

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO EN SALUD- SELADIS



**OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN TIEMPO REAL “qPCR” PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO FRESCO**

Tesis para la obtención de Título de Especialidad en Análisis Fármaco- Químicos

“Mención Control de Alimentos”

Elaborado por: Lic. Zeyka Orellana Canedo

ASESORA: M.Cs. Angélica María Espada Silva

CO-ASESORA: M.Cs. Aneth Vásquez Michel

LA PAZ- BOLIVIA

Mayo-2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO EN SALUD- SELADIS



**OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN TIEMPO REAL “qPCR” PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO FRESCO**

Tesis para la obtención de Título de Especialidad en Análisis Fármaco- Químicos
“Mención Control de Alimentos”

Elaborado por: Lic. Zeyka Orellana Canedo

LA PAZ- BOLIVIA
Mayo-2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO EN SALUD- SELADIS



**OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN TIEMPO REAL “qPCR” PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO FRESCO**

Tesis para la obtención de Título de Especialidad en Análisis Fármaco- Químicos

“Mención Control de Alimentos”

Elaborado por: Lic. Zeyka Orellana Canedo

ASESORA: M.Cs. Angélica María Espada Silva

CO-ASESORA: M.Cs. Aneth Vásquez Michel

LA PAZ- BOLIVIA

Mayo-2019

DEDICATORIA

A Dios padre por darme fortaleza y siempre estar conmigo.

A mis padres, Rosario y Crecencio por su amor incondicional y ejemplo de vida.

A mis hermanos Jhonatan y América, por ser el motor

que me impulsa a seguir creciendo día a día.

Al amor de mi vida Diego, por ser mí principal apoyo y compañía.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto SELADIS y a sus autoridades, por hacer posible la realización de esta importante especialidad y por proveer a los residentes becarios todo lo necesario para la realización de este curso de especialidad y la producción de la presente tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés, por hacer posible la realización de esta prestigiosa especialidad.

A mis asesores, M.Cs. Angélica María Espada Silva, M.Cs. Aneth Vásquez Michel y M.Cs. Oscar Cárdenas Alegría, por su constante seguimiento, por su apoyo y confianza, y sobre todo por hacer posible el desarrollo del presente trabajo.

A los docentes de los diferentes Laboratorios del Instituto SELADIS, por la importante transmisión de sus conocimientos y experiencias, útiles para el crecimiento profesional de cada uno de los residentes.

A mis amigas Rosario y Patty, por el apoyo y amistad incondicional brindado.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos específicos	5
5. MARCO TEORICO.....	6
5.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos y <i>S. aureus</i>	6
5.1.1 Portadores y manipuladores	6
5.1.2 Intoxicación Alimentaria Estafilocócica	7
5.1.3 Epidemiología de las IAE	8
5.1.4 Epidemiología de IAE en Bolivia	9
5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
5.2.1 Patogenia y virulencia	12
5.2.1.1 Toxinas	13
5.2.2 Características moleculares y genéticas de <i>S. aureus</i>	13
5.3 Queso fresco	16
5.3.1 Características y propiedades de quesos frescos	16
5.3.2 Queso fresco como sustrato de <i>S. aureus</i> y alteraciones en el queso fresco causadas por microorganismos	17
5.4 Caracterización de <i>S. aureus</i>	17
5.5 Método Microbiológico de Recuento en Placa	19
5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa	20
5.7 PCR en Tiempo Real	22
5.7.1 Tipos de marcadores de fluorescencia	25
5.7.2 SYBR Green	25

5.7.3 Sondas TaqMan.....	26
5.8 Componentes y optimización de la reacción qPCR	28
5.8.1 Muestra de ADN.....	28
5.8.2 Diseño de los cebadores.....	28
5.8.3 DNA Polimerasa	29
5.8.4 Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).....	30
5.8.5 Tampón de la reacción	31
5.8.6 Sales	31
5.8.7 Temperaturas y tiempos de los ciclos.....	32
5.8.8 Número de ciclos.....	33
6. DISEÑO METODOLÓGICO	34
6.1 Tipo de Estudio.....	34
6.2 Lugar y contexto del estudio.....	34
6.3 Muestras de Estudio.....	34
6.3.1 Criterios de Inclusión	35
6.3.2 Criterios de Exclusión	35
6.4 Procedimientos	35
6.4.1 Cuantificación por el método Microbiológico de recuento en placa	35
6.4.1.1 Procedimiento del método Microbiológico de Recuento en Placa.....	36
6.4.1.2 Determinación de Límite de detección (LD), Límite de cuantificación (LC) y Nivel crítico (NC) del método aplicado para la cuantificación de <i>S. aureus</i>	40
6.4.2 Extracción de ADN.....	40
6.4.3 Optimización de la qPCR	44
6.4.3.1 Diseño de primers	44
6.4.3.2 Condiciones de reacción de la qPCR.....	45
6.4.3.3 Especificidad del método qPCR.	46
6.4.3.4 Sensibilidad del método qPCR.	47
6.4.3.5 Elaboración de curva estándar de cuantificación a partir de cultivo puro de <i>S. aureus</i>	47

6.4.3.6	Elaboración de curva estándar a partir de ADN extraído de queso fresco inoculado con concentraciones conocidas de <i>S. aureus</i>	48
6.4.4	Cuantificación de <i>S. aureus</i> en muestras de queso fresco, utilizando las técnicas de qPCR y el método Microbiológico.....	48
6.4.5	Análisis estadístico.....	48
7.	RESULTADOS.....	49
7.1 •	Determinación del Límite de detección (LD), Limite de cuantificación (LC) y Nivel crítico (NC) del método de recuento Microbiológico para cuantificación de <i>S. aureus</i> del LMA-SELADIS.....	49
7.2 •	Extracción de ADN.....	49
7.2.1	Correlación entre cantidad de UFC/g y ng/ul de ADN obtenidos a partir de cultivos de cepa de <i>S. aureus</i>	49
7.3	Optimización de la qPCR.....	50
7.3.1	Condiciones de reacción del método qPCR.....	50
7.3.2	Especificidad del método qPCR.....	51
7.3.3	Sensibilidad del método qPCR.....	52
7.4.	Elaboración de curvas estándar.....	52
7.4.1	Elaboración de curva estándar de cuantificación a partir de cultivo puro de <i>S. aureus</i>	52
7.4.2	Elaboración de curva estándar a partir de ADN extraído de queso fresco inoculado con concentraciones conocidas de <i>S. aureus</i>	54
7.5	Cuantificación de <i>S. aureus</i> en muestras de queso fresco, utilizando las técnicas de qPCR y el método Microbiológico.....	55
7.6	Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la cuantificación por los métodos qPCR y microbiológico.....	57
8.	DISCUSIÓN.....	57
9.	CONCLUSIÓN.....	62
10.	RECOMENDACIONES.....	62
	BIBLIOGRAFÍA.....	63
	ANEXOS.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microfotografía electrónica por barrido de <i>S. aureus</i>	10
Figura 2: Ciclo de Amplificación de la PCR.....	21
Figura 3: Amplificación exponencial de los productos de PCR.....	22
Figura 4: Cinética de Amplificación de la qPCR.....	24
Figura 5: Ecuación de la PCR.....	25
Figura 6: Representación del SYBR Green y su interacción con el ADN.....	26
Figura 7: Mecanismo de reacción de las sondas TaqMan	27
Figura 8: Método de recuento en placa.....	39
Figura 9: Flujograma de Pretratamiento para extracción de DNA.....	42
Figura 10: Flujograma de Extracción de ADN kit PrepSEQ® Rapid Spin.....	43
Figura 11: Secuencia genética de la región R18 del Gen <i>Nuc</i>	44
Figura 12. Condiciones de reacción de la qPCR para <i>S. aureus</i>	46
Figura 13: Curva Melting para <i>S. aureus</i> sin interferentes.....	51
Figura 14: Curva Melting para <i>S. aureus</i> con interferentes.....	51
Figura 15: Curva Estándar a partir de Cultivo de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	53
Figura 16: Curva de amplificación de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	54
Figura 17: Curva estándar a partir de matriz de queso fresco.....	55
Figura 18: Curva de amplificación de queso fresco inoculado.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i>	11
Tabla 2: Factores de virulencia asociados a <i>S. aureus</i>	12
Tabla 3: Toxinas producidas por <i>S. aureus</i> y sus efectos biológicos.....	13
Tabla 4: Ubicación de los genes que codifican las SEs de <i>S. aureus</i>	15
Tabla 5: Características del género <i>Staphylococcus</i>	19
Tabla 6: Preparación de la Master Mix PCR.....	45
Tabla 7: Valores del LD, LC y NC del método microbiológico.....	49
Tabla 8: Correlación entre UFC/g y ng/uL.....	50
Tabla 9: Pruebas de Sensibilidad por los métodos de qPCR y cultivo.....	52
Tabla 10: Tabla resumen curva estándar construida a partir de cultivo.....	53
Tabla 11: Tabla resumen curva estándar a partir de matriz de queso fresco.....	54
Tabla 12: Valores de concentración qPCR y cultivo microbiológico.....	48

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Muestras de queso fresco (17) colectadas para el análisis.....	68
ANEXO B: Observación de colonias de <i>S. aureus</i> en agar Baird Parker.....	69
ANEXO C: Observación de la prueba cuagulasa positiva negativa.....	69
ANEXO D: Observación de la prueba termonucleasa positiva y negativa.....	70
ANEXO E: Programación de corridas en el software del equipo StepOne.....	70
ANEXO F: Procesamiento de las muestras de queso naturalmente contaminadas	71

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Aw	Actividad de agua
BHI	Brain Heart infusion
CT	Cycle treshold
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatos
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
ETA	Toxina exfoliativa A
ETB	Toxina exfoliativa B
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
IAE	Intoxicación Alimentaria Estafilocócica
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de Detección
LMA	Laboratorio de Microbiología de Alimentos
NC	Nivel Crítico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVL	Toxina Panton-Valentine
qPCR	PCR en tiempo real
RELOAA	Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos Bolivia
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
SE	Enterotoxina Estafilocócica
SELADIS	Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud
STD	Estándar
TSST-1	Toxina del Síndrome del Shock Tóxico 1
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

La inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es reconocido en todo el mundo como un importante patógeno de origen alimentario, la cuantificación de rutina de *S. aureus* en alimentos se suele llevar a cabo aplicando el método de cultivo tradicional.

En los últimos años, se han propuesto varios métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos, los cuales a diferencia de las técnicas clásicas, se caracterizan por ser procedimientos más cortos y menos laboriosos.

El objetivo del presente trabajo fue el optimizar un método qPCR para la cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso fresco, mismo que se realizó en tres fases; en la primera se verificó el método de cultivo tradicional, aplicado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del SELADIS basado en la Norma Boliviana NB32004.

En la segunda fase se optimizó el método qPCR, utilizando el marcador de fluorescencia SYBR Green. Se establecieron las condiciones de reacción y aplicaron primers específicos dirigidos al gen *Nuc*, obteniéndose un método rápido que presenta resultados en un solo día, además de constituir una técnica específica y sensible (desde 10 UFC/g).

Con el método qPCR optimizado y el método de cultivo tradicional verificado, se continuó con la tercera fase, en la cual se analizaron por ambos métodos 17 muestras de queso fresco llegando a cuantificarse *S. aureus* en un 94% de las muestras analizadas. Comparando los resultados obtenidos por medio del análisis T de Student, se concluyó que ambos métodos, qPCR optimizado y el método de cultivo tradicional no presentan diferencias estadísticas significativas, por lo cual, se puede asumir que estos se pueden utilizar indistintamente para el análisis de recuento de *S. aureus*.

Palabras Clave: qPCR, cuantificación, queso fresco, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

The safety of food is a fundamental issue of public health. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is recognized worldwide as an important food-borne pathogen, routine quantification of *S. aureus* in food is usually carried out by applying the traditional culture method.

In recent years, several molecular methods based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been proposed for the detection and quantification of microorganisms in foods, which, unlike classical techniques, are characterized by being shorter and shorter less laborious.

The objective of the present work was to optimize a qPCR method for the quantification of *S. aureus* in samples of fresh cheese, which was carried out in three phases; in the first, the traditional culture method was applied, applied in the Food Microbiology Laboratory of SELADIS based on the Bolivian Standard NB32004.

In the second phase, the qPCR method was optimized, using the SYBR Green fluorescence marker. The reaction conditions were established and specific primers were applied to the *Nuc* gene, obtaining a rapid method that presents results in a single day, as well as constituting a specific and sensitive technique (from 10 CFU / g).

With the optimized qPCR method and the verified traditional culture method, the third phase was continued, in which 17 samples of fresh cheese were analyzed by both methods and *S. aureus* was quantified in 94% of the samples analyzed. Comparing the results obtained by Student's T-test, it was concluded that both methods, optimized qPCR and the traditional culture method do not present significant statistical differences, therefore, it can be assumed that these can be used interchangeably for the counting analysis. of *S. aureus*.

Keywords: qPCR, quantification, fresh cheese, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUCCION

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs) constituyen un problema de salud pública en todo el mundo y una causa importante de morbilidad, más de 250 enfermedades conocidas se transmiten a través del consumo de alimentos contaminados, entre estas se encuentra la Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE). (Carolina Palomino-Camargo¹, 2014)

La enumeración de patógenos transmitidos por alimentos es un aspecto principal del diagnóstico microbiológico molecular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada para este fin.

La detección y cuantificación de rutina de *S. aureus* en alimentos se lleva a cabo normalmente por métodos microbiológicos tradicionales, basados en el uso de medios selectivos de cultivo, los cuales permiten la cuantificación directa o la recuperación de los aislados después del enriquecimiento en caldo selectivo. Posteriormente, las colonias sospechosas se confirman mediante las pruebas de DNasa y coagulasa; esta metodología convencional, demanda de tres a cuatro días de trabajo en laboratorio (Pascual, 2000).

En contraste a las pruebas tradicionales de microbiología, la ventaja que brindan los procedimientos de biología molecular, como ser las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y qPCR (PCR cuantitativa), es que se puede lograr resultados en un tiempo corto (un día), lo que disminuye el tiempo de almacenamiento de productos en fabrica, permitiendo que estos salgan más rápido al mercado y aminoran costos. También permiten obtener resultados en tiempo corto en casos de relevancia epidemiológica como brotes.

Estas técnicas, son cada vez más utilizadas en los laboratorios de microbiología por su alta sensibilidad y especificidad, además de brindar la posibilidad de procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo. (P. Cremonesi, 2007)

Es importante que los métodos de análisis empleados para el análisis de *S. aureus* en alimentos, sean cuantitativos y permitan un recuento veraz y eficiente de este agente o de sus enterotoxinas, ya que muchos estudios refieren que para producirse la IAE es suficiente una concentración de 10^6 a 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. aureus* por gramo de alimento. Del mismo modo, una dosis de menos de 1 μ g de enterotoxinas en alimentos contaminados, que es producida por más de 10^5 UFC/g producirán los síntomas después de 1-6 horas en personas sensibles (FDA).

S. aureus es reconocido en todo el mundo como un importante patógeno de origen alimentario (Duquenne, 2012), el cual puede causar desde intoxicaciones alimentarias leves, hasta intoxicaciones graves que ponen en riesgo la vida. (Ochoa Coronel, 2017)

El queso fresco es un alimento lácteo de fabricación muy sencilla y de alto valor nutricional. (C.Ramirez-Lopez, 2012). Este alimento, constituye un ecosistema microbiano complejo y dinámico, caracterizado por la presencia de una gran variedad de bacterias, levaduras y mohos.

Algunos de estos microorganismos, contribuyen a la calidad organoléptica de los quesos, mientras que la presencia de otros microorganismos como *S. aureus* pueden dar lugar a un deterioro o constituir un riesgo para la salud.

Por las ventajas mencionadas y por la necesidad de implementar un procedimiento que permita la cuantificación de *S. aureus* en tiempos cortos a partir de muestras de alimentos; el presente trabajo, tuvo por objetivo el optimizar un protocolo para la cuantificación de *S. aureus* por el ensayo de qPCR, como alternativa de detección y cuantificación al método tradicional.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo y la optimización de metodologías alternativas para la detección y cuantificación de patógenos en alimentos, es una de las necesidades sobre la cual trabaja actualmente la microbiología de alimentos. (Carrillo-Inungaray, 2014)

Esto debido a que los métodos microbiológicos tradicionales utilizados para la cuantificación de *S. aureus* comúnmente son laboriosos y consumen demasiado tiempo (3 a 4 días).

Sumando a esto la posibilidad que algunas células bacterianas puedan entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta algunas veces el alimento, vemos que se nos imposibilita el uso de estos métodos basados en el cultivo como herramienta de detección y cuantificación.

Estas variables, aunadas a la demanda por resultados inmediatos ha conducido al desarrollo de una amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas.

