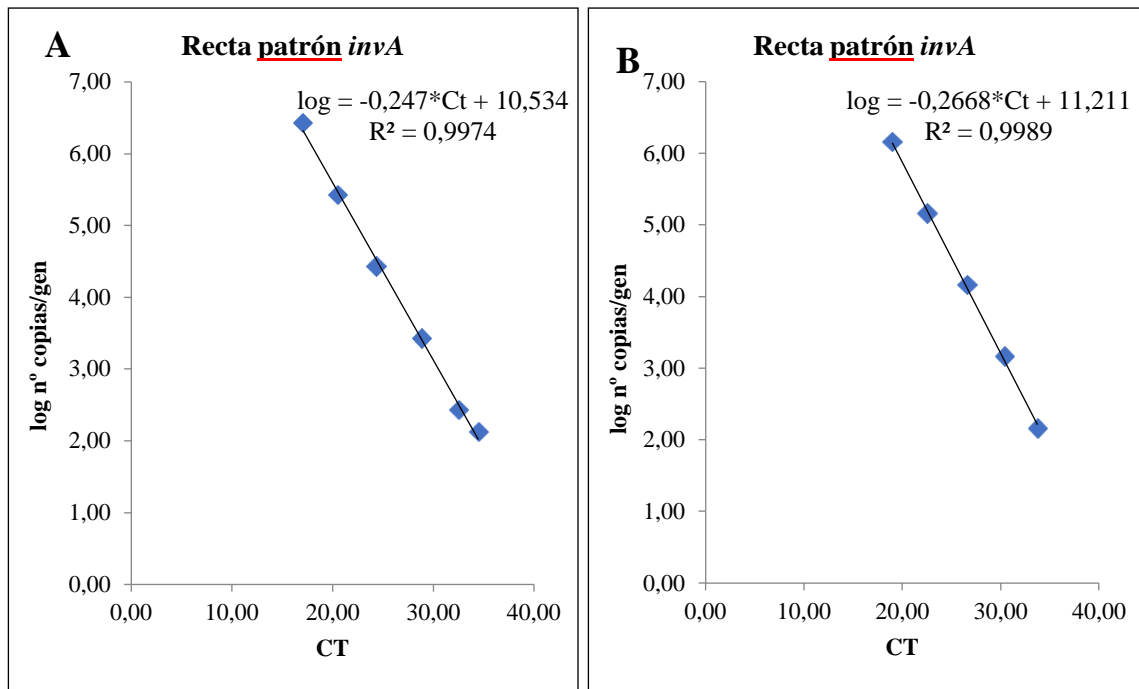


*Nota.* Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs el número del ciclo umbral, usando 5 diluciones seriadas:  $1 \times 10^1$ - $1 \times 10^5$ . Pendiente = -3,7446,  $r^2 = 0,999$  y eficiencia de 84,95%.

### 3.1.3.3. Ecuaciones de las rectas

Las ecuaciones de la recta fueron realizadas a través de graficas de dispersión, con los resultados de Ct para cada dilución (eje x) y el valor del logaritmo del número de copias genómicas de los estándares (eje y), como se evidencia en la Figura 5. Los resultados indicaron que las diferencias de  $\Delta Ct$  entre las diluciones decimales para el gen *invA* de los ADN extraídos con los dos kits fueron:  $\Delta Ct = 3,88$  para el Spin Column Soil DNA Miniprep Kit (Biobasic, Markham, Canadá) y  $\Delta Ct = 3,69$  para QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit. Estos valores se encuentran dentro del rango recomendado para las diferencias de  $\Delta Ct$ , pues con una serie de diluciones de 10 veces, los valores de Ct están separados por  $\sim 3,3$  ciclos (ThermoFisher Scientific, 2016; Valle, 2019).

Figura 5. Ecuaciones de las rectas



Nota. **A** Figura que corresponde a la ecuación de la recta con el ADN del kit 1. **B** Figura que corresponde a la ecuación de recta obtenida con el ADN del kit 2

### 3.1.4. Línea base (Threshold)

El Threshold se estableció manualmente para todos los ensayos en 0.099, este valor se fijó lo más cerca posible de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de la señal de ruido de fondo. De esta manera, se calcula apropiadamente el punto correcto de valores de Ct en la curva (**Applied Biosystems, 2010**).

### 3.1.5. Límite de cuantificación

Los resultados de las curvas estándar para el gen *invA*, indican que los límites de cuantificación experimentales de Ct se encuentran entre 33,74 y 34,78. Estos límites de cuantificación son adecuados, pues **De Ronde et al. (2017)** mencionan que un valor de Ct < 35 es óptimo. Los valores que sean superiores a 35 se consideran demasiado bajas para medirlas cuantitativamente (indetectables) y se espera que tengan una mayor desviación estándar. En la siguiente tabla se observan los Ct de ADN detectado y el número de copias por qPCR.

**Tabla 8.** Límite de cuantificación de Ct de el gen *invA* con los dos kits de extracción de ADN

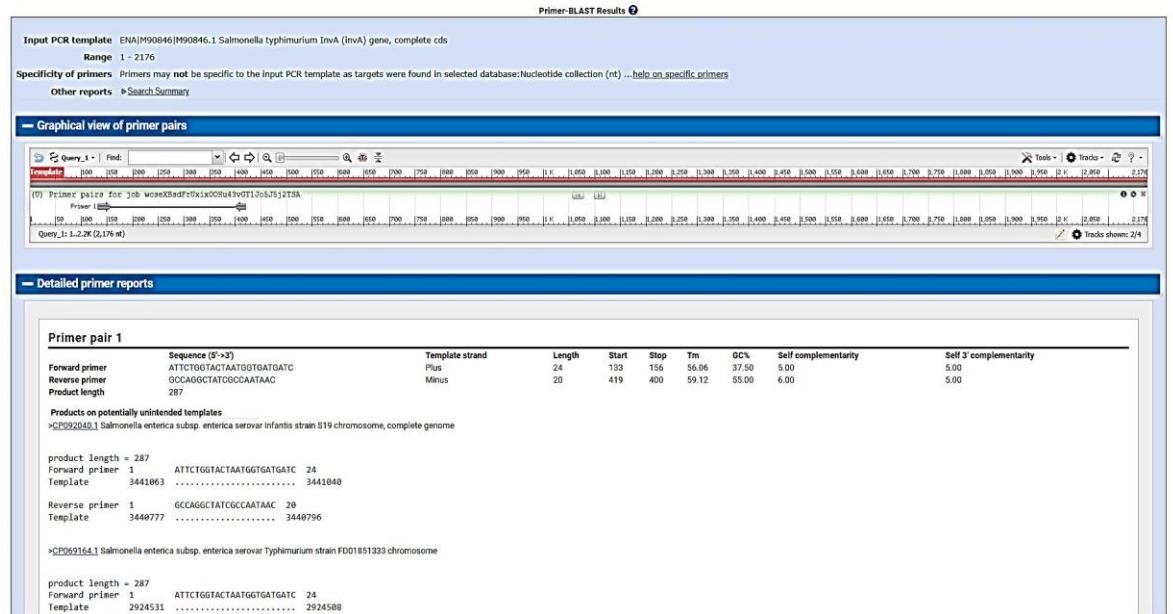
<b>Kits de extracción</b>	<b>Ct</b>	<b>Nº copias en qPCR</b>
Spin Column Soil DNA Miniprep Kit	34,88	132,19
QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit	33,74	143.13

