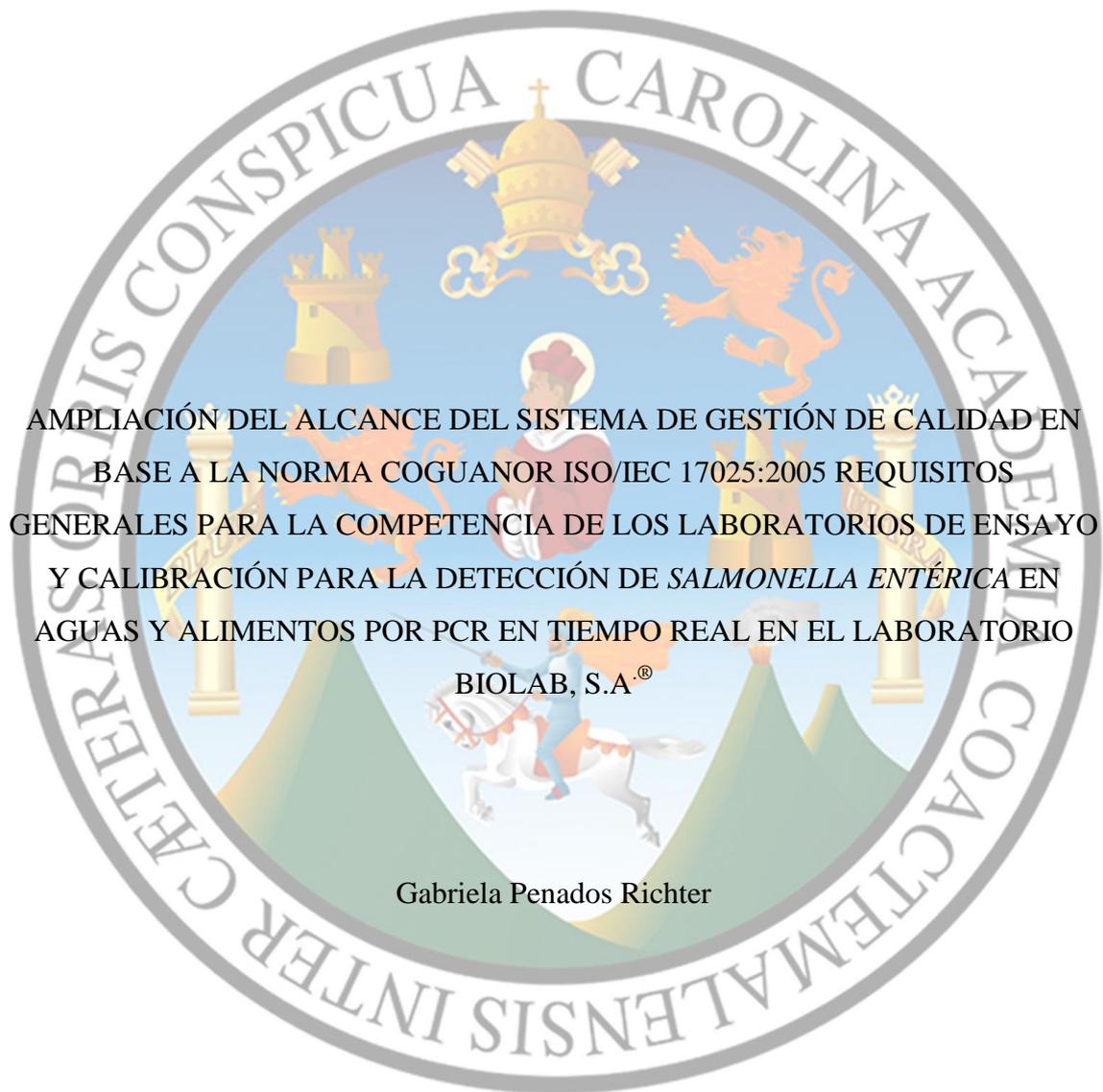


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



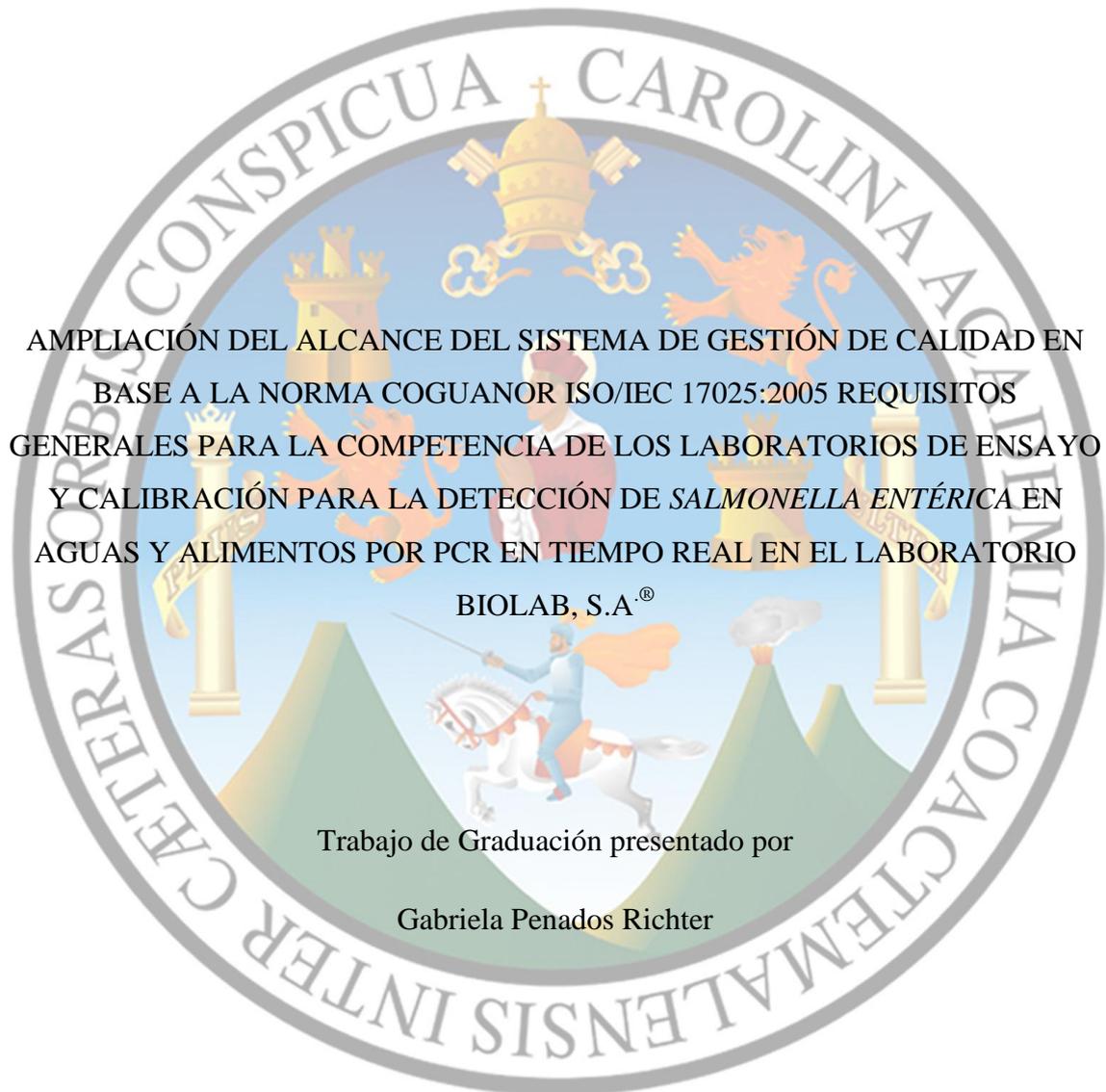
Gabriela Penados Richter

Maestría en Gestión de la Calidad con Especialización en Inocuidad de Alimentos

Guatemala, Octubre 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



AMPLIACIÓN DEL ALCANCE DEL SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN  
BASE A LA NORMA COGUANOR ISO/IEC 17025:2005 REQUISITOS  
GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO  
Y CALIBRACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA ENTÉRICA* EN  
AGUAS Y ALIMENTOS POR PCR EN TIEMPO REAL EN EL LABORATORIO  
BIOLAB, S.A.<sup>®</sup>

Trabajo de Graduación presentado por  
Gabriela Penados Richter

Para optar al grado de  
Maestría en Gestión de la Calidad con Especialización en Inocuidad de Alimentos

Guatemala, Octubre 2015.

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	DECANO
M.A. Julieta Salazar De Ariza	SECRETARIO
M.A. Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
BR. Michael Javier Mó Leal	VOCAL IV
BR. Blanqui Eunice Flores De León	VOCAL V

**CONSEJO ACADÉMICO**  
**ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph. D.

Carolina Arévalo Valdez, Ph. D.

Ericka Anabella Márquez González, MSc.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA

## RESUMEN EJECUTIVO

En América Latina las ETA (Enfermedades transmitidas por alimentos) representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud. El principal causante de ETA es *Salmonella entérica* siendo el agente causal de 46.9% de las infecciones. (Consejo para la información sobre la seguridad de los alimentos y nutrición, 2013) (Méndez & Badillo, 2010)

La detección y la prevención de ETA dependen del esfuerzo conjunto de las autoridades normativas, sanitarias, industriales y educativas, cuyas investigaciones objetivas y detalladas conlleven a una disminución en los riesgos de contaminación de los alimentos. Para garantizar a los consumidores un alimento seguro e higiénico, es necesario el control de los microorganismos patógenos en todas las etapas de la producción, lo que implica disponer de métodos de diagnóstico que no sólo sean rápidos y sensibles, sino, sobre todo, altamente específicos. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no es posible identificar todas las cepas aisladas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. El desarrollo y la automatización de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa –PCR- abren una gran oportunidad para su aplicación como herramientas analíticas en microbiología y control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos. De ese modo, contribuirán notablemente a la prevención tanto de ETA como de sus consecuencia.

Las industrias exportadoras de alimentos exigen metodologías acreditadas internacionalmente para la detección de microorganismos patógenos, para poder certificar la inocuidad de sus productos. Este reconocimiento ayuda a reducir costos a las industrias evitando que los análisis se tengan que enviar a otros países.