Aunque muchos laboratorios alrededor del mundo han implementado métodos de qPCR para la cuantificación de patógenos, existen parámetros como, la extracción del ADN, la elección de primers y el tipo de programa de la PCR, que afectan la eficiencia de la reacción, por lo que se hace necesario optimizar un protocolo qPCR adecuado que permita realizar una sensible y específica cuantificación de *S. aureus* en matrices de alimento como el queso fresco.

Observando esta necesidad el presente trabajo optimizo un protocolo basado en el ensayo qPCR para la cuantificación rápida de *S. aureus* en quesos frescos con una alta sensibilidad, especificidad y que permitirá analizar grandes cantidades de muestras al mismo tiempo en una sola reacción.

3. JUSTIFICACIÓN

La IAE representa una grave amenaza para la salud de la población en general y una preocupación constante para la industria alimentaria y la vigilancia epidemiológica.

Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de patógenos de origen alimentario, son laboriosos y demandan mucho tiempo. El hecho de que se requieren resultados en tiempos cortos ha conducido al desarrollo de métodos rápidos para cubrir esta demanda.

Uno de los métodos que mejores resultados está reportando es el método qPCR, detectando y cuantificando microorganismo de interés a partir de diversas matrices de alimentos en tiempos cortos. (Santos, Almeida, Correia da Costa, & Lourenco, 2015)

La detección y cuantificación de patógenos como *S. aureus* mediante métodos moleculares se hace cada vez más popular en aspectos de calidad y seguridad, y en la producción de alimentos, debido a que estas técnicas suelen ofrecer muchas ventajas.

La qPCR, es fiel exponente de tales alcances; se puede ejecutar en tiempo corto con un buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, fácil automatización y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras.

No requiere condiciones aeróbicas o anaeróbicas en comparación con el método de cultivo clásico, no se encuentra influenciada por la presencia de otros microorganismos, puede ser monitoreada en tiempo real y la confirmación de amplificación específica puede observarse en las curvas de amplificación.

El contar con una técnica qPCR, permitirá al laboratorio de microbiología de alimentos ofrecer un servicio rápido (1 día) y eficiente a la industria alimentaria, a la vigilancia epidemiológica y a la población en general.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Optimizar el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de *S. aureus* en queso fresco.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el Limite de detección, Limite de cuantificación y Nivel crítico del método tradicional microbiológico de recuento en placa NB 32004 para cuantificación de *S. aureus*.
- Correlacionar la cantidad de UFC de *S. aureus* con la concentración de ADN de *S. aureus* obtenida.
- Definir las condiciones de análisis qPCR para la cuantificación de *S. aureus*.
- Elaborar curvas estándar de cuantificación a partir de concentraciones conocidas de ADN de *S. aureus*, extraído de cultivos puros y de queso fresco fortificado con *S. aureus*.
- Cuantificar *S. aureus* en muestras de queso fresco, utilizando las técnicas de qPCR y el método tradicional microbiológico de recuento en placa.
- Analizar estadísticamente los resultados obtenidos en los análisis de cuantificación de queso fresco por ambos métodos qPCR y microbiológico.

5. MARCO TEORICO

5.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos y *S. aureus*

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son originadas por consumir alimentos contaminados con toxinas o con una o varias bacterias patógenas (Ministerio de Salud, 2016). Dicha contaminación generalmente se presenta por el contacto del alimento con los manipuladores, es decir con las personas que están en contacto directo con los alimentos. (Alejo, 2011)

Respecto a la intoxicación provocada por *S. aureus*, la IAE es relativamente común, ya que sus toxinas son termoresistentes. Asimismo, se ha sabido que existe una amplia variedad de alimentos capaces de albergar al *S. aureus*, pero cabe destacar que los más susceptibles son aquellos que tienen contacto con la piel del animal, tal es el caso de la leche, el huevo, los productos cárnicos como el jamón y los quesos. (Zendejas-Manzo, 2014)

5.1.1 Portadores y manipuladores

Los manipuladores de mayor riesgo son aquellos cuyas prácticas de trabajo o acciones en ciertos procesos de producción pueden ser determinantes en relación con la seguridad y la salubridad de los alimentos. En el caso del queso fresco son los encargados de ordeñar a la vaca para obtener la leche, el personal encargado de preparar el queso y los encargados del almacenaje y expendio del queso fresco como producto terminado. (Zendejas-Manzo, 2014)

En nuestro medio, la mayor parte de quesos frescos de expendio en los mercados se realizan de forma casera y la cadena de obtención, procesamiento y comercio, puede ser realizado por un solo manipulador o varios, los cuales generalmente prestan poca atención a los cuidados de salubridad necesarios. Razón por la cual, es frecuente que estos productos sean portadores de *S. aureus* y otros patógenos, causando ETAs y poniendo en riesgo la salud de los consumidores.

5.1.2 Intoxicación Alimentaria Estafilocócica

La IAE se produce por la ingestión de alimentos contaminados que contienen las enterotoxinas termoestables producidas por *S. aureus*. La aparición de los síntomas de esta intoxicación son usualmente rápidas y en algunos casos son severas, dependiendo de la susceptibilidad individual a la toxina, de la cantidad de alimentos contaminados ingeridos, de la cantidad de toxinas presentes en los alimentos consumidos y de la salud general del consumidor.

Con respecto a la dosis requerida, muchos estudios refieren que para producirse la IAE es suficiente una concentración de 10^6 hasta 10^8 UFC de *S. aureus* por gramo de alimento. Del mismo modo, una dosis de menos de $1 \mu\text{g}$ de enterotoxinas en alimentos contaminados, que es producida por más de 10^5 UFC/g producirán los síntomas después de 1-6 h en personas sensibles; siendo los síntomas más comunes, las náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales y postración. (Zendejas-Manzo, 2014)

La mortalidad por IAE es rara, pero pueden llegar a ocurrir en personas susceptibles a la deshidratación, como ser ancianos, niños y personas inmunodeprimidas.

5.1.3 Epidemiología de las IAE

Históricamente, el primer dato que se tiene sobre un brote de IAE fue descrito por Vaughan y Sternberg, en Michigan en el año 1884, y se relacionó al consumo de queso cheddar contaminado con *Staphylococcus*. En ese entonces los autores describieron al agente causante como un *Micrococcus*. (Ovares, 2015)

La IAE puede constituir un alto porcentaje del total de los procesos de intoxicación alimentaria, su incidencia suele ser subestimada debido al carácter poco grave del proceso y a la falta de confirmación microbiológica en la mayoría de los casos. Se estima que solo del 1 al 5% de todos los casos de intoxicación son reportados al Departamento de Salud Pública en EEUU, donde se estima que la IAE corresponde al 14% del total de las ETAs; en Francia, *S. aureus* es la segunda causa de ETAs, después de *Salmonella*.

La IAE se caracteriza por ser autolimitante, sin embargo, se han reportado hospitalizaciones e incluso muertes debido a ésta (Ministerio de Salud, 2016), considerando que su distribución es a nivel mundial. Estudios realizados en los Estados Unidos por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC), muestran a la IAE como una de las principales causas de brotes de origen alimentario, encontrándose en el tercer puesto junto a *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

En Inglaterra, el 1.5 % de los brotes de ETAs entre los años 1992 y 2009 se relacionaron a *S. aureus*; esto corresponde a un total de 2530 casos reportados. (Cervantes-García, 2014); En Japón, en el año 2000, se reportó un importante brote, el cual se dio en el distrito de Kansai y afectó cerca de 13400 personas, estudios posteriores indicaron que la fuente de la intoxicación fueron productos derivados de la leche.

En Latinoamérica también se han producido un gran número de casos asociados a *S. aureus* y sus enterotoxinas. En Brasil, en el año 2004 se presentó un brote masivo que afectó a más de 4000 personas; en el 2007, se reportó un brote en Paraguay, el cual fue asociado al consumo de leche.

5.1.4 Epidemiología de IAE en Bolivia

En nuestro país, según la Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos Bolivia (RELOAA), se reportó que la contaminación por *S. aureus* en alimentos, tanto en las etapas de producción, almacenamiento, distribución y consumo fue superior al 30%. En esta vigilancia realizada a nivel nacional, los principales alimentos reportados como frecuentemente contaminados fueron el queso fresco y los embutidos. (RELOAA, 2010).

Sin embargo, la mayoría de los casos de IAE e incluso brotes pasan desapercibidos o no son documentados y reportados, esto debido principalmente al poco conocimiento de la población en general sobre las ETAs.

Los brotes por IAE en Bolivia están presentes, pero muy pocos son reportados y confirmados. Uno de los pocos brotes que fueron reportados, es el documentado por el Ministerio de Salud en el colegio Antonio Vaca Díez de la ciudad Cobija - Pando en fecha 20 de mayo de 2015, el cual estuvo asociado al consumo de pollo y que afectó a 500 personas, producto de los estudios de laboratorio, se aisló como agente causal a *S. aureus* y *Bacillus cereus*, esto debido presumiblemente a la mala manipulación de los alimentos del desayuno escolar. (Opinion, 2015)

5.2 *Staphylococcus aureus*

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *S. aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego “staphyle” que significa racimo de uvas, para describirlo.

S. aureus es la especie tipo del grupo *Staphylococcus*, considerado el más patógeno y responsable de un amplio espectro de enfermedades. (Cervantes-García, 2014)

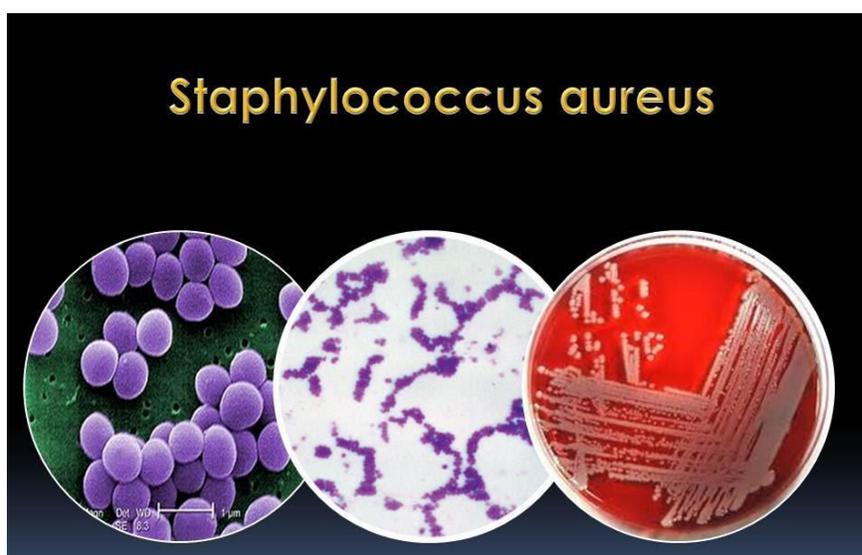


Figura 1: De izquierda a derecha: Microfotografía electrónica por barrido de *S. aureus* a nivel de μm . Observación microscópica de *S. aureus* con tinción Gram. Colonias blancas de *S. aureus* sobre agar sangre. (Ecología y Salud)

S. aureus es un coco, Gram positivo, perteneciente a la familia Staphylococcaceae, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado, mesófilo, de un tamaño aproximado de 0,5-1,5 μm , que se agrupa en racimos, de colonia con pigmento dorado, amarillo y a veces blanco.

Es un patógeno importante, ya que está involucrado en intoxicaciones alimentarias leves hasta intoxicaciones graves que ponen en riesgo la vida. (Ochoa Coronel, 2017)

Los parámetros óptimos para el crecimiento de *S. aureus* son variables (Tabla 1), sin embargo, en ocasiones incluso es resistente a la congelación, sobreviviendo perfectamente a temperaturas de -20°C , y aunque la viabilidad decrece notablemente durante la conservación en congelación, a temperaturas de -10°C a 0°C , las SE son muy estables y si sumamos la capacidad de este microorganismo de desarrollarse en ambientes salinos de hasta un 10% de concentración (Alejo, 2011), tenemos entonces ante nosotros, una de las bacterias más resistentes a condiciones ambientales.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento de *S. aureus*. (Alejo, 2011)

Parámetros	Óptimo	Rango
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40 – 45	10 - 48
pH	7 – 8	4,0 – 9,6
aw	0,98	0,85 - > 0.99
NaCl (%)	0	0 - 10
Potencial redox (E_h) (mV)	> + 200	< - 100 - > + 200
Atmósfera	Aerobia (5 – 20% oxígeno disuelto)	Aerobia - anaerobia

S. aureus es capaz de producir alrededor de 11 serotipos distintos de SE, además de otras toxinas de gran virulencia para los mamíferos, denominadas Toxina del Síndrome del Shock Tóxico-1 (TSST-1) y toxinas exfoliativas (ETA y ETB). Siendo las enterotoxinas, las responsables de producir las intoxicaciones alimentarias por la ingesta de productos contaminados, principalmente las de origen cárnico y lácteo (Ministerio de Salud, 2016)

5.2.1 Patogenia y virulencia

Son muchos los factores que hacen a *S. aureus* un microorganismo virulento, pudiéndose dividir estos en tres grandes grupos: componentes estructurales, componentes estructurales, enzimas y toxinas, como se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Factores de virulencia asociados a *S. aureus*. (Zendejas-Manzo, 2014)

Factores de virulencia asociados a *Staphylococcus aureus*

Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	
Componentes de la estructura	Efecto biológico
Cápsula	Es una adhesina; además, impide la quimiotaxis y la fagocitosis, inhibe la proliferación de células mononucleares
Peptidoglicano	Proporciona estabilidad osmótica y estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucocitario
Ácido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina
Proteína A	Altera función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno
Enzimas	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos
Fibrolisina	Disuelve los coágulos de fibrina
Lipasa	Hidroliza los lípidos
Nucleasa	Hidroliza el ADN
Penicilinas	Hidroliza la penicilina

5.2.1.1 Toxinas

S. aureus produce una gran variedad de toxinas, las cuales están divididas de acuerdo a los efectos biológicos que producen en las células, así como con su localización dentro de la célula bacteriana; presentando en resumen las siguientes toxinas (Tabla 3):

Tabla 3: Toxinas producidas por *S. aureus* y sus efectos biológicos. (Zendejas-Manzo, 2014)

Toxinas	Efecto biológico
Citotoxinas (α , β , δ y γ leucocidina)	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos
Toxina exfoliativa (ETA y ETB)	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis
Enterotoxinas (A-E, G-I)	Super antígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citosinas): estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo
Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1	Super antígenos (estimulan la proliferación de células T y la liberación de citosinas); produce extravasación o la destrucción de las células endoteliales

5.2.2 Características moleculares y genéticas de *S. aureus*

El desarrollo de la genómica y la disponibilidad que se tiene de la secuencia completa de nucleótidos de genoma de *S. aureus*, ha ayudado a generar técnicas nuevas para la detección y cuantificación de este patógeno. (Cervantes-García, 2014)

El genoma de *S. aureus* es circular, compuesto de aproximadamente 2.8 kb, con un contenido bajo de G-C (33%), además su genoma contiene 2,600 marcos de lectura abierta representando un 84.5% de su genoma.

La comparación del genoma indica que 50% de las proteínas codificadas en el cromosoma de *S. aureus* presentan gran homología con *Bacillus subtilis*, lo que sugiere que ambos organismos tuvieron un ancestro común y divergieron más tarde.

La mayoría de los genes homólogos son un grupo de genes conocidos como housekeeping que son necesarios para el crecimiento y división de la bacteria. (Cervantes-García, 2014)

Una característica sobresaliente del genoma de *S. aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones bacteriófagos e islas de patogenicidad), que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos. El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de conjugación, transformación y transducción del material genético a través de plásmidos móviles.

Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica. Se conocen varios tipos de transposones como el de la resistencia a eritromicina Tn551 codificado por el gen *ermB*.