### 3.1.6. Especificidad del método

La especificidad del conjunto de primers se analizó primero *in silico* usando Primer Blast para examinar las secuencias de los primers y secuencia del amplicón. En la Figura 6 se evidencia que las entradas potenciales de productos que ofrece los primers utilizados correspondieron únicamente a *Salmonella enterica* con una longitud de 287 bp para todas las entradas.

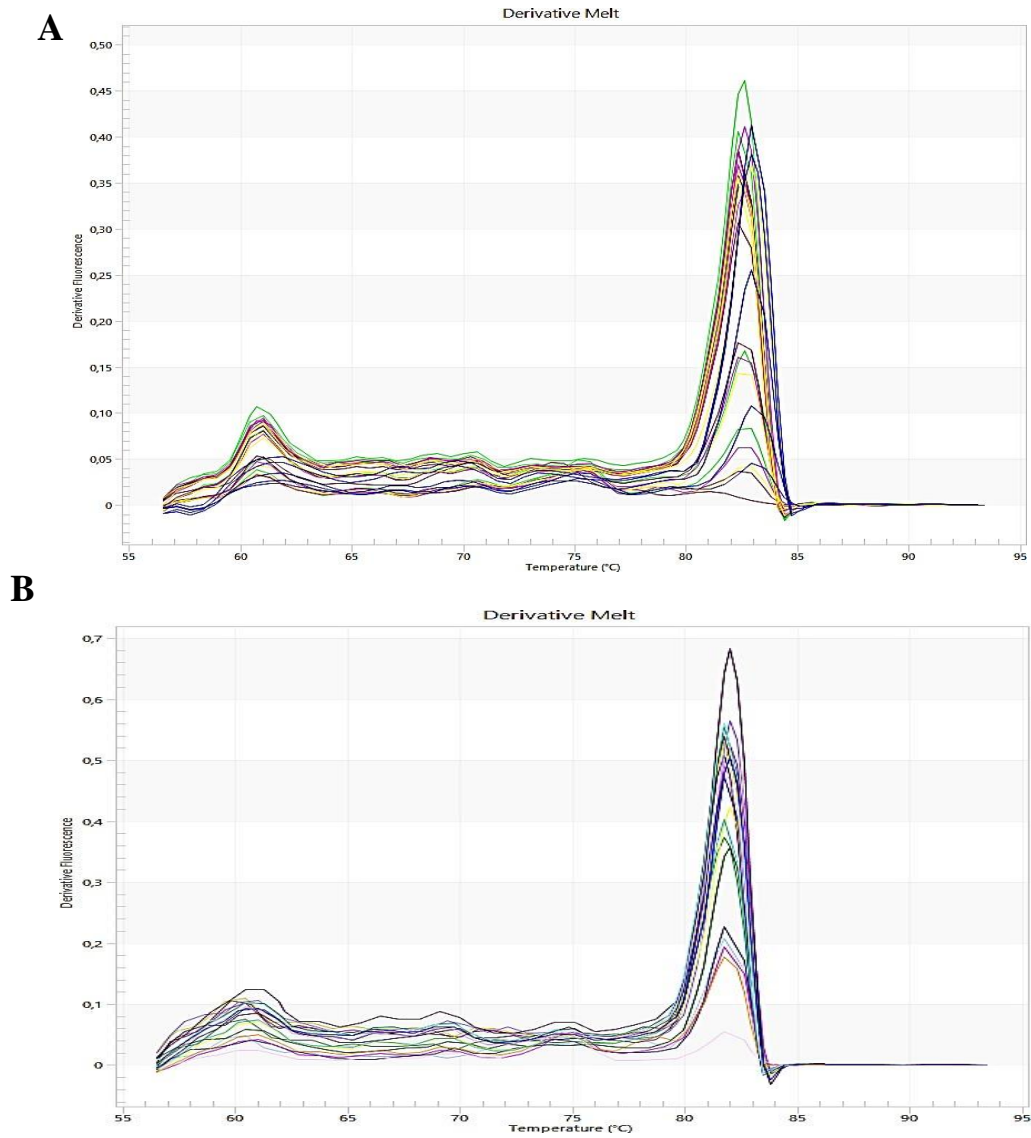


**Figura 6.** Reporte de la especificidad de los primers para *Salmonella spp.*



También, la especificidad de la amplificación se comprobó mediante el análisis de la curva de fusión, donde el amplicón mostró picos individuales en los todos los ensayos con algunas variaciones de intensidad (Figura 7), confirmando la especificidad de los primers *invA* en el ADN obtenido del cultivo puro. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) promedio que se obtuvo con los dos kits fue de 82,45 para el amplicón *invA*. Este valor es similar al obtenido por **Barletta et al. (2013)** con un  $T_m$  de 82,96 en el amplicón *invA* de *Salmonella spp.*

**Figura 7.** Curva de fusión para *invA*



*Nota.* **A** Figura correspondiente a la curva de fusión obtenido con Spin Column Soil DNA Miniprep Kit, donde se observa un solo pico. **B** Figura que corresponde a la curva de fusión obtenida con el ADN de QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, donde se observa un solo pico.

### 3.1.7. Reproducibilidad del método

La reproducibilidad del método se midió mediante réplicas de la cuantificación por PCR del gen *invA* para cada kit. En la Tabla 9 se muestran los resultados de las réplicas para el Spin Column Soil DNA Miniprep Kit (Biobasic, Markham, Canadá). Estos resultados muestran una menor variabilidad, ya que en todas las diluciones ( $1 \times 10^1 - 1 \times 10^{-5.5}$ ) la desviación estándar fue menor a 0,51 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0,35-1,71%.