El laboratorio BIOLAB, S.A.<sup>®</sup> cuenta con un sistema integrado de gestión de calidad basado en las normas ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración e ISO/ IEC 15189:2012 Laboratorios clínicos, requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia. Actualmente se encuentran acreditados los análisis de mayor demanda en el mercado, sin embargo en el último año se ha observado un incremento en la solicitud de las industrias productoras

de alimentos el análisis de *Salmonella entérica* para sus productos, siendo la mayor parte del mercado industrias de exportación las cuales exigen pruebas acreditadas que certifiquen a nivel internacional la inocuidad de su producto.

Para la ampliación del alcance según ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración se revisó el cumplimiento de los requisitos de gestión del manual de calidad del laboratorio conforme a la norma, en los cuales no se encontró incumplimiento de ningún de ellos. Para los requisitos técnicos se revisaron los procedimientos de personal, instalaciones ambientales, equipo, método, manejo de ítems de ensayo e informe de resultados evaluando el cumplimiento con la norma y requisitos internacionales de laboratorios que trabajen con técnicas moleculares. De acuerdo a los hallazgos fue necesario la implementación de procedimientos, elaboración de documentos, criterios, y la verificación del método.

Los dos métodos utilizados “TaqMan<sup>®</sup> Salmonella Detection Kit” de Applied Biosystems y *Salmonella entérica* de Life River<sup>®</sup> fueron capaces de detectar 1 UFC/25 g de alimentos. Se demostró la importancia de cumplir con todos los requisitos de aseguramiento de calidad para garantizar los resultados.

Por último se evaluó la competencia del laboratorio al analizar una muestra de control externo de UDEA (Unidad de ensayos de aptitud) de la Comisión Guatemalteca de laboratorios de AGEXPORT (Asociación Guatemalteca de Exportadores) en el cual se obtuvieron resultados satisfactorios.

Se cumplió con todos los requisitos establecidos en la norma y requisitos internacionales específicos para técnicas moleculares logrando la ampliación del alcance del sistema de gestión.

## INDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
A. Enfermedades Transmitidas por alimentos	3
1. Causas de la enfermedades transmitidas por alimentos	3
2. Condiciones para que una bacteria patógena se reproduzca	5
3. Epidemiología	7
3.1. Enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala	8
B. Género <i>Salmonella</i> spp.	9
1. Taxonomía y nomenclatura	10
2. Patogenia	11
2.1. Manifestaciones clínicas	12
3. Ciclo de transmisión de <i>Salmonella entérica</i>	14
4. <i>Salmonella entérica</i> en alimentos	15
5. Incidencia	17
C. Detección de <i>Salmonella entérica</i> en alimentos	18
1. Métodos tradicionales para la detección de <i>Salmonella entérica</i>	18