La presencia de estos elementos móviles confirma la capacidad que tiene *S. aureus* para intercambiar genes por transferencia horizontal, tanto con los del mismo género como con otros géneros. El intercambio de los genes es la clave de *S. aureus* en la evolución, la peculiar plasticidad genética es una explicación del éxito de *S. aureus* para colonizar como para el desarrollo de enfermedades en el humano. (Cervantes-García, 2014)

Los principales genes y elementos móviles se detallan en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4: Ubicación de los genes que codifican las SEs de *S. aureus*. (Ovares, 2015)

Enterotoxina	Gen	Elemento en el cual se ubica	Regulación
SEA	<i>sea</i>	Profago	<i>agr</i> independiente
SEB	<i>seb</i>	Cromosomas, plásmidos, islas de patogenicidad	<i>agr</i> y <i>sar</i> dependiente
SEC (1, 2, 3)	<i>sec</i>	Plásmidos	<i>agr</i> y <i>sar</i> dependiente
SED	<i>sed</i>	Plásmidos	<i>agr</i> dependiente
SEE	<i>see</i>	Profagos	<i>agr</i> independiente
SEG	<i>seg</i>	<i>egc</i> (<i>enterotoxin gene cluster</i>), cromosomas	-
SEH	<i>seh</i>	Transposon	-
SEI	<i>sei</i>	<i>egc</i> , cromosomas	-
SER	<i>ser</i>	Plásmidos	-
SES	<i>ses</i>	Plásmidos	-
SET	<i>set</i>	Plásmidos	-
SEI (J, K, L, M, N, O, P, Q, U y V)	<i>sel</i> (<i>j, k, l, m, n, o, p, q, u y v</i>)	Islas de patogenicidad, plásmidos, cromosomas, profagos o <i>egc</i>	-

El gen de la Nucleasa termoestable (gen *Nuc*) es específico del *S. aureus* (Brakstad OG1, 1995), codifica para una proteína de la nucleasa termoestable con una masa molecular de 17.000 DA, 1 ng de ADN equivale a 6×10^5 copias del genoma entero y el gen *Nuc* es un gen de copia única (Ingeborg Hein, 2001), el cual permite la identificación molecular de *S. aureus* (Jaramillo-García, 2016)

La nucleasa estafilocócica, ha sido ampliamente caracterizada por muchos investigadores, consta de una sola cadena polipeptídica, 149 aminoácidos de longitud, esta proteína monomérica carece de puentes de disulfuro y se pliega y despliega reversiblemente. (Lin David, 1985)

5.3 Queso fresco

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, de textura y sensoriales difieren entre cada tipo. Se estima la existencia de más de 2000 variedades de queso, entre madurados, semi-madurados y frescos. No obstante, en nuestro país predomina el consumo de quesos frescos, las cuales presentan una humedad del 46 - 57%. (C.Ramirez-Lopez, 2012)

El queso es un producto obtenido por coagulación de la leche cruda o pasteurizada (entera, semidescremada y descremada), constituido esencialmente por caseína; mediante este proceso se logra preservar el valor nutritivo de la mayoría de los componentes de la leche, incluidas las grasas, proteínas y otros constituyentes menores, generando un sabor especial y una consistencia sólida o semisólida en el producto obtenido (Law Jhonson, 2011).

5.3.1 Características y propiedades de quesos frescos

El queso fresco presenta un color blanquecino, contextura blanda, aroma y sabor característico, además de compartir casi las mismas propiedades nutricionales de la leche. A excepción de la lactosa, los otros componentes se encuentran más concentrados en el queso a diferencia de la leche. Es un producto que brinda un excelente aporte de proteínas, calcio y fósforo.

Entre sus características, presenta en promedio una humedad entre 46 -57%; aw 0,96; grasas 18-29%; proteínas 17-21%; sal 1-3%; pH 6.1; calcio 1,3-1,8%; fosforo 1,0-2,3; kcal/100g 255±22. (C.Ramirez-Lopez, 2012). Estas propiedades nutricionales, hacen que los quesos sean alimentos apetecibles y nutritivos, no solo para los consumidores, sino también para los microorganismos que lo ven como un excelente sustrato en el que pueden subsistir y reproducirse.

5.3.2 Queso fresco como sustrato de *S. aureus* y alteraciones en el queso fresco causadas por microorganismos

El queso fresco puede contaminarse de diferentes formas que pueden alterar o no sus características y dependiendo del agente contaminante se distinguen la contaminación física, la química y la biológica. (Delgado, 2003)

En la Norma Boliviana NB33009 de 2003, se tiene como límite microbiológico, la cantidad máxima de 10 UFC/g de *S. aureus* en queso fresco, los productos que sobrepasen este límite pueden llegar a ser nocivos para la salud.

Las bacterias que con mayor frecuencia se encuentran en el queso, son las bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Escherichiacoli*, *S.aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus spp.*

El queso es un alimento fermentado que durante su elaboración alcanza recuentos de bacterias fermentadoras de hasta 10^9 UFC/g, necesarias para la transformación de la leche en queso (Delgado, 2003). Sin embargo, una carga microbiana muy elevada puede afectar a la calidad del producto, ya que la presencia de estos microorganismos se asocia con el deterioro precoz de los quesos o con fermentaciones anormales. (Islas, 2006)

5.4 Caracterización de *S. aureus*

En los medios de cultivo tradicionales, el *S. aureus* crece después de incubarse por aproximadamente 48 horas, formando colonias de 0.5 - 1.5 mm de diámetro. Sus colonias son de aspecto liso, elevado, brillante y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, producen β hemólisis o hemólisis total alrededor de sus colonias cuando se cultivan en agar sangre.

S. aureus crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, caldo BHI (BrainHeart infusión) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente. El medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios para su cuantificación, es el agar Baird Parker, este medio permite realizar la cuantificación caracterizada por una pigmentación negra de las colonias.

El agar Sal Manitol o medio de Chapman también se usa por su elevado contenido de sal, el cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas, este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por su pigmentación amarilla característica.

En la actualidad, se han venido desarrollando medios de cultivo que contienen agar base cromogénico específico para la detección de *S. aureus*; en presencia de enzimas específicas, los sustratos son modificados y los cromógenos tiñen específicamente las colonias, permitiendo realizar su identificación.

La identificación de *S. aureus* se puede realizar con el empleo de técnicas como la tinción de Gram y una variedad de pruebas bioquímicas, como ser la prueba de la catalasa, prueba de la DNAsa y fermentación de glucosa. En condiciones aeróbicas produce DNAsa, fosfatasa alcalina e hidrolasa (Camarena, 2014), cualidades junto con otras, que permiten su diferenciación de otras especies, como ser: *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

Tabla 5: Características que distinguen las tres especies principales del género *Staphylococcus*. (Hernandez, 2017)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Producción de coagulasa (s)	+	-	-
Ácido a partir de manitol (anaerobio)	+	-	-
Producción de toxina alfa	+	-	-
Proteína A en la pared celular	+	-	-
Fosfato de ribitol de tipo ácido teicoico en la pared celular	+	-	+
Fosfato de glicerol de tipo ácido teicoico en la pared celular	-	+	V
Crecimiento anaerobio y fermentación de glucosa	+	+	-
Sensibilidad a la novobiocina	+	+	-

S. aureus también puede identificarse y cuantificarse a través de técnicas moleculares, mediante la aplicación de la PCR y qPCR, utilizando genes específicos de especie. En ocasiones, también se requiere identificar cepas o grupos de cepas con fines epidemiológicos, para lo cual se pueden emplear técnicas fenotípicas y genotípicas. (Cervantes-García, 2014)

5.5 Método Microbiológico de Recuento en Placa

El protocolo basado en la Norma ISO (NB32004), el cual tiene como objeto, la cuantificación de *S. aureus* en alimentos, entre ellos el queso fresco. Esta técnica, presenta en su procesamiento, los siguientes pasos:

1. Aislamiento selectivo, se utiliza un medio selectivo sólido, el cual inhibe el desarrollo de microorganismos diferentes al *Staphylococcus*, pero además permite reconocer el desarrollo característico del microorganismo buscado.
2. Recuperación de la cepa, este paso permite restaurar células de *S. aureus*.

3. Identificación bioquímica, en este punto se identifica el género y especie de *S. aureus* mediante el uso de pruebas bioquímicas que dan reacción positiva para este microorganismo (presencia de la enzima coagulasa y enzima termonucleasa).

La cuantificación de *S. aureus* mediante extensión del inóculo en superficie, es la más utilizada y catalogada como prueba Gold Estándar para el análisis en muestras de alimentos. (Esteban, 2016)

5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa

A tres décadas de su aparición, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular. (Tamay-Dios, 2013)

Esta técnica utiliza gradientes de temperatura para la amplificación de un segmento de ADN en específico, para lo cual, es imprescindible el uso de una serie de reactivos que dan lugar al proceso de amplificación del material genético, entre estos tenemos los iniciadores o primers, la enzima polimerasa, un buffer, MgCl₂, dNTPs y agua libre de nucleasas.

Este proceso consta de tres etapas de cambios de temperatura que forman un ciclo de amplificación, el cual se repite por un número variable de veces; generalmente la PCR posee entre 30 a 40 ciclos.

La primera de estas etapas, es la de Desnaturalización, donde se produce la ruptura de los puentes de hidrógeno y ocasionando la separación de las hebras de ADN, la temperatura de reacción para este efecto es de 94 a 95°C.

La segunda etapa es la de Hibridación o Annealing, en la cual los cebadores se unen al ADN molde, reacción que se produce usualmente entre los 45 a 65°C. Esta etapa, es la que determina la especificidad de la reacción, ya que del diseño previo de los cebadores, dependerá la síntesis de productos inespecíficos y resultados falsos positivos.

La tercera etapa se conoce como de Extensión, en esta fase actúa la enzima ADN Polimerasa, la cual se encargara de sintetizar las nuevas hebras hijas a partir de la región en la cual se produjo la unión Cebador – ADN molde. Está fase usualmente se produce a una temperatura de 72 °C. (Chirinos-Arias)

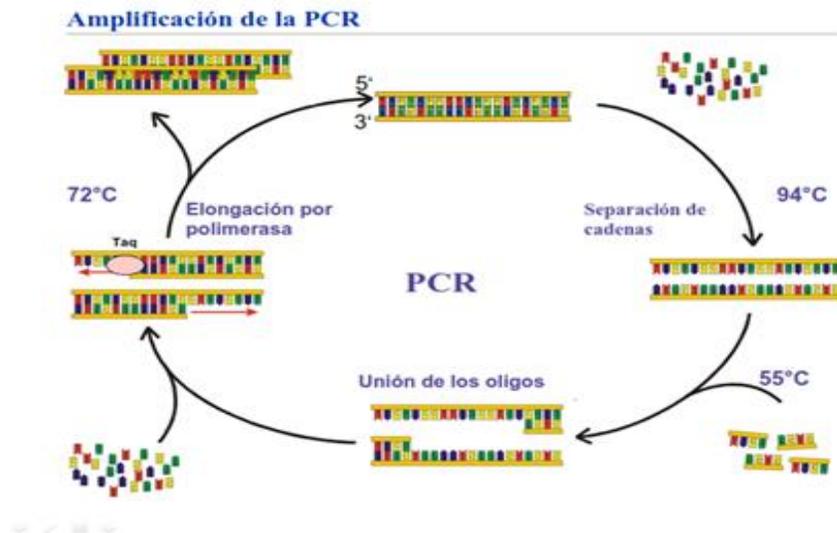


Figura 2: Ciclo de Amplificación de la PCR

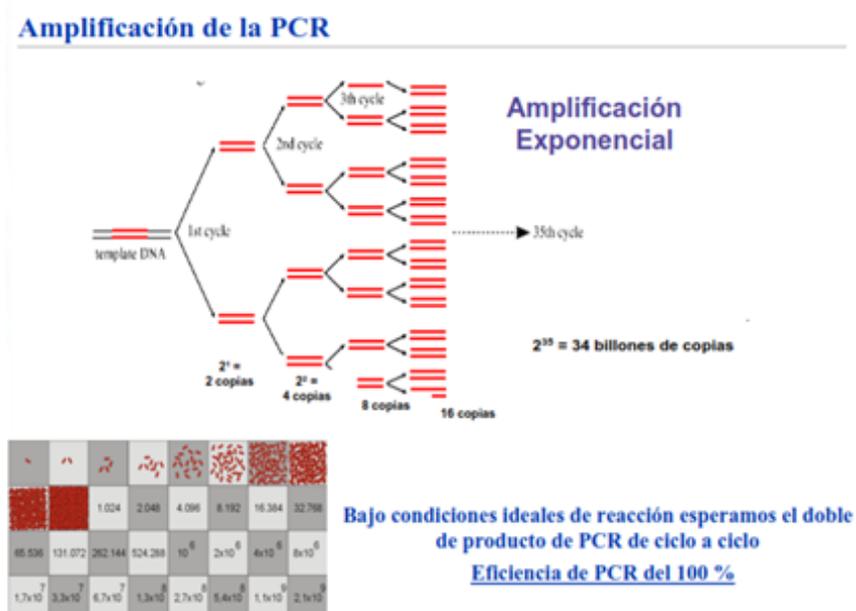


Figura 3: Amplificación exponencial de los productos de PCR

5.7 PCR en Tiempo Real

Los primeros avances en el desarrollo de esta técnica, fueron los realizados por Higuchi y colaboradores, en 1992, desde entonces y a la fecha, el objetivo de este procedimiento, también llamado PCR cuantitativa (qPCR), ha sido el de detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

La qPCR es una variante de la PCR convencional (Punto final), utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ADN. Para ello, la qPCR emplea los mismos componentes que una PCR convencional, sin embargo, a esta mezcla ahora se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a

la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina como PCR inmediata o simultánea. (Life-Technologies)

Mediante la qPCR, la manera en que se analizan sus resultados, es mediante la observación de sus curvas de amplificación. Una curva típica de qPCR debe tener las siguientes partes:

- Línea base (Background): Son los niveles de señal de fluorescencia durante los primeros ciclos (lo que se conoce como ruido, pues no pasa el umbral).
- CT (threshold cycle): Es el primer incremento significativo en la cantidad de producto de PCR, medido por el aumento de fluorescencia. No significa que no exista fluorescencia antes, solo que no es detectada por el termociclador.
- Fase exponencial: Incremento exponencial del producto de PCR.
- Fase lineal: Eficiencia de la amplificación se hace constante.
- Fase estacionaria: Tope de la amplificación, el producto obtenido permanecerá constante aunque se aumente el número de ciclos.

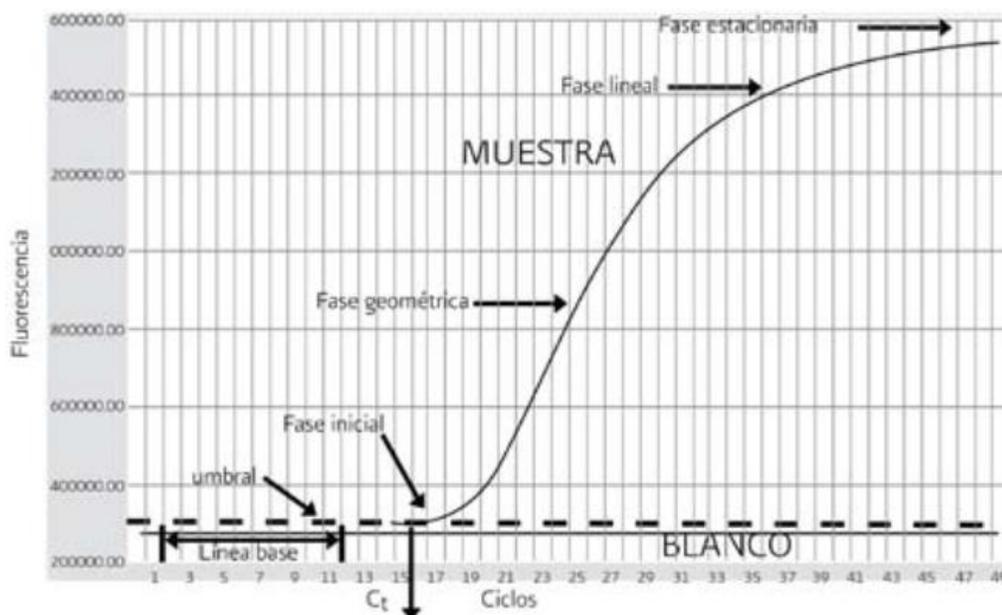


Figura 4: Cinética de Amplificación de la qPCR (Aguilera, Ruiz Tachiquin, Rocha , Pineda Olvera, & Chanez Cardenas, 2014)

En comparación a una curva de crecimiento microbiano, las curvas de amplificación de qPCR guardan mucha semejanza; ambas de forma sigmoidea. (Chirinos-Arias)

La manera en que se adquieren los datos cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial está determinada, por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (background). Este número de ciclo se llama ciclo umbral (C_t : thresholdcycle); este C_t es inversamente proporcional al número de copias del ADN target o blanco: a mayor concentración de templado, menor C_t medido.

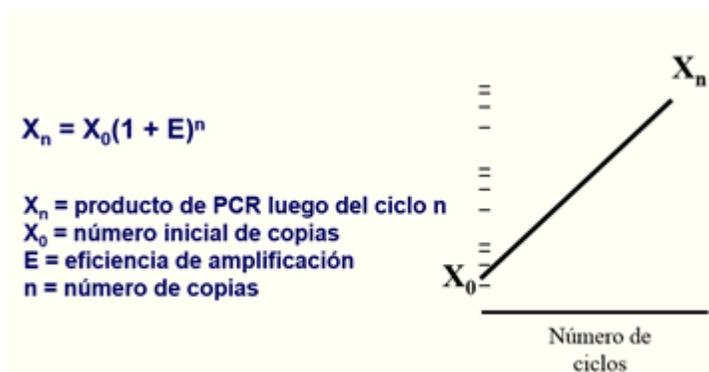


Figura 5: Ecuación de la PCR

5.7.1 Tipos de marcadores de fluorescencia

Existen distintos tipos de marcadores de fluorescencia para la qPCR, estos pueden ser reversibles (se unen al ADN más de una vez) o pueden ser irreversibles (una vez unidos al ADN son hidrolizadas). Entre los tipos de marcaje de fluorescencia más utilizados, tenemos los siguientes:

5.7.2 SYBR Green

Este fluoróforo emite fluorescencia cuando se une al surco menor del ADN de doble cadena. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN, mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán los sitios de unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green. Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples o *multiplex* (en donde se amplifican varios genes en la misma reacción), además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN.

Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR *Green* en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se deba sólo a la amplificación del blanco (Aguilera, Ruiz Tachiquin, Rocha , Pineda Olvera, & Chanez Cardenas, 2014).

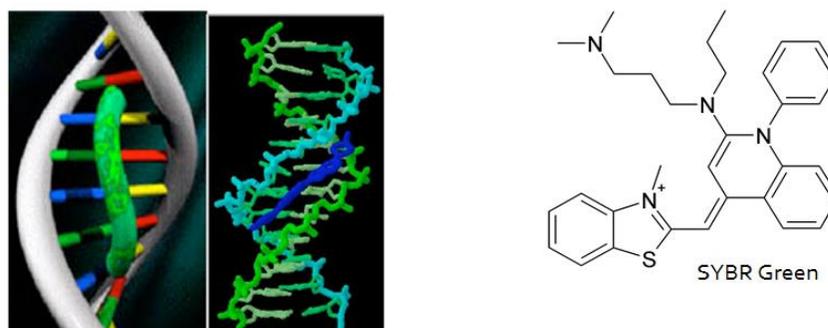


Figura 6: Representación del SYBR Green y su interacción con el ADN de doble cadena. (Life-Technogies)

5.7.3 Sondas TaqMan

También conocidas como sondas 5' nucleasas (ya que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa). En este sistema, la sonda es oligonucleótido específico (~20 bases) para la secuencia del gen de interés marcado con dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. La longitud de la sonda es la distancia entre los dos fluoróforos, de manera que la fluorescencia del reportero está apagada por el fenómeno FRET (Transferencia de energía entre fluorocromos).

La actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa corta los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, los fluoróforos se separan y se observa la señal de fluorescencia. Es decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón. Algunos ejemplos de fluoróforos reporteros son FAM , VIC y NED, entre los apagadores se

encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ (Aguilera, Ruiz Tachiquin, Rocha , Pineda Olvera, & Chanez Cardenas, 2014).

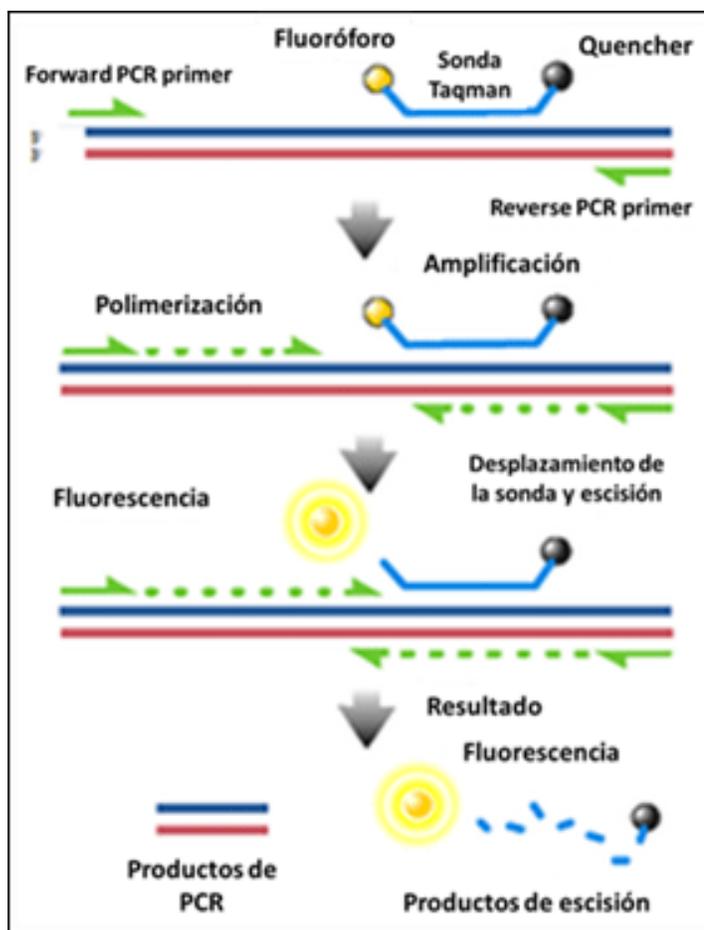


Figura 7: Mecanismo de reacción de las sondas TaqMan (Almansa, 2012)

Estas sondas permiten una reacción de alta especificidad y brindan la opción de realizar ensayos multiplex, siendo una técnica ideal para pruebas de cuantificación, sin embargo, los costos de su optimización e implementación, son una desventaja a momento de implementar esta técnica en varios laboratorios de investigación y diagnóstico molecular.

5.8 Componentes y optimización de la reacción qPCR

5.8.1 Muestra de ADN

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que queremos amplificar.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: La muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg. en la disolución.
- Tampoco debe haber determinados factores que inhibirían la actividad de la polimerasa.
- Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng.

5.8.2 Diseño de los cebadores

Para la elección de los primers, existen una serie de normas que nos pueden ayudar, aunque hay que indicar también que existen programas que nos facilitan esta tarea (DNAsis, Primer3, PrimerExpress etc.).

- El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
- No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.

- Se recomienda que los extremos las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de primers. Si ésta existe entre los extremos 3', se aumenta la posibilidad de que se creen dímeros de cebadores.
- Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.
- La T^a de hibridación de los cebadores ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45 y 65°C.
- Si el primer es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula en base a la siguiente fórmula: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$
- Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos. La temperatura de hibridación debe será proximadamente 5°C menor que la temperatura calculada.

5.8.3 DNA Polimerasa

Existen diferentes tipos de DNA polimerasa que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

- Termolábiles: T^a óptima de 37-42°C. Se desnaturalizan con el calor.
- Termoestables: T^a óptima de 74 °C. Resiste durante 40-50'a 96°C.

Inicialmente se usó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de E. coli (Saiki y cols., 1985) la cual posee actividad 3'→5' exonucleásica que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado. La importancia de esta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del ADN original. Sin embargo, se trata de una enzima termolábil por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizados en una PCR.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa (Estivil, 1991).

Es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador).

Las polimerasas termoestables, como la Taq polimerasa, carecen de actividad 3' → 5' exonucleásica, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades. Por ello hay que intentar conseguir las mejores condiciones para que ésta aumente. Podemos citar:

- No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos. Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30.
- La concentración de los desoxinucleótidos (dNTPs) debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de ADN necesaria.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- La concentración de Mg⁺⁺ en la reacción oscila entre 0,50 y 2,5 mM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR.

5.8.4 Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Como hemos señalado anteriormente se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 mM. Los dNTPs pueden captar Mg⁺⁺, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Se aconseja (Bradley, 1991) que la concentración de Mg⁺⁺ sea 0,5-1 mM veces superior a la concentración de dNTPs.

5.8.5 Tampón de la reacción

Por lo general está formado por: 10 mM tris-HCl (pH=8.4 a T^a ambiente), 50mM ClK, 0.1% w/v gelatina y 1.5 mM MgCl₂.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la PCR. El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN (Anderson, 1990). También se pueden usar detergentes como el tween 20, laureth 12 (0.1%) o Tritón x10, que ayudan a estabilizar la enzima.

Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, seroalbúmina bovina (BSA), etc, aunque no son en ningún caso imprescindibles.

5.8.6 Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

- Cloruro potásico (KCl). Influye en la desnaturalización del ADN. Elevadas concentraciones del ión K⁺ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN. Bajas concentraciones de K⁺ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN.
- Altas concentraciones de Mg⁺⁺ disminuyen la especificidad de la PCR.
- Bajas concentraciones de Mg⁺⁺ aumentan la especificidad de la reacción, pero disminuye la sensibilidad.

5.8.7 Temperaturas y tiempos de los ciclos

La PCR se realiza en tres etapas que constituyen un ciclo, que repite durante un número determinado de veces. El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos podemos optimizar la reacción.

Las primeras reacciones se realizaban manualmente cambiando continuamente los tubos de un baño María a otro de diferente temperatura (la T^a de desnaturalización, la de hibridación y la de elongación). El proceso resultaba demasiado tedioso y era difícil alcanzar las temperaturas y los tiempos correctos, por lo que se desarrolló el termociclador que lo hacía de manera automática.

De forma más detallada el tiempo y la temperatura de cada una de las etapas de un ciclo son:

- **Desnaturalización.** Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30''-1'. Si la muestra tiene alto contenido de G+C se puede aumentar el tiempo o la temperatura. Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarnos que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 5'a 94°C.
- **Hibridación.** En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración. En la práctica, la temperatura de hibridación puede

oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con la hebra molde.

- **Elongación.** En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 min. para elongar 1 Kb. En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5' a 72°C.

5.8.8 Número de ciclos

También adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR el número de ciclos que se utilizan. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica).

Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas.

Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización. (Eva Mas, 2001)

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 Tipo de Estudio

Observacional descriptivo.

6.2 Lugar y contexto del estudio

- Las pruebas Microbiológicas se las realizó en el Laboratorio de Microbiología de alimentos del Instituto SELADIS
- Las pruebas Moleculares se las realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

6.3 Muestras de Estudio

Las muestras en estudio, estuvieron conformadas por 17 muestras de queso fresco, procedentes de centros comerciales de las ciudades de La Paz y El Alto, las cuales están distribuidas bajo el siguiente detalle (ANEXO A):

- Seis muestras de mercados populares de la ciudad de La Paz
- Seis muestras de supermercados de la ciudad de La Paz
- Cinco muestras de mercados populares de la ciudad de El Alto

El número de muestras fue establecido por conveniencia y fueron adquiridos el mismo día (7 de Diciembre de 2014). Y transportadas al laboratorio y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis mediante las técnicas de qPCR y el método tradicional de cultivo.

6.3.1 Criterios de Inclusión

Para el presente estudio se adquirieron los quesos frescos que cumplieran con las siguientes características:

- Quesos frescos no madurados
- Color blanquecino
- Aroma característico
- Consistencia blanda
- Peso comprendido entre 200 y 500 gramos.

6.3.2 Criterios de Exclusión

No se tomaron en cuenta los quesos con las siguientes características:

- Duros y semiduros
Que presentan cascara o color exterior
- Con olores rancios.

6.4 Procedimientos

6.4.1 Cuantificación por el método Microbiológico de recuento en placa

Para este procedimiento, se utilizó el protocolo basado en la Norma Boliviana (NB32004) para la cuantificación de *S. aureus* en alimentos. Este método sigue los siguientes pasos:

- **Aislamiento selectivo**, se utiliza un medio selectivo sólido, el cual inhibe el desarrollo de géneros diferentes al *Staphylococcus*, pero además permite reconocer el desarrollo característico del microorganismo buscado.

- **Recuperación de la cepa**, este paso permite restaurar las células dañadas de *Staphylococcus*.
- **Identificación bioquímica**, en este punto se identifica el género y especie de *S. aureus*. Estas pruebas bioquímicas son: presencia de la enzima coagulasa y presencia de la enzima termonucleasa. La caracterización bioquímica de *S. aureus* en estas pruebas es la siguiente: Presencia de coagulasa positiva
Presencia de termonucleasa positiva (Figura 8).

6.4.1.1 Procedimiento del método Microbiológico de Recuento en Placa

Aislamiento selectivo.

- Pesar 25 g de muestra en bolsa de Stomacher estéril y adicionar 225 mL de agua peptonada estéril al 0.1%.
- Homogeneizar 30 segundos en Stomacher a 350 rpm
- Realizar diluciones decimales hasta la dilución deseada con 9 mL de agua peptonada estéril al 0.1%.
- Transferir 0.1 mL de las diluciones elegidas a cajas de Petri con agar Baird Parker y extender el volumen inoculado con un asa de Drigalski.
- Invertir las placas e incubar a 35°C durante 48 horas.
- Observar la formación de colonias características de *S. aureus*; luego del periodo de incubación colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas con diámetro de 1 a 2 mm, presentan una zona circular opaca y un halo claro alrededor de la colonia (ANEXO B).

Recuperación de la cepa.

- Seleccionar las placas que contengan entre 25 y 250 colonias típicas de *S. aureus*.

- Seleccionar colonias típicas aisladas y estas inocular en tubos de caldo cerebro corazón (BHI).
- Incubar a 35°C durante 24 horas.
- Inocular e incubar de la misma forma los controles positivos (*S. aureus*ATCC) y negativos (*S. epidermidis*ATCC).

Pruebas bioquímicas.

A) Prueba de la enzima Coagulasa.

- En 0.2 mL de la suspensión del microorganismo que desarrolló en el caldo BHI y adicionar a la misma 0.2 mL de plasma de conejo.
- Incubar entre 35 y 37° C durante 6 h.
- La prueba se considera positiva para *S. aureus* si se produce la formación de un coágulo organizado. La reacción negativa será aquella en la que no se observe el coagulo (ANEXO C).

B) Prueba de la enzima Termonucleasa.

- En cajas Petri con agar DNasa, sembrar una gota de la suspensión bacteriana de caldo BHI, aproximadamente 0.1 mL. Incluyendo controles positivos (*S. aureus*ATCC) y negativos (*S. epidermidis*ATCC).
- Incubar a 35 °C \pm 2 °C en cámara húmeda, durante 24 horas.
- La formación de un color rosa brillante extendido por lo menos un milímetro alrededor del orificio, en donde se inoculó, indicará que el microorganismo posee la enzima termonucleasa, siendo esta reacción positiva para *S. aureus*.

- En el caso de no contar con orto toluidina, se puede utilizar HCl 1 N como indicador. De estar presente la termonucleasa, se observará un halo transparente alrededor de la colonia, seguido de un precipitado blanco (ANEXO D).

C) Cálculo y expresión de resultados.

El número de *S. aureus* debe calcularse basándose en el número de colonias sospechosas totales recuento presuntivo, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen del inóculo, mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$RCSA = \frac{RP \cdot N^{\circ}CC}{N^{\circ}SC}$$

RCSA: Recuento confirmado *S. aureus*

RP: Recuento presuntivo

N^oCC: Número de colonias confirmadas

N^oSC: Número de colonias sometidas a confirmación

El resultado se expresará en Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g, UFC/mL).

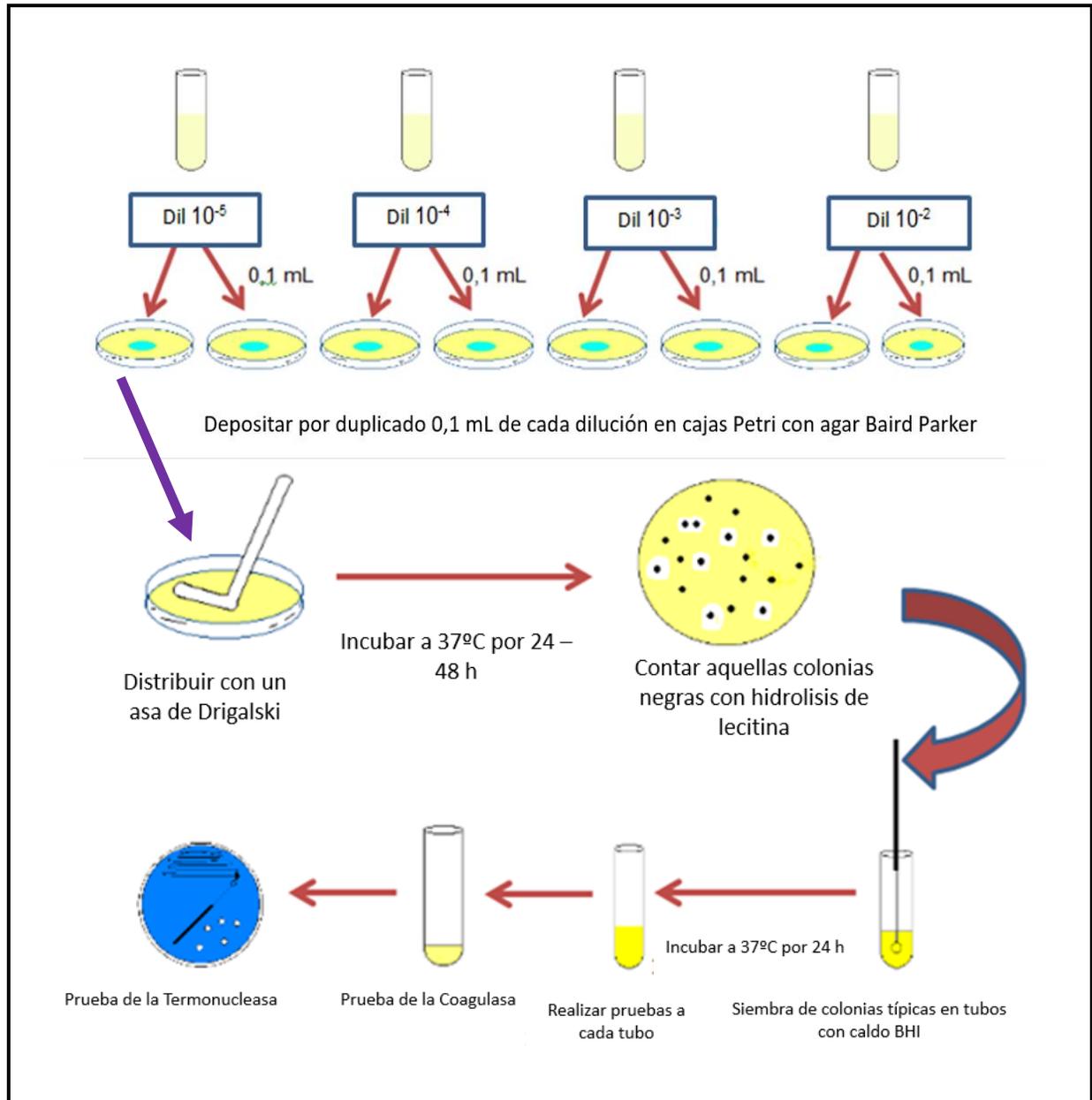


Figura 8: Método de recuento en placa. (depa.fquim.unam., 2018)

6.4.1.2 Determinación de Límite de detección (LD), Límite de cuantificación (LC) y Nivel crítico (NC) del método aplicado para la cuantificación de *S. aureus*

Para la determinación de estos valores, se procedió mediante las recomendaciones de la Guía de validación de métodos alternativos cuantitativos de la AOAC Internacional.