**Tabla 9.** Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen *invA* obtenida con el kit 1

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	16,93	16,94	17,07	17,24	17,02	16,96	0,13	0,74
-2	20,19	20,49	20,88	20,86	20,15	20,43	0,35	1,71
-3	23,97	24,26	24,25	24,98	24,25	24,32	0,38	1,55
-4	28,83	28,81	28,88	28,49	29,3	29,08	0,29	1,00
-5	32,56	32,46	32,62	32,72	32,45	32,72	0,11	0,35
-5,5	34,41	33,59	34,53	34,98	34,88	34,47	0,51	1,48

\*SD= desviación estándar

\*CV= coeficiente de variación

En la Tabla 10 se muestran los resultados de las réplicas para el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit. En todas las diluciones ( $1 \times 10^1 - 1 \times 10^5$ ) la desviación estándar fue menor a 0,13 ciclos de amplificación y los coeficientes de variación tuvieron un rango de 0.47-1.55%, lo que indica una menor variabilidad de los resultados.

**Tabla 10.** Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen *invA* obtenida con el kit 2

Dilución	Ct1x	Ct2x	Ct3x	Ct4x	Ct5x	Media CT	SD	CV (%)
-1	19,02	18,59	18,99	19,23	19,06	18,98	0,24	1,24
-2	22,45	22,5	22,34	22,7	22,54	22,51	0,13	0,59
-3	26,52	26,24	26,68	26,48	27,05	26,59	0,30	1,13
-4	30,48	30,35	29,83	30,35	31,15	30,43	0,47	1,55
-5	34,15	33,84	33,59	33,68	33,43	33,74	0,27	0,81

\*SD= desviación estándar

\*CV= coeficiente de variación

### 3.1.8. Evaluación de la estandarización de la PCR en tiempo real basado en PMAxx™

La qPCR se ha utilizado como una herramienta eficaz para cuantificar patógenos por sus ventajas de ahorro de tiempo, bajo costo y fácil operación. Sin embargo, esta técnica no tiene la capacidad de diferenciar células viables de las no viables (Connolly, 2021; J. Zhang et al., 2020). Por lo tanto, en el presente estudio se desarrolló un ensayo de qPCR con un pretratamiento con el tinte intercalante PMAxx™ para detectar y cuantificar *S. Infantis* en contenido cecal de aves de corral.

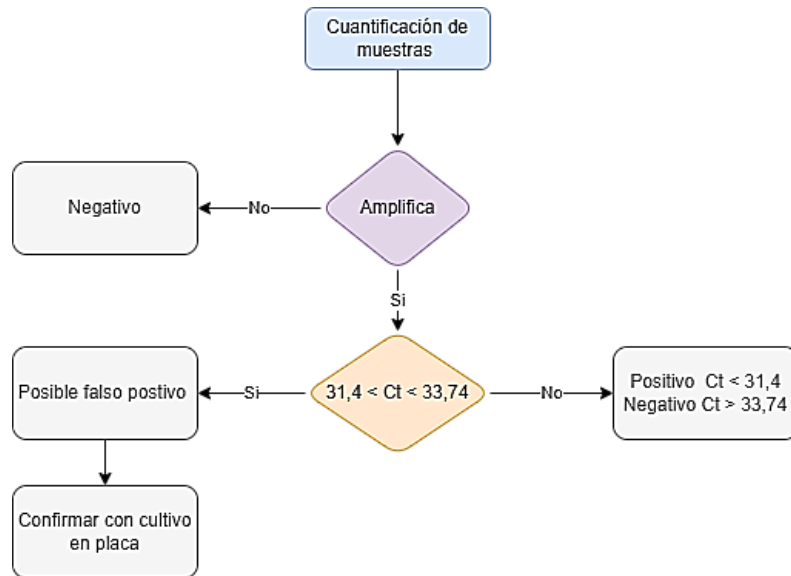
Los resultados obtenidos muestran que la cantidad y concentración del tinte usado inhibió significativamente ( $P < 0,05$ ) la amplificación del ADN del cultivo no viable de *Salmonella*. Se evidencia un valor de Ct más alto con el tratamiento que se aplica el tinte que sin él, esta reducción de la señal fue de 10 Ct aproximadamente (Anexo B). La concentración de PMAxx™ utilizada es la recomendada por el fabricante de la versión mejorada de PMA, sin que este afecte la señal de las células vivas (Biotium, 2017). De igual manera, Zhang et al. (2020) informaron de un método optimizado de qPCR donde 10 µL de 2,5 mM de PMAxx™ fue suficiente para la diferenciación de células viables y

no viables de *Salmonella* en muestras de suelo. Aunque la reducción de la señal de las células muertas fue significativa, no se consiguió la extinción total de la misma. Según **Barbau-Piednoir et al. (2014)** el aumento de la concentración de PMA no reduce completamente la señal de qPCR de las muestras muertas de *Salmonella* Enteritidis. Por el contrario, altas concentraciones de PMA podrían reducir la señal de bacterias viables que estén a bajas concentraciones, lo que conlleva a tener resultados falsos negativos (**Liu & Mustapha, 2014**).

En la estandarización de métodos moleculares se tienen en cuenta los criterios de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. La correcta evaluación y verificación de estos criterios permitirá demostrar que las técnicas de qPCR es adecuada para su finalidad prevista (**Eugster et al., 2020**).

La sensibilidad o límite de detección se define como el menor número de copias de *Salmonella* que da un resultado positivo (**Eugster et al., 2020**). De acuerdo con las curvas estándar obtenidas, el límite de detección experimental se fijó en 132,19 (kit 1) y 143.13 (kit 2) copias de *Salmonella*. Sin embargo, es necesario la modificación de estos límites alrededor del 31,4 Ct equivalente a 710 copias de *Salmonella*. Esto se debe a que al aplicar el tratamiento con el tinte de viabilidad bacteriana aún se detecta la presencia de *invA* en el Ct 31,4. Entonces, aquellas muestras desconocidas que se desean detectar y cuantificar se considerarán positivas solo hasta el Ct de 31,4 y negativas cuando se tenga un  $Ct \geq 33,74$ . Los que se encuentre entre los Ct 31,4 y 33,74 deben considerarse con precaución, pues podrían representar falsos positivos (Figura 8). Por el contrario, **Zhang et al. (2020)** reporta en su estudio un límite de detección de *invA* en cultivos puros y muestras de suelo enriquecidas de  $10^1$  y  $10^2$  células de *Salmonella*. Asimismo, el límite de detección en otra investigación en camarones contaminados artificialmente con *Salmonella spp.* fue de  $10^2$  UFC/mL (**Xiao et al., 2015**). Esto sugiere que se debe mejorar la optimización del método PMAxx<sup>TM</sup>-qPCR con el fin de obtener límites de detección más bajos.