2. Métodos alternativos para la detección de <i>Salmonella entérica</i>	20
2.1. Modificaciones en el método de cultivo	20
2.2. Inmunoensayos	20
2.3. Inmunoprecipitación	20
2.4. Ensimoinmunoensayo	21
2.5. Separación Inminomagnética	21
2.6. Inmunodifusión	22
2.7. Técnicas moleculares	22
3. Técnicas moleculares en amplificación de ácidos nucleídos	22
3.1. Reacción en cadena de la polimerasa	23
3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	24
3.1.1.1. Sistemas de detección	25
3.1.2. Tendencia actual del uso de PCR en tiempo real	27
D. Sistema de Gestión de Calidad basado en NGR/ISO/IEC 17025:2005	29
1. Sistema de Gestión de Calidad	29
2. Comisión Guatemalteca de normas	30
3. Organización Internacional de Normalización	31

4.	Sistema de Gestión de Calidad basado en NGR/ISO/IEC 17025:2005	31
	Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración	
III.	Justificación	33
IV.	Objetivos	35
V.	Metodología	36
VI.	Resultados	41
VII.	Discusión de resultados	60
VIII.	Conclusiones	67
IX.	Recomendaciones	69
X.	Referencias Bibliográficas	70

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva; continúan siendo una amenaza a la salud pública en todo el mundo y son una causa importante de morbilidad. Aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos tales como diarrea y vómito, en algunas ocasiones la ETA es mucho más severa y peligrosa para la vida, especialmente en niños, y la infección puede ocasionar enfermedades crónicas (Gonzalez Tania, 2005).

Las ETA's constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

El control de los microorganismos causantes de ETA's, por parte tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección. La detección y la investigación necesitan obtener, de manera oportuna y eficaz los resultados de análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e, incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento.

Así mismo, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. La detección y la enumeración de microorganismos en alimentos o en superficies que

tienen contacto con alimentos constituyen una parte importante de cualquier esquema de control de calidad. Debido a esto es necesario implementar técnicas de detección para efectuar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que éstos producen. El establecimiento de medidas de control apropiadas requiere de métodos confiables de diferenciación entre bacterias patógenas y no patógenas, así como de bacterias ubicuas presentes en el suelo, el agua y el tracto gastrointestinal, lo cual implica que deben ser rápidos y sensibles pero sobre todo altamente específicos. Estas características se reúnen en las técnicas moleculares que son altamente específicas, con una sensibilidad de 1 UFC en 25 gramos de alimento y con la obtención rápida de resultados.

Con la globalización se ha convertido de mucha importancia el uso de metodologías acreditadas a nivel internacional para la detección de microorganismos patógenos, es por esto que se ampliará el alcance de acreditación para la detección de *Salmonella entérica* en aguas y alimentos por PCR en tiempo real.

## II. ANTECEDENTES

### A. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por alimentos ETA's se definen como el conjunto de signos originados por el consumo de productos alimenticios o ingredientes, especies, bebidas o agua que contienen cantidades suficientes de sustancias tóxicas o microorganismos patógenos (Gonzalez Tania, 2005).

1. Las causas de las ETA, sus agentes etiológicos, pueden dividirse en:
  - a. Causas biológicas: bacterias, hongos, algas, virus, parásitos.
  - b. Causas químicas: productos químicos incorporados a los alimentos, productos químicos propios de los alimentos.
  - c. Causas Físicas: cuerpos extraños  
(Gonzalez Tania, 2005)

Las enfermedades biológicas denominadas toxi-infecciones alimentarias con frecuencia pueden clasificarse como intoxicaciones e infecciones según el tipo causal.

- a. **Infección transmitida por alimentos:** enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos (virus, bacterias, parásitos) perjudiciales vivos. Por ejemplo: *Salmonella spp.*, el virus de la Hepatitis A, *Triquinella spirallis*.
- b. **Intoxicación causada por alimentos:** enfermedad que resulta de la ingestión de toxinas o venenos que están presentes en el alimento ingerido, que han sido producidas por hongos o bacterias aunque estos microorganismos ya no estén presentes en el alimento. Por ejemplo: toxina botulínica, la enterotoxina de *Staphylococcus*.
- c. **Toxi-Infecciones:** resulta de la ingestión de alimentos con una cantidad de microorganismos causante de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos (Gonzalez Tania, 2005).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son conocidas desde épocas muy remotas. En el año 2000 aC, Moisés había dictado leyes sobre los alimentos que se podían comer y cuáles se debía rechazar, así como también los métodos de preparación y la importancia de la limpieza de las manos de los consumidores antes de ingerir los alimentos. General mente, los relatos de intoxicaciones alimentarias que registra la historia antigua, se atribuían a productos químicos venenosos, a veces incorporados deliberadamente. Recién en el siglo XIX se tuvo conocimiento de las enfermedades alimentarias producidas por gérmenes. Antiguamente se relacionaban los alimentos contaminados con el estado de putrefacción de los mismos. Hoy se sabe que los alimentos contaminados con microorganismos pueden tener aspecto, olor y sabor normal (Manuel Fuentes, 2005).

En algunos casos los alimentos son contaminados por sustancias químicas como el arsénico, cinc, cobre, plomo, etc., que pueden estar presentes naturalmente en los mismos o ser adicionados por contacto con los utensilios usados durante la preparación (Gonzalez Tania, 2005).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *E. coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica (Smith, 1994).

Las ETA que en su mayoría tienen origen en deficiencias en los procesos de elaboración, almacenamiento, distribución y consumo de los alimentos, podrían ser de fácil prevención. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que sobre 1300 millones de casos anuales de diarrea aguda en niños menores de 5 años, de los cuales mueren de 4 a 5 millones, se calcula que hasta el 70% de estos casos es

provocado por alimentos contaminados, lo que da una idea de la magnitud del problema. También estima, que a pesar del número elevado de casos de ETA que le son notificados, son una pequeña fracción de lo que ocurre en la realidad. Se calcula que en los países industrializados se informa menos del 10% de la cifra real. Para los países en vías de desarrollo algunos especialistas consideran que la relación entre la realidad y lo informado es del orden de 100 a 1 (Manuel Fuentes, 2005).

Los microorganismos patógenos pueden llegar a los alimentos en cualquier momento, desde que son producidos en el campo hasta que son servidos. Cuando aquéllos sobreviven y se multiplican pueden causar enfermedades en los consumidores. La contaminación es difícil de detectar, ya que generalmente no se altera el sabor, el color o el aspecto de la comida. Una defectuosa preparación, cocción o almacenamiento, también, son las principales causas para la aparición de las bacterias, que comienzan a multiplicarse y hacen el consumo peligroso para la salud.