Se llevó a cabo una marcha en paralelo de dos métodos, con 6 alícuotas de queso fresco inoculado con cantidades conocidas de *S. aureus* (0, 30, 100 y 300 UFC/g).

A partir de los resultados obtenidos, se realizaron los cálculos respectivos para la determinación del Límite de detección (LD), Límite de Cuantificación (LC) y Nivel Crítico (NC). (Tabla 7)

6.4.2 Extracción de ADN

Se utilizó el producto comercial de extracción de ADN: “PrepSEQ® Rapid Spin” de AppliedBiosystems™, el cual fue desarrollado para la extracción rápida de ADN a partir de muestras de alimentos y ambientales.

Partiendo de muestras de queso fresco pretratadas, este kit nos permite eliminar varios productos inhibidores de la PCR que se encuentran presentes en las muestras; este proceso es realizado mediante el uso de soluciones de lisis y columnas spin, los cuales permiten la separación de los ácidos nucleicos de los microorganismos del resto de compuestos no deseados, de tal manera que se obtiene un producto final de ADN bacteriano óptimo para el uso en la PCR. (Biosystems™, 2015)

En el presente trabajo, la extracción de ADN se llevó a cabo en tres etapas: a partir del cultivo puro de *S. aureus* cepa ATCC25923, de la matriz de queso fresco inoculada con cantidades conocidas de *S. aureus* y a partir de las muestras de quesos frescos naturalmente contaminados.

- **Extracción de ADN a partir de cultivos de cepa ATCC.-** Se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos de cepa ATCC 25923 incubadas 24 horas a 35°C en caldo BHI. Partiendo de 1 ml de este caldo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución 10^{-9} , estas se cuantificaron por el método tradicional de cultivo y se procedió a la extracción de ADN a partir de la dilución 10^{-3} . Se realizó este procedimiento durante 3 días consecutivos y por triplicado, a partir de los datos obtenidos se realizó la correlación entre cantidad de UFC/g con la concentración de ADN en ng / μ L. (Tabla 8)
- **Extracción de ADN a partir de la matriz de queso fresco inoculadas con cantidades conocidas de *S. aureus*.-** Se inoculó cepa pura de *S. aureus* en 2 g de una matriz de queso (matriz a la que se comprobó anteriormente la ausencia de *S. aureus* por el método de recuento en placa).

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución 10^{-9} . A partir de estas diluciones se realizó el recuento por el método tradicional y de cada dilución se hizo la extracción de ADN. Se realizó este procedimiento durante 3 días consecutivos, los datos obtenidos se utilizaron para establecer la correlación entre cantidad de UFC/g y la cantidad de ADN obtenidos.

- **Extracción de ADN a partir de muestras de queso fresco naturalmente contaminadas.-** Como parte de este procedimiento, en primer lugar se realizó un pretratamiento sobre las 17 muestras de queso fresco, para posteriormente realizar el protocolo de extracción de ADN a partir de 2 g de cada una de estas muestras, paralelamente se sembró por el método de recuento en placa para su cuantificación por ambos métodos (ANEXO F).

Pretratamiento a muestras de queso para extracción DNA

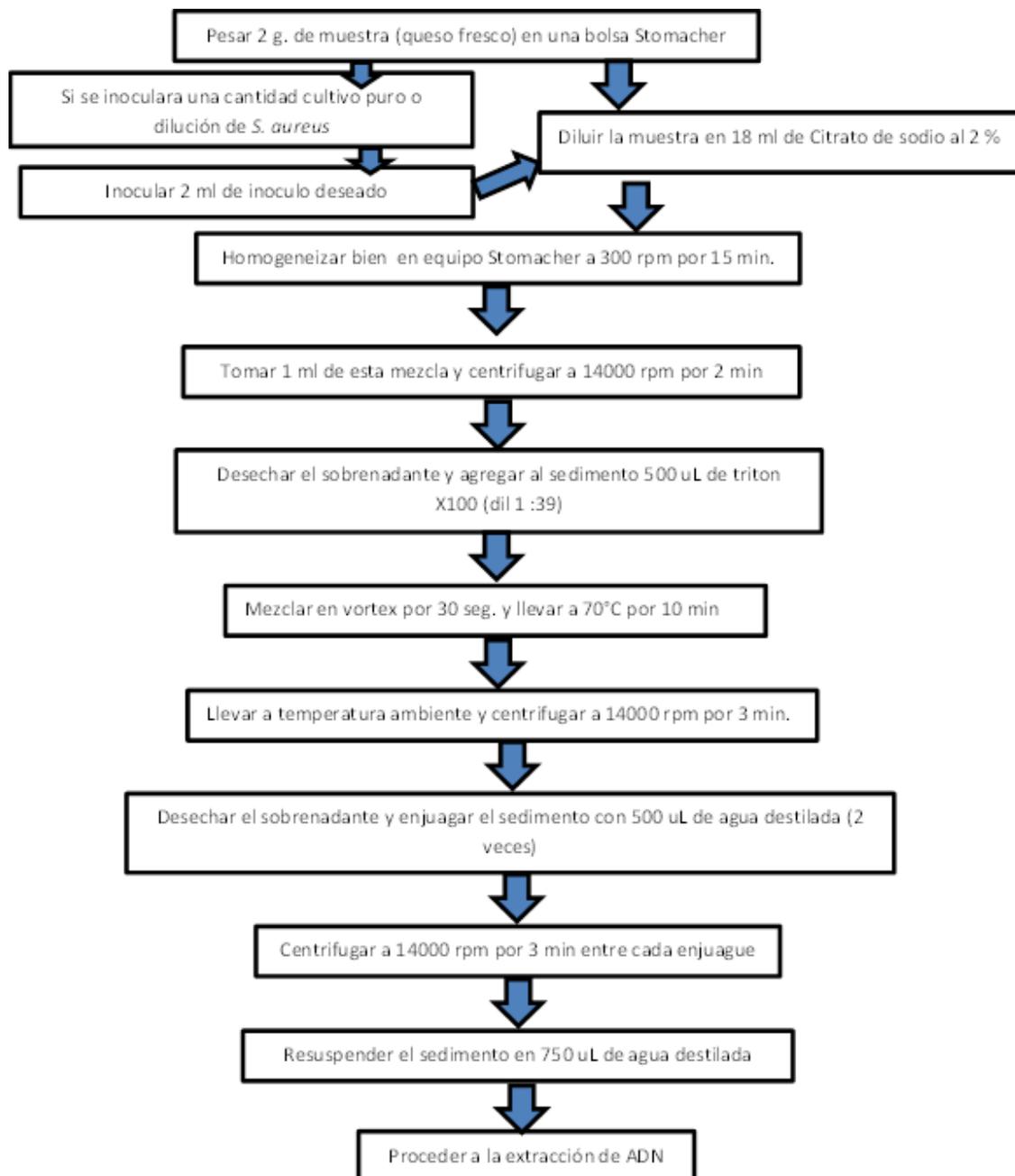


Figura 9:Flujograma de Pretratamiento a muestras de queso para extracción DNA, *Laboratorio de Microbiología de alimentos, Instituto SELADIS*

Extracción de ADN mediante el kit PrepSEQ® Rapid Spin

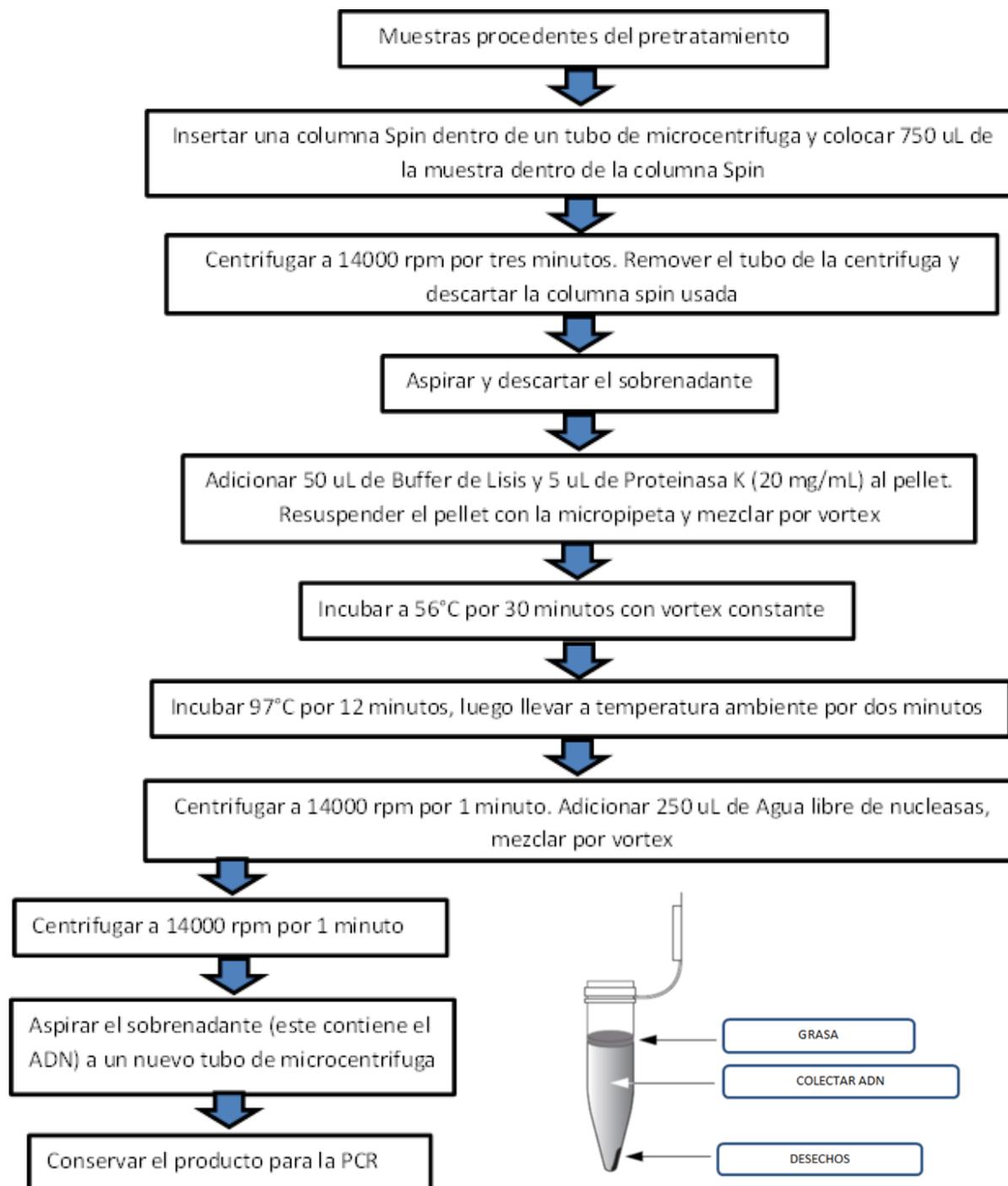


Figura 10:Flujograma de Extracción de ADN mediante el kit PrepSEQ® Rapid Spin, *Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

Concluidas las extracciones de ADN, se realizó la respectiva cuantificación del material genético mediante la técnica de fluorometría, utilizando el equipo QUBIT (Life Technologies), técnica que nos reporta los valores de concentración en $\text{ng}/\mu\text{l}$.

6.4.3 Optimización de la qPCR

Para realizar la cuantificación de ADN de *S. aureus*, se hizo una qPCR, aplicando el método por SYBR GREEN, siguiendo la siguiente secuencia.

6.4.3.1 Diseño de primers

La secuencia genómica que se utilizó, fue la región R18 del Gen *Nuc* (gen de la Nucleasa Termoestable), siendo esta región específica de *S. aureus*, convirtiéndolo en un objetivo apropiado para la detección y cuantificación de sus ácidos nucleicos.

Dichas regiones fueron obtenidas del Gene Bank (National Center for Biotechnology Information, U.S.), y el diseño de los primers se realizó mediante la aplicación Primer Express (Applied Biosystems – Life Technologies Corp.). Se obtuvieron los siguientes primers, los cuales producen un amplicón de 127 pb:

Primer Forward	AGCAAATGCATCACAAACAGGTA
Primer Reverse	TGCACTGTATACTGTTGGATCTTCAG

```

ATGACAGAAAT ACTTATTAAG TGCTGGCATA TGTATGGCAA TTGTTTCAAT
ATTACTTATA GGGATGGCTA TCAGTAATGT TTCGAAAGAA CAATACACAA
AGAGGTTTTT CTTTTTCGCT ACTAGTTGCT TAGTGTTAAC TTTAGTTGTA
GCTTCAAGTC TAAGTAGCTC AGCAAATGCA TCACAAACAG GTAACGGCGT
AAATAGAAGT GATTCTGAAG ATCCAACAGT ATACAGTGCA ACTTCAACTA
AAAAATTACA TAAAGAACCT GCGACATTAA TTRAAAGCGAT TGATGGTGAT
ACGGTTAAAT TAATGTACAA AGGTCAAACA ATGACATTCA GACTATTATT
GGTTGATACA CCTGAAACAA AGCATCCTAA AAAAGGTGTA GAGAAATATG
GTCCTGAAGC AAGTGCAATT ACGAAAAAAA TGGTAGAAAA TCGAAAGAAA
ATTGAAGTCG AGTTTGACAA AGGTCAAAGA ACTGATAAAT ATGGACGTGG
CTTAGCGTAT ATTTATGCTG ATGGAAAAAT GGTAAACGAA GCTTTAGTTC
GTCAAGGCTT GGCTAAAGTT GCTTATGTTT ATAAACCTAA CAATACACAT
GAACAACCTT TAAGAAAAAG TGAAGCACAA GCAAAAAAAG AGAAATTAAA
TATTTT

```

Figura 11. Secuencia genética de la región R18 del Gen *Nuc*, con los sitios de unión de los primers Forward (azul) y Reverse (amarillo).

Una vez diseñados los primers, estos fueron sintetizados por el Servicio de Oligo Síntesis de la empresa Applied Biosystems (Life Technologies Corp.)

6.4.3.2 Condiciones de reacción de la qPCR

Para la cuantificación de *S. aureus* por el método qPCR, se procedió siguiendo las instrucciones de diseño del producto *Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems), mediante la aplicación de los siguientes volúmenes y condiciones de reacción:

Tabla 6: Preparación de la Master Mix PCR. (Byosystems, 2010)

MASTER MIX PCR				
REACTIVO	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final para un tubo	Volumen final para X tubos
FAST SYBR Green Master mix	2X	1X	10uL	
Primer Forward	10uM	3 uM	0,6 uL	
Primer Revers	10uM	3 uM	0,6 uL	
DNA	-	-	2uL	
H2O libre de nucleasas	-	-	6,8 uL	
TOTAL			20uL	

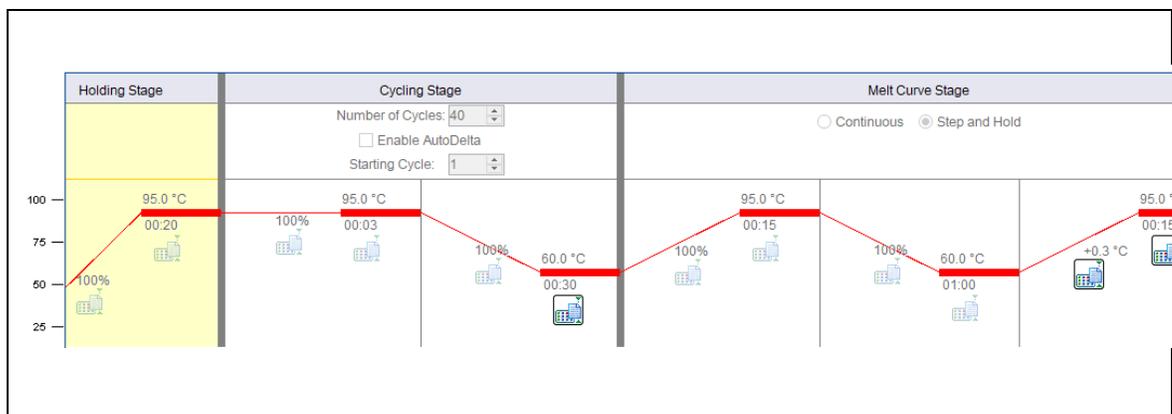


Figura 12: Condiciones de reacción de la qPCR para *S. aureus*

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso del equipo StepOne de Applied Biosystems (ANEXO E).