**Figura 8.** Diagrama de toma de decisiones para la cuantificación de muestras de acuerdo con el límite de detección



La reproducibilidad del método se evalúa mediante medidas estadísticas de imprecisión como la desviación estándar (SD) o el coeficiente de variación (CV). En este estudio se utilizó el coeficiente de covarianza que mide la variación alrededor de la media para evaluar el grado de inconsistencia de los resultados (Taylor et al., 2019). En este ensayo se realizaron 5 réplicas, donde las desviaciones estándar fueron menores a 1 y el CV fue menor al 15%, lo que indica que la técnica fue reproducible (Burd, 2010).

Otros parámetros adicionales que determinan el rendimiento de la qPCR son la eficiencia de amplificación y linealidad del método (ThermoFisher Scientific, 2016). Los resultados indican una buena correlación con los dos kits de extracción de 0,997 y 0,999, llegando a un valor aproximado de 1. Esto indica que la curva estándar puede utilizarse para cuantificar la cantidad de *Salmonella spp.* (Applied Biosystems, 2010). En relación con la eficiencia de la qPCR se observa que con el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit se obtuvo mayor rendimiento de la secuencia objetivo del patógeno con una eficiencia del 84,95%. Caso contrario sucede con el Spin Column Soil DNA Miniprep Kit, con la que

se obtuvo una eficiencia por debajo del rango aceptable de 80 – 120% (**Callbeck et al., 2013; Nybo, 2018; Ruijter et al., 2021; T. Zhang & Fang, 2006**).

Los factores que pueden afectar en la eficiencia de la qPCR son las relacionadas con las secuencias y estructuras de los primers y de la plantilla, reactivos usados y sus concentraciones subóptimas, errores de pipeteo, equipos sin calibración vigente, el instrumento de qPCR que se utilice y materiales de laboratorio contaminados (**Life Technologies, 2014; Svec et al., 2015**). Principalmente, **Koetsier y Cantor (2019)** mencionan que los contaminantes como proteínas, carbohidratos y fenoles que tenga la muestras después de la extracción del ADN pueden inhibir la qPCR. Otro aspecto importante que expresa **Svec et al. (2015)**, es que se recomienda extraer el fragmento con la secuencia objetivo del ADN genómico o plasmídico que contiene el gen de interés, con el fin de eliminar el superenrollamiento que pueda interferir en el ensayo (**Satyanarayana et al., 2004**).

El pipeteo incorrecto de volúmenes pequeños puede afectar a la eficiencia de la qPCR, ya que se tendrá una pendiente de la curva estándar inexacta, aunque se tenga un valor de  $r^2$  potencialmente bueno ( $\geq 0,99$ ) (**Taylor et al., 2019**). También, el instrumento que se utilice para la qPCR tiene una interacción con la pendiente de la curva estándar, influyendo en la eficiencia de la qPCR media. Este impacto dependerá de la configuración del instrumento (umbral), como también de los detalles de excitación y emisión (**Svec et al., 2015**). Por otra parte, **Forsell et al. (2015)** explican en su estudio que la selección de consumibles de plásticos de qPCR y los sistemas de sellado pueden influir en la eficiencia y variabilidad de los datos. Por ejemplo, las placas blancas muestran una mayor eficiencia de amplificación por una mayor reflexión de la fluorescencia que las placas transparentes.

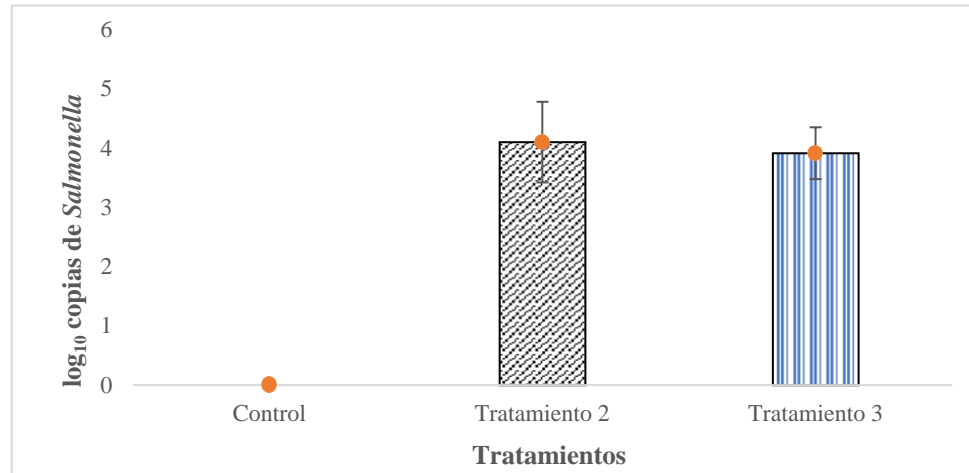
### **3.1.9. Aplicación del método optimizado de PMAxx<sup>TM</sup> – qPCR para cuantificar muestras de origen avícola**

Una vez que se evaluaron todos los parámetros para la validación del rendimiento de la qPCR, se establece que la optimización de PMAxx<sup>TM</sup> – qPCR con QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit fue la empleada para estimar la cuantificación de muestras de contenido cecal de pollos broiler. En base a los resultados, este resultó ser específico, fiable, eficiente y rápido para su uso previsto. Aunque, se puede considerar el uso del método con Spin Column Soil DNA Miniprep Kit optimizándolo de mejor manera para mejorar su eficiencia.

Los resultados de la cuantificación de las muestras avícolas se expresaron en log<sub>10</sub> copias de *Salmonella* por g de contenido cecal (Figura 9). Se evidencia que el método optimizado se puede utilizar para diferenciar la carga de viable y no viable de *Salmonella* en muestras de contenido cecal para una estimación más precisa de la cantidad del patógeno presente y evitar resultados sobreestimados. Estas muestras de contenido cecal fueron sometidas a distintos tratamientos (dietas) para probar si reducen o eliminan la colonización por *S. Infantis*. Este estudio al formar parte del proyecto “Aplicación del probiótico *Lactobacillus fermentum* con una dieta enriquecida con biomasa de microalgas como fuente de prebióticos para reducir la colonización con *Salmonella enterica* serovar *Infantis* en pollos broiler”, no puede darse mayor detalle de cada tratamiento y resultados del mismo.



**Figura 9.** Cuantificación de las muestras de contenido cecal de pollos broiler



## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

Se estandarizó el método de qPCR basado en el tinte de viabilidad bacteriana PMAxx™, donde 6,25 µL del tinte a una concentración de 5 mM inhibió significativamente las células muertas para una diferenciación más precisa de la carga viable y no viable de *Salmonella*. La qPCR para *Salmonella spp.* demuestra tener una sensibilidad y especificidad adecuada, por lo que puede ser usada para la cuantificación de la carga viable de *Salmonella spp.* en contenido cecal de origen avícola.