2. Condiciones para que una bacteria patógena se reproduzca son:

- a. **Disponibilidad de nutrientes:** Casi todos los alimentos contienen el aporte de agua, proteínas, grasas, minerales o azúcar necesarios para las bacterias. Algunos más que otros, como es el caso de la leche y sus derivados, la carne y sus productos, las cremas y los huevos.
- b. **Disponibilidad de agua:** Igual que para el hombre el agua es necesaria para la vida de las bacterias, por lo cual la leche, la mayonesa, las cremas y otros productos que tienen una combinación alta de agua y nutrientes, resultan ideales para facilitar la reproducción de las bacterias, en cambio los alimentos secos no la favorecen, como es el caso de la leche en polvo, fideos, cereales, huevos deshidratados y otros.
- c. **Temperatura:** Las bacterias se reproducen en una amplia variedad de temperaturas, pero a temperaturas cercanas a las del cuerpo humano alcanzan su mayor reproducción. Por eso, los alimentos a temperatura ambiente permiten un rápido crecimiento de bacterias y tienen mayor riesgo de producir enfermedades. En general se considera que por debajo

de los 5°C o por arriba de los 60°C, la reproducción de las bacterias es muy escasa o casi nula.

- d. **Oxígeno:** Casi todas las bacterias necesitan de aire para sobrevivir, pero algunas se reproducen en ambientes sin oxígeno, con lo cual pueden crecer fácilmente en preparaciones que incluyen trozos voluminosos de carnes (Una pierna de cerdo, un bloque de jamón, un matambre o un embutido por ejemplo), o alimentos totalmente cubiertos por salsas o aceites en cuyo interior se forma un ambiente sin aire (Conservas caseras, arrollados o escabeches por ejemplo).
- e. **Tiempo:** Dadas las condiciones del tipo de alimento, la humedad y la temperatura, algunas bacterias pueden dividirse en dos cada 20 minutos. Si se da el tiempo suficiente, es posible que un pequeño grupo de bacterias se incremente hasta alcanzar un número importante, capaz de causar enfermedades. Por esa razón, es esencial que los alimentos de alto riesgo no permanezcan a la temperatura de la zona de peligro, más de lo necesario.
- f. **Acidez:** Las bacterias crecen fácilmente sobre alimentos poco ácidos como son la gran mayoría de los que habitualmente preparamos. Es el caso del pescado, la carne y el pollo. Por el contrario, los alimentos muy ácidos como conservas de vegetales a base de tomate, jugos cítricos como los de pomelo o naranja, o aderezos como la mayonesa industrial, dificultan la reproducción de las bacterias o directamente la impiden.
- g. **Azúcar:** Alimentos con altos contenidos de azúcar desfavorecen la reproducción de las bacterias, ya que el azúcar disminuye el agua disponible en el alimento. Es el caso de mermeladas y dulce de leche entre otros.
- h. **Sal:** La sal origina una disminución del agua disponible para las bacterias, por eso los alimentos con alto contenido de sal son poco favorables a la reproducción de las mismas. Es el caso del pescado salado por ejemplo.

Las enfermedades transmitidas por alimentos resultan extremadamente costosas. Los expertos en la salud calculan que el costo anual de todas las enfermedades transmitidas por alimentos en este país es de \$5 a \$6 mil millones en gastos médicos directos y en productividad perdida. Las infecciones de sólo la bacteria *Salmonella* son responsables de \$1 mil millones anualmente en gastos médicos directos e indirectos (Departamento de Seguros de Texas, 2008).

### 3. Epidemiología

La escasa inocuidad de los alimentos popularmente consumidos en los países centroamericanos es un problema recurrente que se ve reflejado por los tipos de enfermedades que comúnmente se presentan. En estos estudios de caso llevados a cabo en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua se identifican predominantemente enfermedades gastrointestinales debidas principalmente a infecciones e intoxicaciones bacterianas y eventualmente parasitarias, las cuales se manifiestan con síntomas de diarrea, dolores de cabeza, vómitos y a veces incluso fiebres (Shneider, 2005).

Los microorganismos responsables de estas enfermedades comprenden coliformes fecales, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, entre otras. Asimismo ocurren casos de otras enfermedades parasitarias como las causadas por protozoarios como la amibiasis, giardiasis, triquinosis, cisticercosis. También ocurren con menor frecuencia enfermedades virales como la hepatitis y otras que pueden ser causadas por rotavirus y con menor ocurrencia aun, o quizás por falta de registro de las mismas, se encuentran las intoxicaciones causadas por toxinas de origen fúngico como las aflatoxinas que se pueden encontrar en alimentos como los granos y cereales como el maíz y el sorgo entre otros, y que pueden ser causa de enfermedades degenerativas como el cáncer. De ahí la importancia que los granos y cereales también tengan una procedencia de inocuidad reconocida. Eventualmente, se encuentran intoxicaciones típicas de los productos

marinos o acuáticos como las causadas por los moluscos bivalvos, como almejas, ostras y mejillones que en ciertas épocas del año acumulan toxinas de dinoflagelados acuáticos o marinos como saxitoxinas o ciguatoxina que pueden ser letales cuando se ingieren en dosis altas. Las autoridades sanitarias frecuentemente se ven obligadas a restringir el consumo de estos productos por medio de vedas periódicas (Shneider, 2005).

En los países de América Central existen normas sanitarias, legalmente establecidas, sobre el control higiénico y sanitario de los alimentos. Estas normas son las que rigen la legalidad y funcionalidad de los negocios dedicados a la producción, transformación, venta y consumo de los alimentos. Sin embargo, estas normas deberían ser actualizadas conforme a las normas internacionales, si bien, en la actualidad, contribuyen en gran medida a tener cierto nivel de control. En este contexto, se preve que a mediano o corto plazo las normas sanitarias, aplicadas a los alimentos procesados o preparados se actualicen y se estandaricen según las exigencias requeridas por las normas comerciales de comercio internacional. En razón de las exigencias de normas legales y comerciales que la globalización impone y por la necesidad de insertarse y participar activamente en la economía global, los países estarán cada vez mas obligados a adoptar las normas sanitarias internacionales, como las indicadas por el Codex Alimentarius, con un impacto socioeconómico positivo en la producción, comercio y consumo de los alimentos. Cabe decir que en los países donde no existen riesgos de adquirir enfermedades transmitidas por alimentos o estos son mínimos, se convierten en lugares atractivos para visitantes y turistas. Ello contribuye, por ende, a favorecer la economía del país, y este gana prestigio al ofrecer una imagen de garantía por la inocuidad de los alimentos que ofrece (Shneider, 2005).

### 3.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala

Los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala se limitan principalmente a la incidencia de las diarreas sin detallar el agente etiológico ni el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad. Las diarreas son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños,

después de la neumonía. Igualmente está en la segunda posición entre las enfermedades infecciosas, después de las infecciones respiratorias agudas (Shneider, 2005).

Varios estudios hechos en la población han identificado los agentes relacionados con los brotes de diarrea. La mayoría de los estudios han enfocado el problema de la contaminación del agua. Se han logrado identificar agentes como notovirus y rotavirus si como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Escherichia coli* enterotoxigenica (Shneider, 2005).