En esta fase, también se evaluó diferentes concentraciones de primers (50, 300 y 900 nM) para determinar así, cuál de estas concentraciones es la que presenta los mejores resultados y la que evita la producción de dímeros de primers y reacciones inespecíficas. Se determinó que la concentración de primers de 300 nM, es la que produce reacciones con alta sensibilidad y reproducibilidad.

6.4.3.3 Especificidad del método qPCR.

Considerando que la Especificidad en este tipo de ensayos, se refiere a “la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra”; (Vinagre, 2013) en el presente estudio se verificó esta propiedad mediante el análisis de ADN de 15 diferentes tipos de cepas de enterobacterias y bacterias que comúnmente pueden encontrarse en alimentos como son los quesos frescos.

Estos microorganismos fueron los siguientes: *Shigella flexneri*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella tiphy*, *Listeria monocytogenes nativa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteridis*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonasp.*, *Proteus sp.*, *Listeria innocua*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*; a partir de los cuales se realizaron extracciones de ADN a partir de cepas inoculadas en caldo BHI con una concentración aproximada a 1×10^5 UFC/mL de cada bacteria. Las extracciones de ADN se realizaron mediante el uso del producto comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), considerando las instrucciones del producto de acuerdo a la propiedad Gram positiva o Gram negativa de cada bacteria.

El material genético obtenido, fue analizado mediante el mix y condiciones de reacción de la qPCR diseñada para *S. aureus*, para comprobar la especificidad de los primers (Figuras 13 y 14).

6.4.3.4 Sensibilidad del método qPCR.

Siendo que la sensibilidad hace referencia a la mínima concentración del analito que puede detectarse de forma significativa mediante una técnica (Fornés, 2014); en nuestro estudio se realizaron extracciones de ADN de *S. aureus* a partir de un cultivo de concentración de 1×10^6 UFC/mL, de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:10. El análisis por qPCR se realizó de cada dilución por triplicado con seis repeticiones. (Tabla9)

6.4.3.5 Elaboración de curva estándar de cuantificación a partir de cultivo puro de *S. aureus*

A partir de una dilución de 1×10^6 UFC/mL de *S. aureus* ATCC 25923, el cual equivale a una concentración de $1,41 \pm 0,082$ ng/ μ L de ADN, se realizaron diluciones decimales

seriadas, con las cuales, se procedió a realizar el análisis de qPCR para la construcción de la curva estándar. La curva obtenida necesaria para los procesos de cuantificación de ADN a partir de cultivos puros (Figuras 15 y 16, Tabla 10).

6.4.3.6 Elaboración de curva estándar a partir de ADN extraído de queso fresco inoculado con concentraciones conocidas de *S. aureus*

A partir del ADN extraído de las muestras de *S. aureus* inoculadas en la matriz de queso, se realizó diluciones seriadas de 1:10, a partir de las cuales, procedió a realizar el análisis de qPCR para la construcción de la curva estándar. La curva obtenida mediante este procedimiento, fue utilizada para la cuantificación de ADN de las muestras de queso fresco naturalmente contaminadas (Figuras 17 y 18, Tabla 11).

6.4.4 Cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso fresco, utilizando las técnicas de qPCR y el método Microbiológico.

A partir del ADN extraído de las muestras de queso fresco naturalmente contaminadas, se procedió a los procesos de cuantificación. Para el recuento microbiológico, se trabajó mediante el Recuento en Placa, de manera paralela se procedió a la cuantificación de ADN mediante la técnica optimizada de qPCR para *S. aureus* (Tabla 12).

6.4.5 Análisis estadístico

A partir de la información obtenida de los datos de estudio y sus respectivos valores de concentración, se aplicaron métodos de estadística descriptiva, así como el análisis estadístico de T de Student, los cuales se realizaron mediante el programa estadístico MINITAB. El diseño de tablas y gráficas fue realizado con el programa: Microsoft Excel 2013 (Microsoft Office Profesional 2013).

7. RESULTADOS

7.1 • Determinación del Límite de detección (LD), Limite de cuantificación (LC) y Nivel crítico (NC) del método de recuento Microbiológico para cuantificación de *S. aureus* del LMA-SELADIS.

Tabla 7: Valores de LD, LC y NC obtenido para el método aplicado en el LMA-SELADIS, basado en la NB32004.

Laboratorios de Microbiología de Instituto SELADIS

	METODO LABORATORIO LMA-SELADIS
LIMITE DE CUANTIFICACION	100 UFC/g
LIMITE DE DETECCION	100 UFC/g
NIVEL CRITICO	1 UFC/g

7.2 • Extracción de ADN.

7.2.1 Correlación entre cantidad de UFC/g y ng/ul de ADN obtenidos a partir de cultivos de cepa de *S. aureus*.

Se cuantificó por el método microbiológico los cultivos de cepa pura para después realizar la relación entre las cantidades de UFC/g con ng/ μ L de ADN. Encontrándose que de una concentración de $1,08 \times 10^9 \pm 0,104$ UFC/g se puede obtener $1,41 \pm 0,082$ ng/ul de ADN (tabla 8).

Tabla 8: Correlación entre UFC/g y ng/ul de ADN obtenidos a partir de cultivos de cepa *S. aureus* ATCC 25923

Laboratorios de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, SELADIS

Correlación entre UFC/g y ng/ul de ADN obtenidos a partir de cultivos de cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923										
DIA	Recuento en placa					Extracción de ADN				
	DILUCION	PLACA 1	PLACA2	MEDIA	Conc. Inoculo inicial	DES. ESTÁNDAR	N° TUBO	CUANTIFICACION DE ADN (ng/ uL)	MEDIA	DES. ESTÁNDAR
DIA 1	10 ⁻⁶	102	108	105	1,05X10 ⁹ UFC/g	4,242	1 concentrado	167	1,43 ng/uL	0
	10 ⁻⁷	12	9	10,5		2,121	10 ⁻³	1,43		
	10 ⁻⁸	1	2	1,5		0,707	10 ⁻³	1,4		
	10 ⁻⁹	0	0	0		0	10 ⁻³	1,45		
DIA 2	10 ⁻⁶	110	103	106,5	1X10 ⁹ UFC/g	4,949	1 concentrado	169	1,34 ng/uL	0,101
	10 ⁻⁷	8	11	9,5		2,121	10 ⁻³	1,39		
	10 ⁻⁸	0	2	1		1,414	10 ⁻³	1,22		
	10 ⁻⁹	0	0	0		0	10 ⁻³	1,4		
DIA 3	10 ⁻⁶	120	101	110,5	1,2X10 ⁹ UFC/g	13,435	1 concentrado	171	1,47 ng/uL	0,040
	10 ⁻⁷	15	10	12,5		3,535	10 ⁻³	1,48		
	10 ⁻⁸	2	1	1,5		0,707	10 ⁻³	1,43		
	10 ⁻⁹	0	0	0		0	10 ⁻³	1,51		
					Conc. Inoculo inicial Global	DES. ESTÁNDAR GLOBAL		CUANTIFICACION DE ADN GLOBAL		DES. ESTÁNDAR GLOBAL
					1,08X10⁹ UFC/g	0,104		1,41 ng/uL		0,082

7.3 Optimización de la qPCR

7.3.1 Condiciones de reacción del método qPCR

Se siguieron las instrucciones de diseño del producto *Fast SYBR® Green Master Mix* (AppliedBiosystems), y en base a la evaluación de diferentes concentraciones de primers (50, 300 y 900 nM) se definió que la concentración de primers de 300 nM, es la que mejores resultados reporta.

7.3.2 Especificidad del método qPCR

A partir del análisis qPCR para *S. aureus*, con extractos de ADN obtenidos a partir de 15 cepas diferentes de microorganismos comúnmente encontradas en alimentos (quesos), y mediante el análisis de las curvas Melting obtenidas, se pudo definir la especificidad del método y observar que únicamente con *S. aureus* se producen reacciones, asegurando de esta manera, la ausencia de reacciones cruzadas o inespecíficas con otros microorganismos.

La temperatura Melting obtenida es de 74°C (Figura 13), considerándose a las señales de amplificación producidas a diferente temperatura como productos inespecíficos (Figura 14).

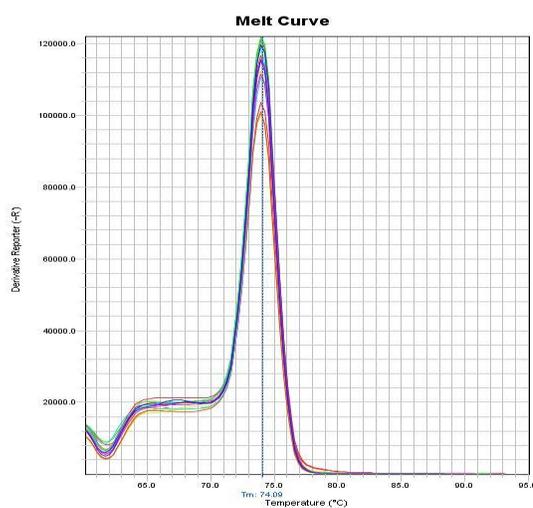


Figura 13: Curva melting para *S. aureus* sin interferentes.

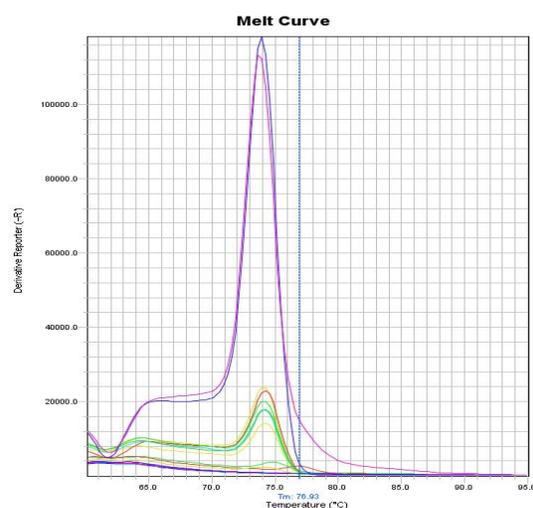


Figura 14: Curva melting de *S. aureus* con microorganismos interferentes.

7.3.3 Sensibilidad del método qPCR

Se determinó que la concentración mínima encontrada por ambos métodos, fue de 10 UFC (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados de la prueba de Sensibilidad obtenidas de los métodos qPCR y cultivo microbiológico, *Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

SENSIBILIDAD DE METODO qPCR y DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO							
CONCENTRACION EN UFC	1x10 ⁶ UFC	1x10 ⁵ UFC	1x10 ⁴ UFC	1x10 ³ UFC	1x10 ² UFC	10 UFC	1 UFC
CULTIVO	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
qPCR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

(+) Reacción positiva (-) Reacción negativa

7.4. Elaboración de curvas estándar

7.4.1 Elaboración de curva estándar de cuantificación a partir de cultivo puro de *S. aureus*

A partir de ADN extraído de una dilución que contenía 1x10⁶ UFC con una concentración equivalente de 1,41 +/- 0,082 ng/ μ l, se realizaron diluciones de ADN 1:10, con las cuales se construyó la curva estándar que servirá de punto de comparación para la cuantificación por el método qPCR.

En la tabla 10 se observa la relación entre la cantidad de UFC/g que presenta cada dilución y concentración de ADN que se obtiene, además de su equivalente de genoma correspondiente. La figura 15 muestra la curva estándar construida por el equipo y la figura 16 la curva de amplificación.

Tabla 10: Tabla resumen de curva estándar construida a partir de cultivo de *S. aureus* ATCC 25923, *Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

CANTIDAD UFC/g	EQUIVALENTES DEL GENOMA	CONCENTRACION DE ADN(ng/ uL)	CT+/- DS
$1,08 \times 10^6$	$6,14 \times 10^5$	1,41	18,6 +/- 0,39
$1,08 \times 10^5$	$6,14 \times 10^4$	0,141	22,28 +/- 0,52
$1,08 \times 10^4$	$6,14 \times 10^3$	$1,41 \times 10^{-2}$	26,15 +/- 0,62
$1,08 \times 10^3$	$6,14 \times 10^2$	$1,41 \times 10^{-3}$	29,72 +/- 0,13
108	61,4	$1,41 \times 10^{-4}$	33,07 +/- 0,33
10,8	6,14	$1,41 \times 10^{-5}$	36,04 +/- 0,74
1,08	1,01	$1,41 \times 10^{-6}$	40 +/- 0

DS: desviación estándar

Cantidad de UFC/g: Obtenidos a partir de datos de recuento por el método Gold estandar (cultivo)

Equivalentes del genoma: Calculados asumiendo que 1 ng de ADN equivale a 6×10^5 copias del genoma entero, considerando que el gen *nuc* presenta una sola copia (Ingeborg Hein, 2001).

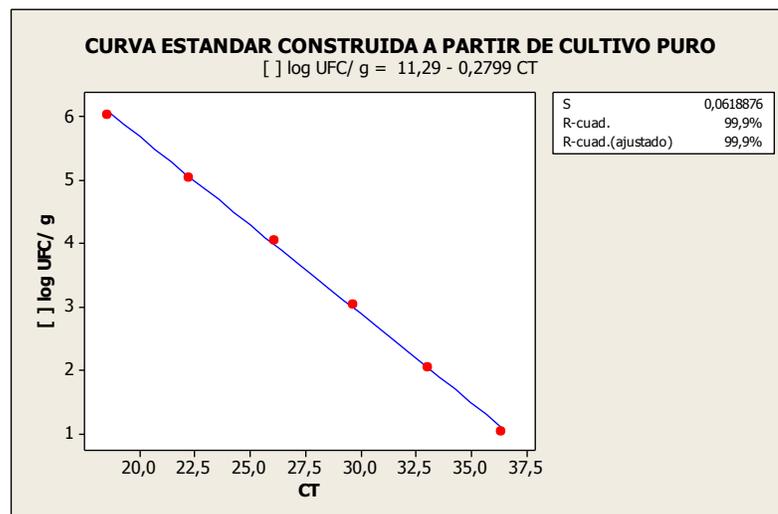


Figura 15: Curva Estándar construida por el equipo, a partir del análisis de 6 diluciones seriadas de ADN de *S. aureus* extraído a partir de cultivos puros, en el que se obtuvo un R de 99,9%. *Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

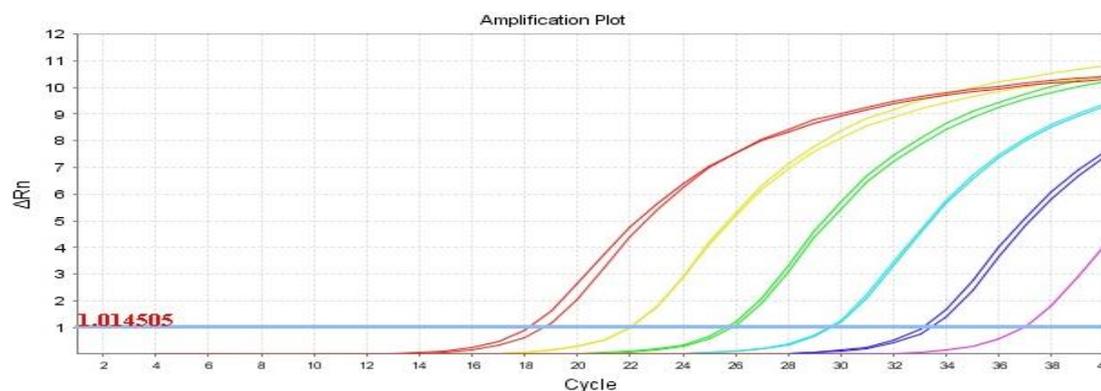


Figura 16: Curva de amplificación construida a partir del análisis de ADN de *S. aureus* extraído de cultivos puros.
Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS

7.4.2 Elaboración de curva estándar a partir de ADN extraído de queso fresco inoculado con concentraciones conocidas de *S. aureus*

Extrayendo ADN de diluciones 1:10 de la inoculación de concentraciones conocidas de *S. aureus* en queso fresco, se elaboró una curva estándar que servirá de base para la cuantificación de *S. aureus* en quesos frescos. En la tabla 11 se observa la relación entre la cantidad de UFC/g que presenta cada dilución y concentración de ADN que se obtiene, además de su equivalente de genoma correspondiente. La figura 17 muestra la curva estándar construida y la figura 18 muestra la curva de amplificación.