Se optimizó la composición de la mezcla de reacción de qPCR - PMAxx™ basándose en lo recomendado por el fabricante del Kit de Viabilidad bacteriana de qPCR PAM™ (Biotium, Estados Unidos) con 5 µL de la plantilla de ADN, 0,4 µL del primer y 0,5 de ROX para evitar estructuras secundarias, Ct muy bajos y normalizar la reacción. También, se optimizó las condiciones de la reacción de qPCR como se describe en el trabajo.

Se obtuvo la ecuación de la recta a partir de un cultivo puro de *Salmonella* para el gen *invA* con el ADN obtenido de dos kits de extracción. Los resultados indicaron que con el ADN del QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit se obtuvo un mejor rendimiento de la reacción con una eficiencia del 84,95% y una correlación lineal mayor a 0,99, por lo que se recomienda usarlo en investigaciones futuras. Sin embargo, queda a criterio de cada investigador tomar la decisión de que kit de extracción le genera mejores resultados.

Se evaluó la aplicabilidad del método en muestras de contenido cecal de pollos broiler, donde la técnica logró cuantificar la carga de *Salmonella* viable en este tipo de muestras. Las investigaciones posteriores que se realicen podrían utilizar este método optimizado para la cuantificación de *Salmonella* viable en otras matrices de origen avícola, como polvo, huevos, carne, piensos, etc.

#### **4.2. Recomendaciones**

Utilizar equipos de laboratorio con calibración vigente, materiales libres de contaminación y áreas que sean de uso exclusivo para la realización de ensayos de qPCR, para evitar interferencias que conlleven a resultados poco confiables.

Tener sumo cuidado en el proceso de extracción de ADN, pues si no se eliminan residuos de los reactivos usados o se da un mal manejo de la muestra conlleva a procesos de inhibición de la qPCR.

Realizar un spin de las placas antes de colocarla en el Termociclador Illumina Eco™ Real-Time PCR System, para eliminar burbujas que se encuentren y evitar que la mezcla quede pegada a las paredes de los pocillos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, N. M. (2016). Detection of Salmonella species in chicken carcasses using genus specific primer belong to invA gene in Sohag city, Egypt. *Veterinary World*, 9(10), 1125–1128. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1125-1128>
- Adley, C., & Ryan, M. (2016). The Nature and Extent of Foodborne Disease. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 1–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2>
- Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Carfora, V., Amoruso, R., Cordaro, G., Di Matteo, P., Ianzano, A., Iurescia, M., Diaconu, E. L., Pedersen, S. K., Guerra, B., Hendriksen, R. S., Franco, A., & Battisti, A. (2020). Molecular epidemiology of salmonella infantis in europe: Insights into the success of the bacterial host and its parasitic pesi-like megaplasmid. *Microbial Genomics*, 6(5), 1–12. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000365>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*, 2015(Table 3). <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Applied Biosystems. (2010). *Applied Biosystems 7000/7500 fast real Time PCR System*.
- Barbau-Piednoir, E., Mahillon, J., Pillyser, J., Coucke, W., Roosens, N. H., & Botteldoorn, N. (2014). Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead Salmonella serovar Enteritidis. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.003>
- Bari, L., & Yeasmin, S. (2018). Foodborne Diseases and Responsible Agents. In *Food Safety and Preservation* (pp. 195–229). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978->

0-12-814956-0.00008-1

- Barletta, F., Mercado, E., Lluque, A., Ruiz, J., Cleary, T. G., & Ochoa, T. J. (2013). Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2822–2829. <https://doi.org/10.1128/JCM.01397-13>
- Barreto, M., Castillo, M., & Retamal, P. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Infectología Al Día*, 27(11), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.002>
- BIO BASIC. (2017). *EZ-10 Spin Column Soil DNA Miniprep Kit* (p. 1). BIO BASIC.
- Biotium. (2017). *PMA™ Real-Time PCR Bacterial Viability Kit - Salmonella enterica (invA)* (pp. 1–3). biotium.
- Burd, E. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 550–576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09>
- Callbeck, C. M., Sherry, A., Hubert, C. R. J., Gray, N. D., Voordouw, G., & Head, I. M. (2013). Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.03.010>
- Carrero, A. (2021). *Validación intra-laboratorio de la técnica de PCR en tiempo real para detección de Escherichia coli del serogrupo O157 en alimentos* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/79776/1090443848.2021.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J., Stein, R., & Ge, B. (2011). Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4008–4016. <https://doi.org/10.1128/AEM.00354-11>

- CONAVE. (2020). “*Estadísticas del sector avícola. 377 Estadísticas (2020).*” CONAVE.  
<https://www.conave.org/estadisticas/>
- Connolly, C. (2021). *Use of viability qPCR for quantification of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes in food safety challenge studies* (Issue May) [The Pennsylvania State University].  
[https://etda.libraries.psu.edu/files/final\\_submissions/23717](https://etda.libraries.psu.edu/files/final_submissions/23717)
- Cosby, D., Cox, N., Harrison, M., Wilson, J., Jeff Buhr, R., & Fedorka, P. (2015). Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), 408–426. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv038>
- Dar, M. A., Ahmad, S. M., Bhat, S. A., Ahmed, R., Urwat, U., Mumtaz, P. T., Bhat, S. A., Dar, T. A., Shah, R. A., & Ganai, N. A. (2017). Salmonella typhimurium in poultry: A review. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 345–354. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000204>
- De Ronde, M. W. J., Ruijter, J. M., Lanfear, D., Bayes-Genis, A., Kok, M. G. M., Creemers, E. E., Pinto, Y. M., & Pinto-Sietsma, S. J. (2017). Practical data handling pipeline improves performance of qPCR-based circulating miRNA measurements. *Cold Spring Harbor Laboratory Press for the RNA Society*, 23(5), 811–821. <https://doi.org/10.1261/rna.059063.116>
- Dmitric, M., Vidanovic, D., Matovic, K., Sekler, M., Saric, L., Arsic, M., & Karabasil, N. (2018). In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV A and TTR genes of Salmonella spp. in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13455>
- Efremova, A. (2018). Role of Poultry Industry in Public Food Supply. *Proceedings of the International Scientific Conference “Economic Sciences for Agribusiness and Rural Economy,”* 7(2), 29–36. <https://doi.org/10.22630/esare.2018.2.2>
- EFSA. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 17(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>