Según reportes los microorganismos patógenos regularmente encontrados en personas residiendo en Guatemala son *Giardia lamblia*, *Salmonella spp.* *Escherichia coli* enterotoxigenica, *Campylobacter jejuni* entre otros (Figura 1) (Shneider, 2005).

Figura 1. Presencia de patógenos en heces en Guatemala

Presencia de patógenos en las heces	
Población	Patógenos
Niños pequeños <3 años, Mazatenango	18/96 muestras positivas para <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Trabajadores de fincas agrícolas y sus familiares	10/283 muestras positivas para <i>Salmonella spp.</i>
Vendedoras ambulantes de alimentos, tipo canasto	23/45 positivas para parásitos: <i>Giardia lamblia</i> 19/45, <i>Entamoeba histolítica</i> 2/45, <i>Ascaris lumbricoides</i> 5/45, <i>Hymenolepis nana</i> 2/45, <i>Trichuris trichura</i> 2/45, <i>Uncinaria sp.</i> , 1/45, <i>Vibrio cholerae</i> ogawa 2/45, <i>Salmonella typhi</i> 1/45, <i>Shigella flexnerii</i> 4/45
Muestras de heces enviadas a laboratorio de referencia	0,2 % <i>Campylobacter jejuni</i> , 2,0 % <i>Salmonella spp.</i> , 0,6 % <i>Shigella spp.</i> , 0,6 % <i>Escherichia coli</i> O157 H7, 94,5% negativos para enteropatógenos
<i>Salmonella sp.</i> en ambiente agropecuario	9/100 vaca, 19/100 cerdos y 20/100 gallinas, positivos para <i>Salmonella spp.</i>
Niños preescolares con diarrea deshidratante	Rotavirus en 17/84 niños, <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico en 16/84 niños; también aislado adenovirus, <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Shigella sp.</i> , <i>Cyclospora cayetanensis</i> , <i>Campylobacter sp.</i>
Muestras de heces, Hospital General de Enfermedad Común, IGSS	257/2 210 positivo para <i>Escherichia coli</i> O157 H7, 182/2 210 positivo para <i>Salmonella spp.</i> , 9/2 210 positivo para <i>Shigella sp.</i>

Shneider, S. (2005). Estudio de caso: Enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala. Guatemala: FAO.

## B. GÉNERO *Salmonella spp.*

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. En general son bacterias móviles por medio de flagelos periticos, aunque existen variantes aflageladas. Crecen óptimamente a 37°C y catabolizan la glucosa y otros carbohidratos como el

manitol, la maltosa y el sorbitol, con producción de ácido y gas. Las salmonelas no fermentan la lactosa ni la sacarosa, y tampoco producen indol. No crecen en medio de cianuro potásico y son Voges-Proskauer y triptofano desaminasa negativas. Son oxidasa negativas y catalasa positivas, producen H<sub>2</sub>S, descarboxilan la lisina y la ornitina, y no hidrolizan la urea. Además pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono (Martínez, 2011).

### 1. Taxonomía y nomenclatura

La taxonomía y nomenclatura de *Salmonella* son muy complejas y han sido objeto de numerosos cambios desde que Salmon describiera por primera vez este microorganismo en 1885. Se han utilizado muchos sistemas de clasificación diferentes que han dividido el género en especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos provocando una gran confusión. La taxonomía ha sido modificada en estos últimos años por el aporte de estudios moleculares de homología de ADN que han clarificado el panorama taxonómico de las enterobacterias (Patrick A.D. Grimont, 2007) (Martínez, 2011).

Existen dos especies del género *Salmonella*, las cuales son *S. entérica*, y *S. bongori*. *Salmonella entérica* se subdivide a su vez en seis subespecies: (I) *S. entérica* subsp. *entérica*, (II) *S. entérica* subsp. *salamae*, (IIIa) *S. entérica* subsp. *arizonae*, (IIIb) *S. entérica* subsp. *diarizonae*, (IV) *S. entérica* subsp. *houtenae*, (V) *S. entérica* subsp. *bongori* (VI) y *S. entérica* subsp. *indica* (Tabla No. 1) (Patrick A.D. Grimont, 2007).

*Salmonella entérica* subespecie *entérica* representa 99% de los serotipos aislados, siendo estos últimos determinados por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares o de superficie (Vi). Es así como se describen más de 2500 serotipos o serovares de este género (Méndez & Badillo, 2010).

## 2. Patogenia

Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar. El hábitat natural de esta especie normalmente son los intestinos de los animales y los seres humanos. El hábitat de las subespecies entéricas (I) son animales de sangre caliente, mientras que para subespecies de los grupos II, IIIa, IIIb, IV y VI son animales de sangre fría y el ambiente. Todas las especies de *Salmonella* pueden infectar a los humanos. *Salmonella entérica* subespecie *entérica* tiene 2610 serotipos diferentes; siendo los más frecuentes *typhi*, *paratyphi*, *enteritidis*, *typhimurium* and *choleraesuis* (Public health Agency of Canada, 2013).

Tabla 1. Distribución de los serotipos de Salmonella por especies y subespecies según la última revisión del esquema de White-Kauffmann-Le Minor

<b>Especie</b>	<b>Subespecie</b>	<b>Serotipo</b>
<i>Salmonella entérica</i>		2587
	Subsp . <i>entérica</i> (I)	1547
	Subsp. <i>salamae</i> (II)	513
	Subsp. <i>arizonae</i> (III)	100
	subsp. <i>diarizonae</i>	341
	(IIIb)	
	subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
	subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i>		23
<b>Total</b>		<b>2,610</b>

Martinez, I. (2011). Desarrollo de métodos de detección de Salmonella basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias.(Tesis de doctorado). País Vasco: Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, replicación y expresión de sus factores de virulencia. Durante el proceso infeccioso se presenta una interacción entre hospedero-microorganismo, entro de los pasos

que se presentan en el proceso infeccioso se pueden mencionar: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero. La bacteria experimenta severos cambios ambientales cuando entra al hospedero por vía oral como por ejemplo: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad y responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes (Ochoa & Rodriguez, 2005).

*S. entérica* dependiendo de su especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente (Ochoa & Rodriguez, 2005).

## 2.1. Manifestaciones clínicas

La salmonelosis es una de las causas más importantes de enfermedad entérica bacteriana en los seres humanos y los animales, es una infección de importancia tanto en salud pública como en salud animal debido al impacto económico que ocasiona; es una enfermedad aguda, de distribución mundial, transmitida por los alimentos. Cada año se estima que 1,4 millones de casos de salmonelosis se producen entre los seres humanos en los Estados Unidos (F. W. Brenner, 2000) (Ochoa & Rodriguez, 2005).