Tabla 11: Tabla resumen de curva estándar construida a partir de matriz de queso fresco inoculado con cantidades conocidas de *S. aureus*. Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS.

CANTIDAD UFC/g	EQUIVALENTES DEL GENOMA	CONCENTRACION ADN	CT+/- DS
1,05 x10 ⁶	5,9 x10 ⁵	3,57 +/- 0,06	21,28 +/- 0,99
1,05 x10 ⁵	5,9 x10 ⁴	3,54 +/- 0,06	24,84 +/- 1,11
1,05 x10 ⁴	5,9 x10 ³	3,51 +/- 0,09	28,5 +/- 1,17
1,05 x10 ³	5,9 x10 ²	3,49 +/- 0,05	30,29 +/- 0,87
105	59	3,23 +/- 0,014	33,73 +/- 1,2
10,5	5,9	3,02 +/- 0,07	36,7 +/- 0,63
1,05	0,59	-----	40 +/- 0

DS: desviación estándar

Cantidad de UFC/g: Obtenidos a partir de datos de recuento por el método Gold estándar (cultivo)

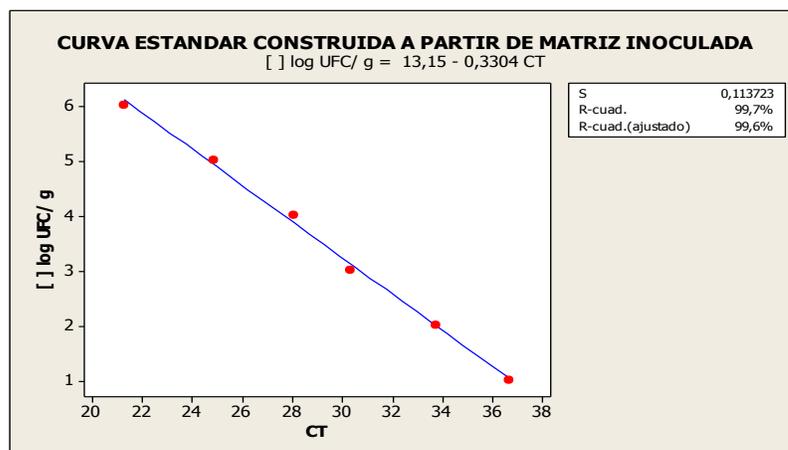


Figura 17: Curva estándar elaborada a partir de datos de matriz de queso fresco inoculado con cantidades conocidas de *S. aureus* en el que se obtuvo un R de 99,7%. *Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

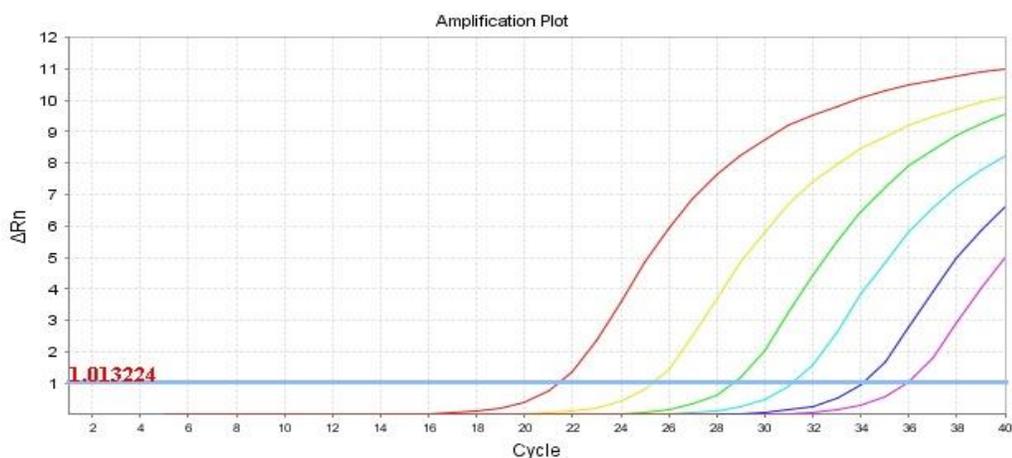


Figura 18: Curva de amplificación construida a partir de matriz de queso fresco inoculado con cantidades conocidas de *S. aureus*. *Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS*

7.5 Cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso fresco, utilizando las técnicas de qPCR y el método Microbiológico.

Por medio de las técnicas qPCR y método microbiológico de recuento en placa se analizaron 17 muestras de queso fresco, provenientes de Mercados Tradicionales y Supermercados de la ciudad de La Paz y El Alto, obteniéndose cuantificaciones similares por ambas técnicas (tabla 12).

Tabla 12: Valores de *S. aureus* obtenidos por qPCR y cultivo microbiológico en las muestras de queso fresco, Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Microbiología Molecular, Instituto SELADIS.

CODIGO	PROCEDENCIA	Cuantificación por método de recuento en placa	CT +/- DS Obtenidos por qPCR	EQUIVALENTES DEL GENOMA	Cuantificación por método qPCR
Q1	Mercado Miraflores (La Paz)	$1,1 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 26,97+/-1,59	$9,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$ UFC/ g
Q2	Supermercado Ketal Miraflores (La Paz)	$5,0 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 25,65+/-0,21	$2,7 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$ UFC/ g
Q3	Supermercado Hipermaxi (La Paz)	$1,8 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 25,3+/-0,00	$3,5 \times 10^5$	$6,16 \times 10^5$ UFC/ g
Q4	Supermercado #10 Calle 10 Obrajes (La Paz)	$5,1 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 25,74+/-0,163	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$ UFC/ g
Q5	Supermercado Ketal Zona Sur (La Paz)	0 UFC/ g	CT= 0+/-0,00	0	0 UFC/ g
Q6	Supermercado Oberland (La Paz)	$2,3 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 30,68+/-7,09	$5,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$ UFC/ g
Q7	Supermercado Fidalga (La Paz)	$2,1 \times 10^3$ UFC/ g	CT= 30,25+/-0,46	$7,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$ UFC/ g
Q8	Mercado Alto Obrajes (La Paz)	$3,0 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 31,07+/-7,56	$4,3 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$ UFC/ g
Q9	Mercado Uruguay (La Paz)	$1,8 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 24,26+/-0,33	$7,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$ UFC/ g
Q10	Mercado Calle 16 de Obrajes (La Paz)	$6,3 \times 10^1$ UFC/ g	CT= 34,76+/-1,37	$2,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$ UFC/ g
Q11	Mercado Villa Fátima (La Paz)	$7,2 \times 10^2$ UFC/ g	CT= 32,39+/-0,8	$1,6 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$ UFC/ g
Q12	Mercado Rodríguez (La Paz)	$1,2 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 24,98+/-1,22	$4,4 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$ UFC/ g
Q13	Mercado Tejada Rectangular (El Alto)	$2,8 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 25,7+/-0,01	$2,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$ UFC/ g
Q14	Mercado Villa Dolores (El Alto)	$2,4 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 25,82+/-0,20	$2,3 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$ UFC/ g
Q15	Mercado 12 de Octubre (El Alto)	$1,4 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 30,85+/-0,96	$5,1 \times 10^3$	$9,12 \times 10^3$ UFC/ g
Q16	Mercado Villa Adela (El Alto)	$2,8 \times 10^4$ UFC/ g	CT= 25,65+/-0,16	$2,7 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$ UFC/ g
Q17	Mercado Ciudad Satélite (El Alto)	$8,1 \times 10^5$ UFC/ g	CT= 23,17+/-0,00	$1,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$ UFC/ g

DS: desviación estándar

7.6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la cuantificación por los métodos qPCR y microbiológico.

Una vez realizada la cuantificación microbiológica y qPCR, se procedió al análisis comparativo mediante el valor estadístico de T de Student. Obteniéndose un valor de $P=0,096$ y $T=1,76$; lo cual nos indica que ambos no presentan diferencias estadísticas significativas, por lo que se deduce que por ambos métodos se pueden obtener resultados congruentes para el recuento de *S. aureus*.

Del análisis de las 17 muestras de queso fresco por los métodos qPCR optimizado y el método de cultivo microbiológico, se detectó la presencia de *S. aureus* en un 94% de las muestras analizadas, con un promedio de cuantificación de $5,2 \times 10^5$ UFC/g.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio determinó en su primera fase características como el LD, LC y NC del método microbiológico aplicado en el LMA- SELADIS, hallando que el valor de LD y LC es de 100 UFC/g, y de NC de 10 UFC/g. En comparación con los métodos de recuento en placa aplicados en otros países, como México, se puede apreciar que la Norma Oficial Mexicana para determinación de *S. aureus* en alimentos NOM-115-SSA1-1994, utiliza un procedimiento semejante al realizado en el LMA-SELADIS presentando los mismos valores de LD y LC de 100 UFC/g, y de NC de 10 UFC/g.

La mayor parte de la bibliografía revisada sobre el tema, utiliza como método de referencia para el recuento en placa, este mismo método (Gimena, Susana, Angélica*, & Sergio*, 2009) (S. taponen, 2009) (B. Alarcon 1, 2006), (O G Brakstad, 1992), (Eman M. Zakary, 2011).

Al ser el queso fresco un alimento rico en lípidos y proteínas, obtener material genético bacteriano a partir del mismo represento un desafío, por lo que para la extracción de ADN a partir de este sustrato, fue necesario realizar un pretratamiento de la muestra previo al uso del kit comercial “PrepSEQ® Rapid Spin” (AppliedBiosystems™). Este pretratamiento está basado en trabajos similares (P. Cremonesi, 2007) (B. G. Botaro, 2013) (Duquenne, Aesan), en los cuales se utiliza sales débiles, como ser el citrato de sodio, para lograr separar la mayor parte de compuestos interferentes que afectarían al posterior proceso de aislamiento y purificación del ADN.

El pretratamiento para la extracción de ADN de *S. aureus* a partir de alimentos es una fase fundamental, la cual debe realizarse considerando las características fisicoquímicas de los alimentos, algunos trabajos sugieren la incubación previa de la muestra en caldos de enriquecimiento (B. Alarcon 1, 2006); en cambio otras investigaciones sugieren el uso de diferentes técnicas de separación (A. Poli, 2007) , (Matijašić, 2012).

Se utilizó como marcador de fluorescencia SYBR Green, el cual se eligió en base a los resultados obtenidos en el trabajo de B. Alarcon (B. Alarcon 1, 2006), dicho trabajo realiza una comparación entre los métodos TaqMan y SYBR Green, observándose que SYBR Green ofrece una mayor sensibilidad, de 10 UFC/g, en relación al método TaqMan, el cual alcanza una sensibilidad de 100 UFC/g; además de considerarse que el método SYBR Green es más económico, por lo que hace más factible su implementación y oferta como servicio rutinario de laboratorio. (Wilkinson, 2011) (Eman M. Zakary, 2011), (B. G. Botaro, 2013), (Ingeborg Hein, 2001)

A partir de la selección de la técnica de qPCR por SYBR Green para la cuantificación de *S. aureus*, se definió al gen *Nuc* como blanco para la qPCR. Dicho gen, está debidamente comprobado como específico para la identificación de *S. aureus*, así como otras investigaciones lo describen, en las cuales, de manera semejante al presente trabajo se buscó la identificación y cuantificación de este microorganismo (B. Alarcon 1, 2006), (Ingeborg Hein, 2001), (A. Poli, 2007), (B. G. Botaro, 2013), (O G Brakstad, 1992).

Siguiendo las recomendaciones de la guía del usuario del producto *Fast SYBR® Green Master Mix* de AppliedBiosystems™, se procedió con las pruebas correspondientes para establecer las concentraciones óptimas de primers a utilizar, ante lo cual se estableció que una concentración de 300 nM, es la que presenta reacciones con alta sensibilidad y reproducibilidad.

En relación a la especificidad, hay que mencionar que esta viene determinada por los primers y las condiciones de reacción (ThermoFisher, 2014), para lo cual, actualmente existe una gran variedad de software que permiten el diseño de estos cebadores, en nuestro trabajo se utilizó el programa Primer Express (AppliedBiosystems – Life Technologies Corp.).

Si bien, a pesar de que el diseño de nuestros cebadores asegura la reacción específica para *S. aureus*, es importante realizar ensayos con diferentes tipos de microorganismos, para verificar una posible reacción cruzada o la presencia de falsos positivos. Por nuestros resultados obtenidos y mediante el análisis de las Curvas de Disociación (Curvas Melting), se logró verificar la reacción específica con *S. aureus*, obteniéndose como temperatura melting de nuestra reacción de qPCR, los 74°C, valor que también fue obtenido por otra investigación semejante (A. Poli, 2007).

También existen trabajos que reportan valores de temperatura melting diferentes al nuestro, los cuales varían entre 76°C y 84°C (B. Alarcon 1, 2006) (Eman M. Zakary, 2011); ante lo cual, hay que tener en cuenta que estas diferencias se deben únicamente a la región blanco de ADN que se está identificando y los primers utilizados.

Analizando la sensibilidad de nuestro método de qPCR, se obtiene que esta presenta un valor mínimo de cuantificación de 10 UFC/g, valor idéntico al reportado por el trabajo realizado por N. Alarcón (B. Alarcon 1, 2006).

También se construyeron dos curvas estándar, ambas con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,99$. La primera curva estándar, fue la elaborada a partir de ADN de cultivo puro de *S. aureus* ATCC 25923, extraído de una dilución que contenía 1×10^6 UFC, el cual presentaba una concentración equivalente a $1,41 \pm 0,082$ ng/uL, a partir de esta se realizaron diluciones seriadas 1:10, con las cuales se construyó la curva estándar que sirvió de base para la cuantificación de *S. aureus* a partir de cultivos puros.

Para la segunda curva estándar, fue necesaria la inoculación de concentraciones conocidas de *S. aureus* en una matriz de queso fresco sin *S. aureus*. La matriz ya inoculada, presentaba una concentración de $1,05 \times 10^6$ UFC, la cual equivalía a una concentración de $3,57 \pm 0,06$ ng/uL, a partir de esta se realizaron las respectivas diluciones seriadas 1:10, las cuales fueron la base para la construcción de la curva estándar, que sirvió posteriormente para la cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso fresco.

Para los cálculos de equivalencia de los resultados obtenidos en nuestras curvas estándar, se realizó esta, asumiendo que 1 ng de ADN equivale a 6×10^5 copias del genoma entero (6×10^5 UFC), y que por cada copia de un genoma existe solo una región del gen nuc. (Ingeborg Hein, 2001), (B. Alarcon 1, 2006), (B. G. Botaro, 2013).

Ya con el método qPCR optimizado y el método de cultivo tradicional verificado, se prosiguió con la recolección de las muestras de queso fresco a analizarse y la posterior cuantificación de *S. aureus*, aplicando paralelamente ambos métodos anteriormente mencionados.

Comparando los resultados obtenidos por medio del análisis de T de Student de ambos métodos, se obtuvieron valores de $P = 0,096$ y $T = 1,76$; lo cual es indicativo de que ambos métodos no presentan diferencias estadísticas representativas, por lo cual, podemos asumir que ambos métodos son iguales y se pueden usar uno u otro para el análisis de recuento de *S. aureus*, ya que ambas métodos ofrecerían resultados similares.

Las publicaciones realizadas en nuestro país, sobre el análisis de *S. aureus* en quesos frescos son escasas. En nuestro análisis de las 17 muestras de queso fresco se detectó la presencia de *S. aureus* en un 94% de las muestras analizadas, con un promedio de $5,2 \times 10^5$ UFC/g. En un estudio semejante, realizado el 2009 en el Instituto SELADIS, se pudo detectar *S. aureus* en el 20% de la población de quesos por el método de recuento en placa (Gimena, Susana, Angélica*, & Sergio*, 2009).

Varios estudios realizados a nivel Latinoamérica también reportan valores respecto a la presencia de *S. aureus*, un estudio realizado en nuestro país vecino del Perú, reporto la presencia de *S. aureus* en el 87% de las muestras con un promedio de $3,1 \times 10^5$ UFC/g (Delgado, 2003); otra investigación realizada en Ecuador (Rodas-Pazmiño⁵ & Pazmiño-Gómez¹, 2016), detectó a *S. aureus* en el 55% de las muestras de queso analizadas. En contraste a los resultados anteriormente descritos, en Venezuela detectaron a *S. aureus* en el 20% de las muestras, con un promedio de 1×10^3 UFC/g (Hernandez, 2017).

Realizando un análisis comparativo de los métodos analizados (qPCR optimizado y el de cultivo microbiológico) se pudo determinar que la sensibilidad del método qPCR optimizado (10 UFC/g) es mayor que la sensibilidad del método microbiológico (100 UFC/g), obteniéndose resultados en un solo día de trabajo, en contraste, el método microbiológico requiere de 3 a 4 días.