- EFSA. (2021). Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to poultry products in the EU/EEA and the United Kingdom. *EFSA Supporting Publications*, 18(3), 1–29. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.en-6486>
- EFSA & ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- EFSA & ECDC. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., & Köppel, R. (2020). Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products. *European Food Research and Technology*, 230(1), 55–61.
- eurostat. (2021). *Agricultural production - livestock and meat*. [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural\\_production\\_-\\_livestock\\_and\\_meat&oldid=549389](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat&oldid=549389)
- FAO/WHO. (2009). Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series*, 1–6.
- FAO. (2021). Meat market review. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, December*, 1–13. <http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
- Feng, C., & Zhu, X. (2019). Signal amplification. In *Nano-inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications* (pp. 287–312). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815053-5.00012-X>
- Forsell, J., Koskiniemi, S., Hedberg, I., Edebro, H., Evengård, B., & Granlund, M. (2015). Evaluation of factors affecting real-time PCR performance for diagnosis of entamoeba histolytica and entamoeba dispar in clinical stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 1053–1062. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000129>

- García, S., Abdel, M., Tomaso, H., Linde, J., & Methner, U. (2020). Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar *Infantis* of Multilocus Sequence Type 2283 in German Broiler Farms. *Frontiers in Microbiology*, *11*(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01741>
- González-Escalona, N., Brown, E. W., & Zhang, G. (2012). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttrRSBCA* locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs. *Food Research International*, *48*(1), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.009>
- Jarquín, R., Hanning, I., Ahn, S., & Ricke, S. (2009). Development of rapid detection and genetic characterization of *Salmonella* in poultry breeder feeds. *Sensors*, *9*(7), 5308–5323. <https://doi.org/10.3390/s90705308>
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New England Biolabs*, *1*(1), 1–8. [https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs\\_analysis\\_of\\_na\\_concentration\\_and\\_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc](https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc)
- Leza, M. (2020). *Optimización de la técnica de PCR Punto Final y Tiempo Real para la detección de Salmonella enterica subsp. enterica serotipo Gallinarum en aislamientos bacterianos y tejidos biológicos obtenidos a partir de aves de corral Pasantía*. [https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/18879/TrabajoFinalPasantia\\_MakaylaLeza2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/18879/TrabajoFinalPasantia_MakaylaLeza2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Life Technologies. (2014). Realtime PCR handbook. *Realtime PCR Handbook*, 1–68. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FLR.pdf> <http://www.nature.com/doi/10.1038/tp.2014.12> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=405504>
- Liu, Y., & Mustapha, A. (2014). Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground

- beef by propidium monoazide real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, *170*, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.026>
- Logacho, C. (2015). *Detección de Salmonella Enteritidis, Typhimurium e Infantis en materia prima y alimento balanceado en un sistema productivo de pollos de engorde en la provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Lorenz, T. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, *63*, 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Monteiro, J., Vieira, F., Fonseca, I., Batista, J., Arcuri, E., Borges, M., Vieira, C., Oliveira, A., & Fonseca, M. (2019). Detection of viable Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in coalho cheese by real-time PCR. *Food Science and Technology*, *39*, 690–696. <https://doi.org/10.1590/fst.29318>
- Moragas, M., Valcárcel, S., Chirapozu, A., & de Pablo, B. (2019). *Normas Microbiológicas de los Alimentos y Asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, subproductos)*. <https://www.boe.es/doue/2013/068/L00019-00023.pdf>
- MSP. (2021). *Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos otras intoxicaciones alimentarias Ecuador, SE 37/ 202*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/10/Gaceta-General-SEM-37-ETAS.pdf>
- Nagy, T., Szmolka, A., Wilk, T., Kiss, J., Szabó, M., Pászti, J., Nagy, B., & Olasz, F. (2020). Comparative Genome Analysis of Hungarian and Global Strains of Salmonella Infantis. *Frontiers in Microbiology*, *11*(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00539>
- Nair, D. V. T., & Johny, A. K. (2019). Food Safety in Poultry Meat Production. In C. Springer (Ed.), *Food Safety in Poultry Meat Production* (pp. 1–24). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05011-5>
- Nidaullah, H., Abirami, N., Shamila-Syuhada, A. K., Chuah, L. O., Huda, N., Tan, T. P., Zainal Abidin, F. W., & Rusul, G. (2017). Prevalence of Salmonella in poultry



- processing environments in wet markets in Penang and Perlis, Malaysia. *Veterinary World*, 10(3), 286–292. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.286-292>
- Nkukwana, T. (2018). Global poultry production: Current impact and future outlook on the South African poultry industry. *South African Journal of Animal Science*, 48(5), 869–883. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i5.7>
- Nybo, K. (2018). qPCR efficiency calculations. *BioTechniques*, 51, 401–402. <https://doi.org/10.2144/000113776>
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Antimicrobial resistance of Salmonella spp isolated animal food for human consumption. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(1), 32–44. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>
- Ruijter, J. M., Barnewall, R. J., Marsh, I. B., Szentirmay, A. N., Quinn, J. C., van Houdt, R., Gunst, Q. D., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clinical Chemistry*, 67(6), 829–842. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab052>
- Saravanan, S., Purushothaman, V., Murthy, T. R. G. K., Sukumar, K., Srinivasan, P., Gowthaman, V., Balusamy, M., Atterbury, R., & Kuchipudi, S. V. (2015). Molecular Epidemiology of Nontyphoidal Salmonella in Poultry and Poultry Products in India: Implications for Human Health. *Indian Journal of Microbiology*, 55(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0530-z>
- Satyanarayana, P., Ossakow, S. L., Huba, J. D., & Guzdar, P. N. (2004). Rayleigh-Taylor Instability in the Presence of a Stratified Shear Layer. *Journal of Geophysical Research*, 89(A5), 2945–2954. <https://doi.org/10.1029/JA089iA05p02945>
- Schultz, B. M., Melo-Gonzalez, F., Salazar, G. A., Porto, B. N., Riedel, C. A., Kalergis, A. M., & Bueno, S. M. (2021). New Insights on the Early Interaction Between Typhoid and Non-typhoid Salmonella Serovars and the Host Cells. *Frontiers in Microbiology*, 12(July), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.647044>

- Smith, S., Seriki, A., & Ajayi, A. (2016). Typhoidal and non-typhoidal Salmonella infections in Africa. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(12), 1913–1922. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2760-3>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- ThermoFisher Scientific. (2016). Real-time PCR handbook. In *Appliedbiosystems* (Vol. 35).
- Tyson, G. H., Li, C., Harrison, L. B., Martin, G., Hsu, C. H., Tate, H., Tran, T. T., Strain, E., & Zhao, S. (2021). A Multidrug-Resistant Salmonella Infantis Clone is Spreading and Recombining in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 27(6), 792–799. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0389>
- Valle, M. (2019). *Validación de técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos* (Vol. 8, Issue 5) [Universidad Técnica de Ambato]. [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30546/1/BQ\\_209.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30546/1/BQ_209.pdf)
- Vinueza, C., Baquero, M., Medina, J., & Zutter, L. (2019). Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of Salmonella collected from the broiler production chain within an integrated poultry company. *International Journal of Food Microbiology*, 299, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.014>
- Vinueza, C., Cevallos, M., Ron, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016). Prevalence and diversity of Salmonella serotypes in ecuadorian broilers at slaughter age. *PLoS ONE*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>