### a. Gastroenteritis o enterocolitis:

Es la manifestación clínica más habitual en los países desarrollados. Se suele producir por el consumo de alimentos contaminados y puede estar producida por todos los serotipos de *Salmonella* a excepción de los que producen fiebre entérica. Los síntomas aparecen de 8 a 72 horas después del contacto con el patógeno, caracterizándose por la aparición de náuseas y

vómitos, seguidos de cefaleas, dolor abdominal y deposiciones diarreicas en mayor o menor grado, siendo también común la aparición de fiebre. La remisión suele ocurrir transcurridos unos 5 días desde el comienzo de los síntomas (Méndez & Badillo, 2010).

La enfermedad suele ser autolimitada, pero puede ser más grave en grupos especialmente sensibles como niños, ancianos o personas inmunocomprometidas. La dosis infectiva es del orden de  $10^6$  células, aunque esta varía dependiendo de la virulencia del serotipo, la sensibilidad del individuo y el alimento implicado. No obstante, la presencia de *Salmonella* en un alimento, en la cantidad que sea, se considera siempre un peligro grave para la salud (Méndez & Badillo, 2010).

**b. Fiebre entérica:**

La fiebre entérica está producida clásicamente por los serotipos *Typhi*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B* y *Paratyphi C*. La fiebre entérica producida por *Salmonella Typhi* se denomina fiebre tifoidea y la producida por los otros serotipos fiebre paratifoidea. Se caracterizan por una mayor virulencia y una dosis infectiva menor ( $10^5$  células). La transmisión se produce por vía fecal-oral y el hombre es el único reservorio. Las manifestaciones clínicas aparecen después de un periodo de incubación que varía entre 7 y 28 días, pudiendo aparecer diarrea o estreñimiento, fiebre prolongada y en agujas, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento (Martinez, 2011).

### c. Septicemia con infección local o sin ella:

Las infecciones humanas con cepas no tifoideas también pueden degenerar en infecciones sistémicas y producir diversas enfermedades crónicas. En estos casos, las salmonelas son capaces de atravesar la pared intestinal y producir una bacteriemia apareciendo en algunos casos cuadros clínicos muy graves como meningitis, neumonías o artritis aséptica como la artritis reactiva o el síndrome de Reiter (Smith, 1994).

*Salmonella* spp. puede colonizar a casi todos los animales y al ser humano, también se puede encontrar en el suelo, agua y plantas, es una bacteria que se libera al medio ambiente en las heces, propagándose de un animal a otro. Puede sobrevivir y multiplicarse en materiales con los que está en contacto. Fuera del cuerpo humano y de los animales se ve afectada por la humedad ambiental, la temperatura, agentes germicidas y la composición de los materiales en que se encuentra.

(Benavides AH, 2010).

### 3. Ciclo de transmisión de *Salmonella entérica*

Como el reservorio de *Salmonella entérica* son los animales, todos los alimentos de origen animal pueden ser fuente de infección para las personas, además de las aguas contaminadas y los vegetales regados con éstas. Las vías de transmisión son múltiples, entre las cuales la más importante se refiere a los alimentos de origen animal. En las plantas faenadoras de aves, bovinos y cerdos, existe el peligro de contaminar la carne de estos animales, en las distintas secciones de la planta faenadora (recepción, sacrificio, evisceración, envasado), por contaminación cruzada (Insunza B., 2008).

Los animales a su vez son portadores de *Salmonella entérica*, debido a factores tales como el consumo de pastos regados con aguas contaminadas por este

microorganismo; las aves y animales silvestres pueden a través de sus heces contaminar los alimentos de uso animal, tales como harina de pescado, harina de sangre y hueso, los cuales pasan a ser importantes vehículos de transmisión de la bacteria a los animales domésticos de consumo humano (Insunza B., 2008).

Por otra parte, las personas portadoras de *Salmonella*, pueden transmitir la bacteria a otras personas al manipular los alimentos de manera inadecuada. Las personas también pueden adquirir la infección por contacto directo con los animales de compañía (Insunza B., 2008).

#### 4. *Salmonella entérica* en alimentos

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* están ampliamente extendidas en la naturaleza. Han sido aisladas de numerosos orígenes y pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el medioambiente. Los animales domésticos y salvajes constituyen un inmenso reservorio a partir del cual *Salmonella* puede difundirse en el ambiente. Son vehiculizadas por una gran variedad de animales: animales salvajes, animales de abasto, animales domésticos, roedores, aves, reptiles e insectos, que habitualmente no manifiestan ningún tipo de enfermedad, por lo que se favorece la circulación de *Salmonella* en ciclos contaminantes. Las bacterias suelen ser diseminadas por medio de las heces y estas llegan al suelo, al agua, a los alimentos, a los piensos, y desde estos medios, a otros animales o personas (Gantois, 2009).

Las bacterias de este género están muy adaptadas a diferentes ambientes, por lo tanto, la manera de llegar hasta el humano puede ser muy variada. Como se ha indicado anteriormente, los alimentos son el principal vehículo por el que *Salmonella* causa infección en los humanos. Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia corresponden a productos de origen animal, tales como: carnes de ave, cerdo, bovino, huevo, leche y sus derivados y mariscos, especialmente aquellos que habitan en el litoral y donde confluyen aguas

servidas. Los alimentos de mayor riesgo, son los productos cárneos crudos tales como longaniza y carne molida, donde se observa un porcentaje de aislamiento que fluctúa entre un 35 a 40%. Por otra parte, en productos cárneos procesados (embutidos), el porcentaje de aislamiento es de 3,6% y en platos preparados de un 1% (Insunza B., 2008).

La presencia de *Salmonella entérica* en platos preparados puede tener varios orígenes, entre los más importantes, figuran la presencia del agente en las materias primas animales o vegetales y la acción de personas al manipular los alimentos en forma inadecuada que pueden producir una contaminación cruzada entre materias primas y productos terminados. Por otra parte, si los manipuladores son portadores sanos de *Salmonella entérica* existe también el riesgo de que sean fuente de contaminación de los alimentos que manipulan (Insunza B., 2008).

Los huevos constituyen en muchos países el principal vehículo de transmisión de Salmonella. El huevo puede estar contaminado tanto por el exterior como por el interior. La contaminación exterior de la cascara puede suceder por una contaminación fecal en el momento del paso del huevo por la cloaca en la puesta del huevo. La contaminación interior del huevo puede darse mediante dos vías: 1) si hay contaminación bacteriana en las heces o el intestino de ave, la bacteria puede contaminar el interior del huevo si la cascara se rompe o también penetrando por los poros de la cascara, y 2) mediante contaminación directa de la yema, de la clara, de las membranas que forman la cascara o de la cascara antes de la puesta del huevo, debido a la infección de los órganos reproductores con Salmonella (Gantois, 2009).