El método optimizado qPCR es muy útil cuando se desea analizar gran cantidad de muestras en periodos cortos, lo cual evita gastos de almacenamiento de producto, que es lo que requiere actualmente la industria de alimentos (Eman M. Zakary, 2011).

9. CONCLUSIÓN

- En el presente trabajo se ha optimizado con éxito un método qPCR para la cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso fresco, método que presenta grandes ventajas como ser: alta especificidad, ya que se verificó que solo presenta señales de amplificación en presencia de *S. aureus*. Muy buen nivel de sensibilidad llegando a cuantificar incluso hasta 10 UFC/g. Rápido, ya que es capaz de obtener resultados en un solo día, disminuyendo así el tiempo de almacenamiento de productos en fábrica, aminorando costos y permitiendo obtener resultados fiables e inmediatos.

10. RECOMENDACIONES

- Habiéndose trabajado exclusivamente en muestras de queso fresco, se recomienda probar este mismo método de qPCR con muestras de alimentos de diferente naturaleza

BIBLIOGRAFÍA

- A. Poli, E. G. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *The Society for Applied Microbiology*, 529-534.
- Aguilera, P., Ruiz Tachiquin, M., Rocha, M., Pineda Olvera, B., & Chanez Cardenas, M. (2014). PCR en Tiempo Real. *ResearchGate*, 175-201.
- Alejo, J. M. (2011). evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. *Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, Colombia*.
- Almansa, r. (20 de 12 de 2012). *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas*. Recuperado el 15 de 02 de 2018, de Estudio virológico del virus de la gripe: <http://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe/>
- B. Alarcon 1, 2. B. (2006). PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology*, 352-364.
- B. G. Botaro, *. C. (2013). Detection and enumeration of *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples by real-time polymerase chain reaction. *American Dairy Science Association*, 6955-6964.
- Biosystems™, A. (2015). *manual The PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit*. Recuperado el 10 de 02 de 2018, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4407760>
- Brakstad OG1, M. J. (1995). Comparison of tests designed to identify *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease. *Pubmed*, 219-224.
- Byosistems, A. (2010). *Fast Sybr Green Master Mix Protocol*. Recuperado el 15 de 02 de 2018, de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_046776.pdf
- C. Ramirez-Lopez, J. V. (2012). Quesos frescos: propiedades, metodos de determinacion y factores que afectan su calidad. *temas selectos de ingenieria de alimentos*, 131-148.
- Callisaya, V. H. (AGOSTO de 2006). Determinación del grado de contaminación con *Staphylococcus aureus* en pasteles con crema de expendio. La Paz, Bolivia.

- Camarena, J. S. (2014). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina Departamento de Microbiología. *Hospital Universitario Doctor Peset*.
- Carolina Palomino-Camargo1, a. Y.-M. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev. Perú. med. exp. salud pública vol.31 no.3 Lima* .
- Carrillo-Inungaray, M. L. (2014). Comparación de los métodos fenotípico y molecular para identificación de patógenos en alimentos.
- Cervantes-García, E. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *revista latinoamericana de patología clínica*, 28-40.
- Chirinos-Arias, M. C. (s.f.). *Guía de PCR en Tiempo Real*. Recuperado el 20 de 02 de 2018, de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj5nevJsM7ZAhVRt1MKHaAFCRsQFgg8MAI&url=https%3A%2F%2Fs3-eu-west-1.amazonaws.com%2Fpfigshare-ufiles%2F2071258%2FGuaprctiacursoPCREntiemporeal.pdf&usg=AOvVaw3rezngWT8>
- Delgado, R. L. (2003). valuación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp*. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* , 158-164.
- depa.fquim.unam. (2018). *Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos*. Recuperado el 20 de 02 de 2018, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcusaureus_17365.pdf
- Dinero, G. (08 de 08 de 2017). *Salud y vida natural*. Recuperado el 20 de 02 de 2018, de <https://saludyvidanatural.net/queso-fresco-casa-tan-facil-lo-vas-querer-todas-las-semanas/>
- Duquenne, M. (2012). www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones.../memoria_08.pdf. Recuperado el 15 de septiembre de 2013, de www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones.../memoria_08.pdf: www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones.../memoria_08.pdf
- Duquenne, M. (s.f.). *Aesan*. Recuperado el 15 de septiembre de 2013, de www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones.../memoria_08.pdf
- Ecología y Salud* . (s.f.). Recuperado el 15 de 01 de 2018, de <https://sites.google.com/site/ecologiaysaluddocencia/home/unidad-iv/4-1->

generalidades-bacterias/4-1-1-bacterias-de-transmision-respiratoria/4-1-1-1-staphylococcus-aureus

- Eman M. Zakary, M. Z. (2011). Detection of *Staphylococcus aureus* in Bovine Milk and Its Product by Real Time PCR Assay. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* , 171-177.
- Esteban, M. (2016). Importancia de la determinación de *Staphylococcus aureus* en los alimentos. *Repositorio Digital*.
- Eva Mas, J. P. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*.
- Fornés, D. T. (2014). Metodología para validación interna de metodos de ensayo microbiologicos alternativos en alimentos. *AINIA*.
- Gimena, G. A., Susana, R. Z., Angélica*, E., & Sergio*, Q. M. (2009). Identificación mediante PCR del gen codificador de la enterotoxina de *Staphylococcus aureus* en productos lácteos . *Visión Científica*, 56-59.
- Hernandez, F. E. (2017). Prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibioticos en muestras de queso blanco fresco Expendidas en el municipio Güaicaipuro estado miranda . *Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Escuela de Biología*.
- Ingeborg Hein, 1. A. (2001). Comparison of Different Approaches To Quantify *Staphylococcus aureus* Cells by Real-Time Quantitative PCR and Application of This Technique for Examination of Cheese. *American Society for Microbiology*, 3122-3126.
- Islas, B. G. (2006). *Caracterización físico-química de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hgo. tulancingo de bravo*.
- Jaramillo-García, V. (2016). Evidencia de *Staphylococcus aureus* productor de enterotoxinas aislados de mastitis bovina en sistemas doble propósito. *Agronomía Colombia* 34, 1437-1439.
- Law Jhonson, M. (2011). *The Fundamentals of Cheese Technology*. Reino Unido: timime A.Y.
- Life-Technogies. (s.f.). *Real Time PCR Handbook*. Recuperado el 14 de 01 de 2018, de <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>

- Lin David, S. A. (1985). Genetic analysis of staphylococcal nuclease: identification of three intragenic "global" suppressors of nuclease-minus mutations. *Genetics Society of America*, 539-555.
- Martinez, S. F. (2016). Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 713-720.
- Matijašić, C. M. (2012). Application of PCR-Based Methods to Dairy Products and to Non-Dairy Probiotic Products. *Polymerase Chain Reaction*.
- Ministerio de Salud. (2016). Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. recuperado el 2017 de noviembre de 27, de evaluación de riesgos de *staphylococcus aureus*. enterotoxigénico en alimentos preparados no. industriales en colombia: www.ins.gov.co/lineas-de-accion/.../ER%20STAPHYLOCOCCUS.pdf
- O G Brakstad, K. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. . *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1654-1660.
- Ochoa Coronel, E. M. (2017). *Determinación de Staphylococcus aureus en las mayonesas de los locales de expendio de alimentos en el Terminal Terrestre de Cuenca*. Recuperado el 10 de 02 de 2018, de universidad de USUAY: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/7215>
- Opinion, D. (29 de 05 de 2015). Dos bacterias provocaron la intoxicación de alumnos en Pando. *Opinion*.
- Ovares, N. V. (2015). *Importancia de las enterotoxinas producidas por Staphylococcus aureus en alimentos. Diferentes métodos de detección e identificación*. Recuperado el 2018, de <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3133/1/39230.pdf>
- P. Cremonesi, G. P. (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Journal compilation © 2007 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 586-591.
- Pascual. (2000). *Wiley Online Library*. Recuperado el 20 de NOVIEMBRE de 2013, de Wiley Online Library: http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=es&ie=UTF8&prev=_t&rurl=translate.google.com.ar&sl=en&tl=es&u=http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02768.x/full&usg=ALkJrhP_FIQ2YHEpHvpqeC5Zkv0gEfgwg#b22
- Real.doc, M. W.-D. (12 de 03 de 2009). *ainia*. Recuperado el 21 de 10 de 2013, de ainia.

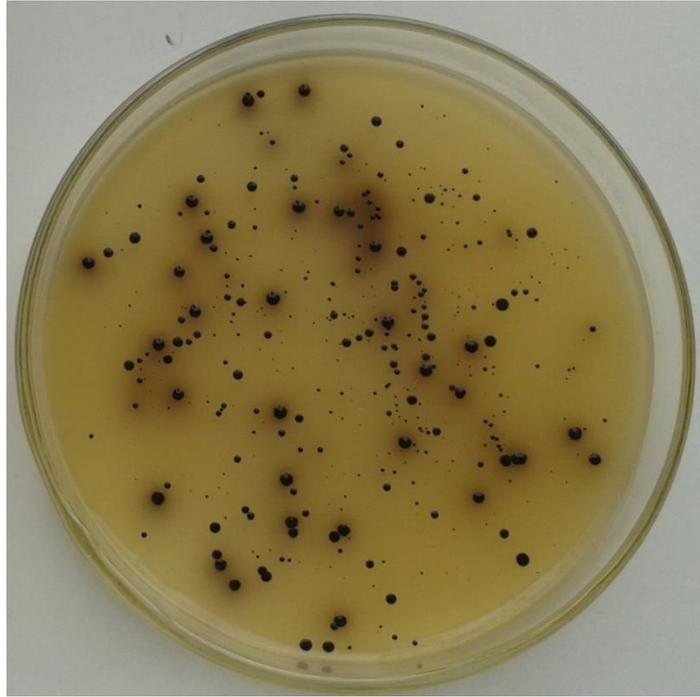
- RELOAA. (2010). Programa de vigilancia de contaminantes químicos y microbiológicos en alimentos Gestión 2010. *Programa de vigilancia de contaminantes químicos y microbiológicos en alimentos Gestión 2010*. La Paz, Bolivia.
- Rodas-Pazmiño⁵, K., & Pazmiño-Gómez¹, *. (2016). Presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos comercializados en la ciudad de Milagro, octubre – noviembre 2013. *revista cumbres*, 25-29.
- S. taponen, *. L. (2009). real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing . *American Dairy Science Association*, 2610-2617.
- Santos, A. *, Almeida, A. (., Correia da Costa, J., & Lourenco, M. (. (2015). A Multiplex PCR Assay for Detection of *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter sp.*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Safepork 2015 Conference*, 47-51.
- Tamay-Dios. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Recuperado el 26 de 02 de 2018, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Thermofisher. (2014). *Real- Time PCR Handbook*. Recuperado el 15 de 03 de 2019, de Real-Time PCR Handbook: www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf
- Vinagre, J. (2013). *Calidad de Metodos Analíticos*. Recuperado el 16 de 02 de 2018, de <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s15.htm>
- Wilkinson, A. M. (2011). Comparison of In-house and Commercial Real-time PCR Systems for the Detection of Enterobacteriaceae and their Evaluation Within an Interlaboratory Study Using Infant Formula Samples. *Springer Science+Business Media*.
- Zendejas-Manzo, G. S. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*, 25:129-143.

ANEXOS

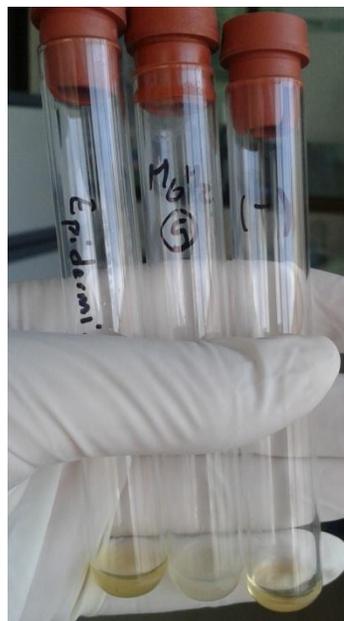
ANEXO A: Muestras de queso fresco (17) colectadas para el análisis.



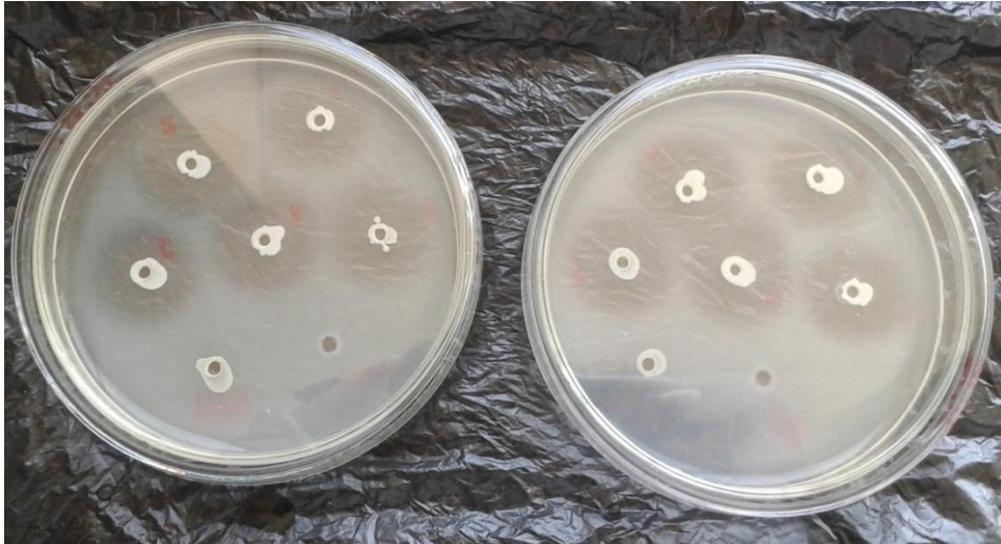
ANEXO B: Observación de colonias características de *S. aureus* en agar Baird Parker.



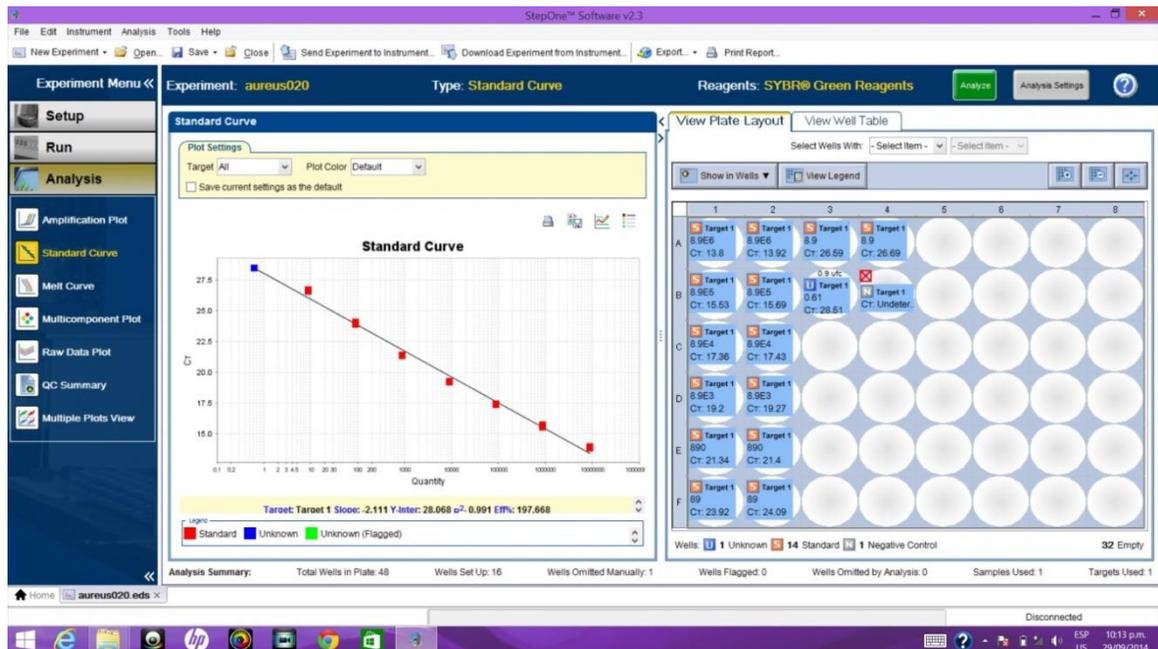
ANEXO C: Observación de la prueba cuagulasa positiva (tubo del centro) y la prueba negativa (tubos de los lados)



ANEXO D: Observación de la prueba termonucleasa positiva (5 superiores) y negativa (2 inferiores).



ANEXO E: Programación de corridas en el software del equipo StepOne – AppliedBiosystems



ANEXO F: Procesamiento de las muestras de queso naturalmente contaminadas.