- Voss, D., Vaz, C. ., Alves, L., Coldebella, A., Leao, J., Rodrigues, D., & Back, A. (2015). A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, *94*(3), 433–441. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>
- Wahyono, N., & Utami, M. (2018). A Review of the Poultry Meat Production Industry for Food Safety in Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, *953*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/953/1/012125>
- WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. *World Health Organization*, 1–1. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6\\_3884-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884-1)
- World Organisation for Animal Health. (2013). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In *OIE Terrestrial Manual* (7th ed., Issue May).
- Xiao, L., Zhang, Z., Sun, X., Pan, Y., & Zhao, Y. (2015). Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. *Food Control*, *57*, 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.050>
- Yoshida, C., Simone Gurnik, Ahmad, A., Blimkie, T., Murphy, S. A., Kropinski, A. M., & Nash, J. H. E. (2016). Evaluation of Molecular Methods for Identification of. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(8), 1992–1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.00262-16>.Editor
- Yulistiani, R., Praseptiangga, D., Supyani, & Sudibya. (2019). Occurrences of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in chicken meat, intestinal contents and rinse water at slaughtering place from traditional market in Surabaya, Indonesia. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *633*(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/633/1/012007>
- Zhang, J., Khan, S., & Chousalkar, K. (2020). Development of PMAxx™-Based qPCR for the Quantification of Viable and Non-viable Load of *Salmonella* From Poultry Environment. *Frontiers in Microbiology*, *11*(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581201>

Zhang, T., & Fang, H. (2006). Application of real -time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 70, 281–289.

## ANEXOS

### ANEXO A. Análisis estadística ANOVA y prueba de Tukey

Análisis de Varianza de los tratamientos en la inhibición de células muertas

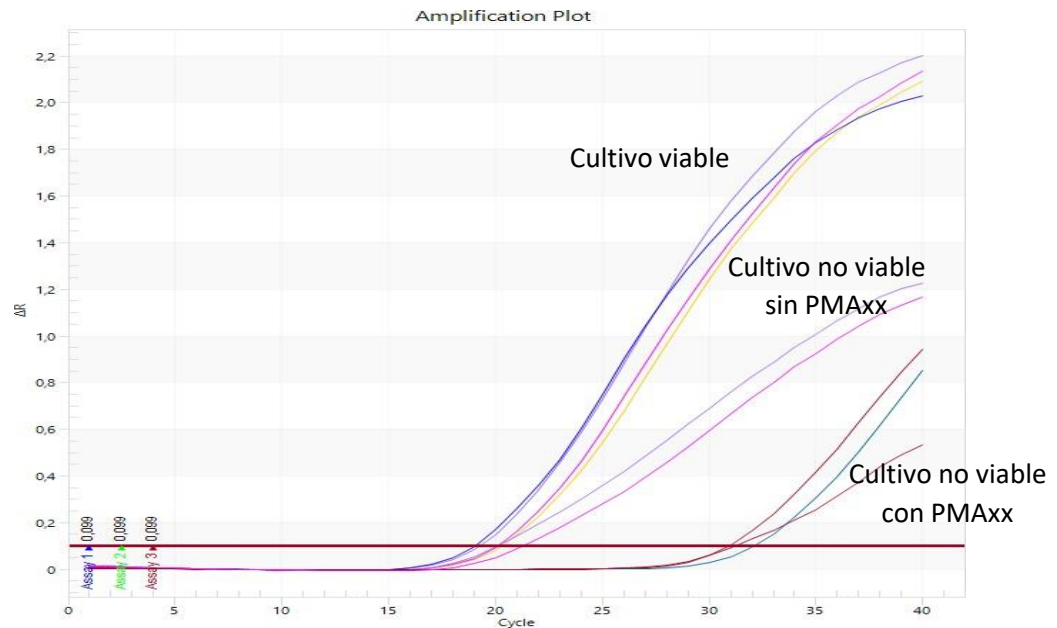
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	14,2694	7,13471	258,49	0,000
Error	5	0,1380	0,02760		
Total	7	14,4074			

#### Prueba de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	3	6,0294	A
2	3	5,7490	A
3	2	2,818	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### ANEXO B. Diferencia de Ct observada en los tratamientos para evaluar el efecto inhibidor del tinte PMAxx™



**ANEXO C. Cálculo del número de copias en qPCR del gen *invA* en la hoja de cálculo de Excel**

**Tabla 11.** Número de copias u valores de Ct del gen *invA* con el ADN del Spin Column Soil DNA Miniprep Kit

<b>Tamaño del genoma de Salmonella Infantis U1068s</b>	Bp	5003989
<b>Concentración del stock del ADN genómico</b>	ng/ $\mu$ L	29,000
<b>Masa de 1 molécula de Salmonella U1068S</b>	nanogr	5,48437E-06
<b>Nº copias in 1 <math>\mu</math>L stock</b>	Nº copias/ $\mu$ L	5,29E+06

<b>Dilución</b>	<b>Nº copias por <math>\mu</math>L</b>	<b>Vol reacción (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Nº copias en qPCR</b>	<b>log nº C</b>	<b>Ct1x</b>	<b>Ct2x</b>	<b>Ct3x</b>	<b>Ct4x</b>	<b>Ct5x</b>	<b>Media Ct</b>
-1	5,29E+05	5	2643876,12	6,42	16,93	16,94	17,07	17,24	17,02	17,04
-2	5,29E+04	5	264387,61	5,42	20,19	20,49	20,88	20,86	20,15	20,51
-3	5,29E+03	5	26438,76	4,42	23,97	24,26	24,25	24,98	24,25	24,34
-4	5,29E+02	5	2643,88	3,42	28,83	28,81	28,88	28,49	29,3	28,86
-5	5,29E+01	5	264,39	2,42	32,56	32,46	32,62	32,72	32,45	32,56
-5,5	2,64E+01	5	132,19	2,12	34,41	33,59	34,53	34,98	34,88	34,48

**Tabla 12.** Número de copias u valores de Ct del gen *invA* con el ADN del QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

<b>Tamaño del genoma de Salmonella Infantis U1068s</b>	Bp	5003989
<b>Concentración del stock del ADN genómico</b>	ng/μL	15,700
<b>Masa de 1 molécula de Salmonella U1068S</b>	nanogr	5,48437E-06
<b>Nº copias in 1 μL stock</b>	Nº copias/μL	5,29E+06