La leche cruda también puede ser una fuente importante de contaminación, así como los derivados de este producto, quesos y helados, que también se han visto implicados en brotes de Salmonella. Esta bacteria es incapaz de crecer en leche desecada, pero es capaz de sobrevivir y reanudar el crecimiento cuando se reconstituye la leche, causando brotes de Salmonella (Martinez, 2011).

Otros alimentos como vegetales, frutas, cereales, zumos, piensos animales, especias, etc., pueden ser también causantes de infección por *Salmonella*, aunque en menor grado (Martinez, 2011).

La temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella entérica* es 35° a 37°C, pero existe un rango amplio de temperatura a la cual algunos serotipos pueden multiplicarse. Las mayores causas de ocurrencia de *Salmonella entérica* en alimentos se deben a: Deficiencias en la mantención de la cadena de frío, desde la producción hasta el consumo. Falta de higiene en la manipulación de los alimentos y las materias primas. Fallas en el procesamiento de los alimentos. Utilización de aguas no tratadas en producción animal, regadío, efluentes, entre otros (Insunza B., 2008).

## 5. Incidencia

*Salmonella* es una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas en la mayoría de los países, tanto por la aparición de casos aislados como por brotes epidémicos. Se estima que *Salmonella entérica* es responsable de alrededor de 1 millón de casos de enterocolitis y de 400 muertes al año en Estados Unidos. Las salmonelas causantes de gastroenteritis son las más frecuentes en los países desarrollados, mientras que las salmonelas causantes de las fiebres tifoideas son una causa importante de mortalidad en los países en vías de desarrollo. Aun siendo difícil calcular los datos reales de fiebre tifoidea en países en vías de desarrollo, según la OMS se estima que puede haber 22 millones de casos por año que provocan alrededor de 216.000 muertes, sobre todo en niños de edad escolar y jóvenes adultos (Crump, 2004).

## C. DETECCIÓN DE *Salmonella entérica* EN ALIMENTOS

La importancia que adquiere *Salmonella* en los alimentos es más que notable. Por eso mismo una pronta y adecuada detección de esta bacteria en los alimentos es esencial. Los métodos estandarizados para la detección de patógenos en los alimentos, por ejemplo mediante normas ISO, son los llamados métodos de referencia. La mayoría de estos métodos se basan en métodos tradicionales de cultivo, que aunque no demandan infraestructuras especialmente caras y los consumibles son baratos, son métodos largos y laboriosos que retrasan bastante el tiempo de obtención de resultados (Martinez, 2011).

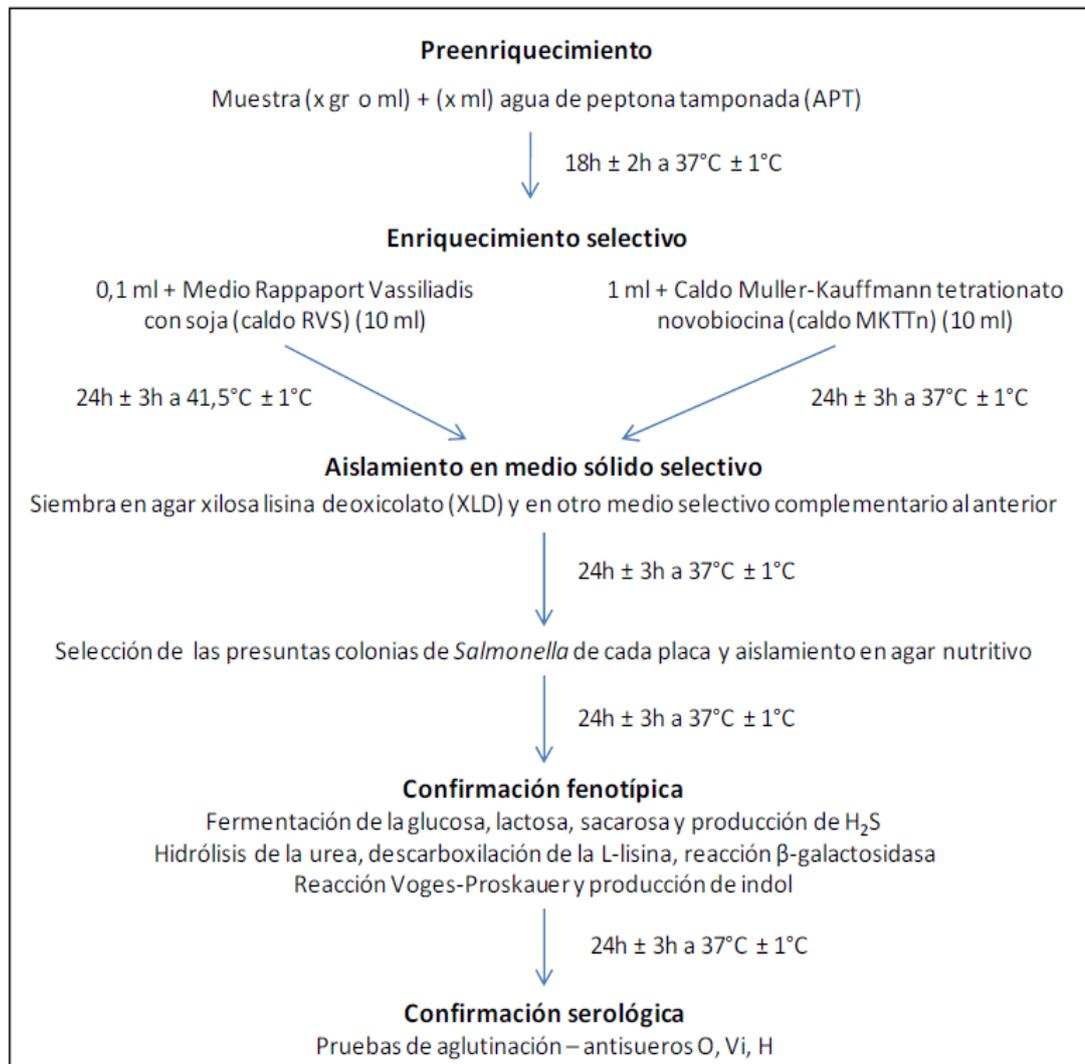
En los últimos años el interés ha recaído en la obtención de métodos más rápidos que reduzcan el tiempo de obtención de resultados. A estos métodos más rápidos se les denomina “métodos alternativos”. Hoy en día gracias a la gran cantidad de estudios realizados, se han comercializado numerosos métodos alternativos suministrados por distintas empresas y en una gran variedad de formatos. De todas formas, la utilización de estos métodos alternativos solamente es aceptada en el caso de estar validado frente al método de referencia (Jasson, 2010).