<b>Dilución</b>	<b>Nº copias por μL</b>	<b>Vol reacción (μL)</b>	<b>Nº copias en qPCR</b>	<b>log nº C</b>	<b>Ct1x</b>	<b>Ct2x</b>	<b>Ct3x</b>	<b>Ct4x</b>	<b>Ct5x</b>	<b>Media Ct</b>
-1	2,86E+05	5	1431339,83	6,16	19,02	18,59	18,99	19,23	19,06	18,98
-2	2,86E+04	5	143133,98	5,16	22,45	22,5	22,34	22,7	22,54	22,51
-3	2,86E+03	5	14313,40	4,16	26,52	26,24	26,68	26,48	27,05	26,59
-4	2,86E+02	5	1431,34	3,16	30,48	30,35	29,83	30,35	31,15	30,43
-5	2,86E+01	5	143,13	2,16	34,15	33,84	33,59	33,68	33,43	33,74

**ANEXO D. Cálculo de la concentración de las muestras de contenido cecal de origen avícola expresado en log<sub>10</sub> copias de *Salmonella***

**Ecuación de la recta obtenida con el método optimizado de QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit:**

$$yy = -3,7446xx + 42,011$$

Donde:

$$yy = CCCC$$

$$xx = llllll10 cllccccccc dddd SScllSSlSSdllllcc$$

**Tabla 13.** Cálculo de la concentración de contenido cecal

Tratamientos	log <sub>10</sub> copias de Salmonella									Media	Media log	SD
Control	R1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	R2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	R3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
1	R1	4,4467	4,9167	4,2250	3,8779	NA	NA	4,0541	5,1891	4,4516	4,1002	0,6806
	R2	4,1609	5,4481	3,9713	3,9206	NA	NA	3,9526	4,1769	4,2718		
	R3	4,2170	3,5520	2,2996	3,5520	NA	NA	3,8271	4,0167	3,5774		
2	R1	3,8538	4,5535	3,6509	4,1155	4,1182	4,4413	ND	ND	4,1222	3,9136	0,4375
	R2	3,6135	4,5428	2,9031	4,2624	3,7790	4,2998	ND	ND	3,9001		
	R3	3,5440	4,2063	3,4826	3,7096	3,5120	3,8565	ND	ND	3,7185		

\*NA = no aplica (sin amplificación)

\*SD = desviación estándar



## ANEXO E. Generación de la biomasa, Tinción con PMAxx™ y Extracción del ADN de los cultivos puros



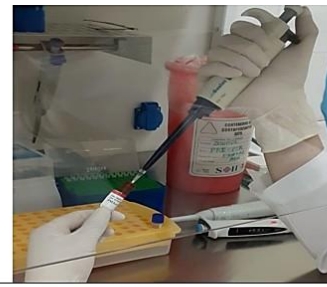
Aislamiento de la cepa de *S. Infantis* U1068s



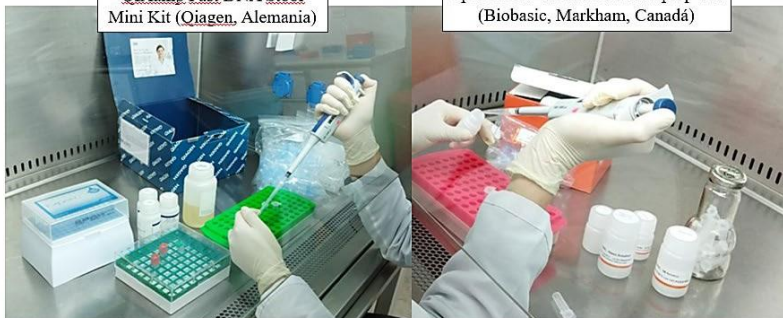
Generación de la biomasa en agua peptonada



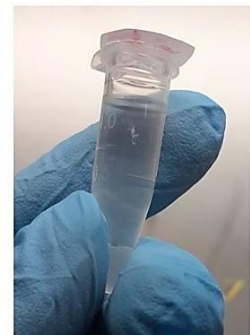
Centrifugado de la biomasa y resuspensión en solución salina



Tinción con el tinte de viabilidad bacteriana en las muestras de cultivo puro



Extracción del ADN de los cultivos puros mediante los dos kits



ADN puro

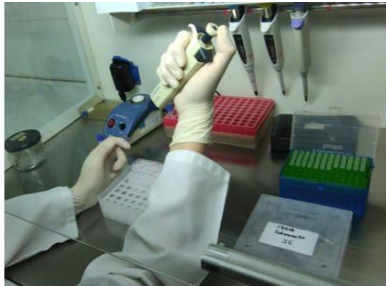
## ANEXO F. Elaboración de la qPCR en tiempo real



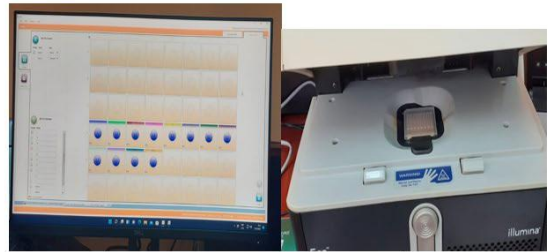
Elaboración de las diluciones a partir del ADN extraído de los cultivos puros



Preparación de la mezcla (Master Mix)



Colocación del ADN en los pocillos con el Master Mix

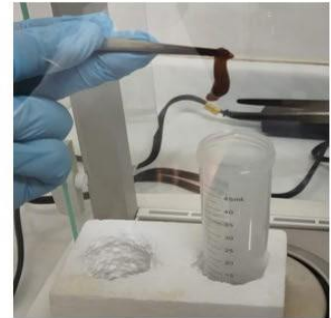


Cuantificación del gen *invA* por medio de qPCR

**ANEXO G. Toma, procesamiento y extracción del AND del contenido cecal de origen avícola**



Desinfección del ciego en con alcohol al 96%



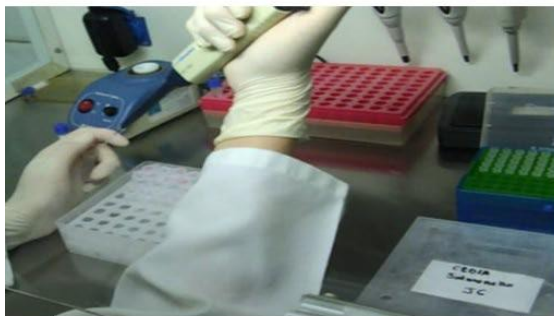
Pesaje de 1 g de contenido cecal



Centrifugación de residuos y obtención del pellet



Extracción del ADN de Las muestras con el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit



Colocación de las muestras en las placas con el Master Mix



Cuantificación de las muestras mediante qPCR