### 1. Métodos tradicionales para la detección de *Salmonella entérica*

Los métodos para la detección de *S. entérica* en alimentos están basados fundamentalmente en que generalmente su presencia está en un menor número que el de la flora acompañante que es muy diversa. Las bacterias en los alimentos se encuentran generalmente en una situación de estrés o lesión, por lo tanto, estos métodos tradicionales se componen de dos fases de enriquecimiento: por un lado, una fase de preenriquecimiento en un medio no selectivo para recuperar las células dañadas y favorecer el inicio del crecimiento bacteriano; y por otro lado, una fase de enriquecimiento en un medio selectivo para reducir el crecimiento de la flora que pueda competir con *S. entérica* y que favorezca el crecimiento del microorganismo diana para alcanzar un mayor número de células (Martinez, 2011).

Después del enriquecimiento, el microorganismo diana es aislado en medios selectivos sólidos. Posteriormente se aíslan las presuntas colonias de *Salmonella* y se confirma su identidad mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y serológicas. El proceso de detección de *Salmonella* mediante el método tradicional de cultivo puede durar desde 5 hasta 7 días, es decir, aproximadamente se tarda una semana en obtener los resultados (Martinez, 2011).

Figura 2. Fases del método tradicional de cultivo para realizar la detección de *Salmonella* según norma ISO 6579:2002, Esquema modificado de Jasson V y colaboradores



Fuente: Jasson, V. L. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology, 710-730.

## 2. Métodos alternativos para la detección de *Salmonella entérica*

Estos métodos son aquellos que nos ofrecen mayor rapidez en la obtención de los resultados y nos facilitan el manejo y realización de las pruebas. Se han desarrollado métodos alternativos para facilitar todas las fases del método tradicional de detección, desde logrando una disminución en el tiempo de incubación necesario para los cultivos, hasta desarrollando técnicas moleculares (Jasson, 2010).

Estas modificaciones pueden ser:

### **2.1 Modificaciones en el método de cultivo**

Los adelantos se han centrado especialmente en la capacidad de ahorrar tiempo en los pasos de enriquecimiento, de este modo, se han desarrollado diferentes medios de cultivo que permiten realizar el enriquecimiento en un solo paso, reduciendo el tiempo total de enriquecimiento (Jasson, 2010).

### **2.2 Inmunoensayos**

Los inmunoensayos se basan en la unión específica de antígenos con anticuerpos. El factor determinante de estos métodos es la elección de un anticuerpo apropiado. Los resultados positivos que se obtengan con estos métodos siempre son considerados como presuntos positivos, por lo tanto, siempre requieren confirmación. El límite de detección se encuentra entre 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> ufc/ml. Existen diferentes métodos inmunológicos aplicables al diagnóstico alimentario (Jasson, 2010).

### **2.3 Inmunoprecipitación**

Estos métodos son rápidos, de uso sencillo y fáciles de interpretar. Normalmente están compuestos por una membrana, habitualmente de nitrocelulosa, donde está inmovilizado el anticuerpo que específicamente

une y captura el antígeno específico de la bacteria si está presente en la muestra, formándose una línea visible debido por ejemplo a la utilización de partículas de látex coloreadas (Jasson, 2010).

#### **2.4 Enzimoimmunoensayo (ELISA)**

En el ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), que es uno de los formatos basados en anticuerpos más utilizados para el análisis de patógenos en alimentos, se utiliza un anticuerpo unido a una matriz sólida que captura los antígenos presentes en el cultivo enriquecido. Un segundo anticuerpo conjugado con una enzima es el que se utiliza para realizar la detección. En presencia del sustrato la enzima cataliza una reacción colorimétrica. Las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación son el soporte sólido más utilizado en este tipo de ensayos (Jasson, 2010).

#### **2.5 Separación inmunomagnética (IMS)**

Este método está diseñado para separar el organismo diana directamente de una suspensión compleja como es por ejemplo una muestra de alimento. A la suspensión se le añaden partículas magnéticas las cuales están recubiertas de un anticuerpo específico del microorganismo que se va a detectar. Se incuban para facilitar la unión de las células de interés a los anticuerpos y se aíslan los complejos del resto de la muestra mediante magnetismo. Los complejos se pueden utilizar después para hacer más pruebas, como por ejemplo inocular otro cultivo, transferir a medios selectivos, o pueden ser utilizados en reacciones de PCR o en ensayos de ELISA (Jasson, 2010).

#### **2.6 Inmunodifusión**

La inmunodifusión es una técnica de precipitación que se basa en el movimiento de las proteínas en una agarosa en la cual está presente el anticuerpo específico. Si al añadir la muestra el antígeno específico está

presente en esta, se formarían complejos antígeno-anticuerpo generando una línea de precipitación (Jasson, 2010).

## **2.7 Técnicas Moleculares para la detección de Salmonella entérica**

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleídos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica PCR-TR (real time PCR), ambas tecnologías moleculares basadas en la amplificación in vitro del ADN (Yáñez, 2008).

### **3. Técnicas moleculares basadas en amplificación de ácido nucleídos**

#### **3.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR**

La reacción de PCR, polymerase chain reaction, es una técnica in vitro que se basa en la capacidad de la ADN polimerasa en copiar una cadena de ADN. Mediante esta técnica un fragmento específico de ADN se amplifica debido a la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores, primers o cebadores), normalmente de entre 20 y 30 nucleótidos, cuyas secuencias coinciden con los extremos del fragmento de interés. El ADN se amplifica mediante un proceso cíclico que consta de tres pasos: primero el ADN molde de doble cadena es desnaturalizado a altas temperaturas convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla. Después, los dos oligonucleótidos sintéticos se anillan en hebras opuestas del ADN a una temperatura que solo permite la hibridación con la diana correcta. Por último, se sintetiza una nueva hebra de ADN utilizando los oligonucleótidos como iniciadores para la ADN polimerasa y utilizando el ADN diana como molde. De este modo se genera otra vez ADN de doble cadena. En los siguientes ciclos los iniciadores se unirán tanto al ADN original como al de

nueva síntesis, por lo que el número de copias del fragmento comprendido entre los dos iniciadores aumentara de forma exponencial. Aun habiendo una única copia de ADN molde en la mezcla de reacción de PCR, en unas horas se pueden generar millones de copias (Hanna, 2005).

Los resultados de la PCR se detectan tradicionalmente (PCR convencional) mediante electroforesis en geles de agarosa seguido de la tinción del gel con algún agente intercalante, como el bromuro de etidio, o mediante tinción fluorescente (Hanna, 2005).

Uno de los principales inconvenientes que tiene la técnica de PCR es que en ocasiones, y sobre todo en condiciones poco estrictas, pueden ocurrir amplificaciones no específicas por la unión de los iniciadores a otras zonas del ADN problema. También se pueden formar dímeros de los iniciadores, que se detectan como productos no específicos. Por otro lado, al tener que visualizar los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa, pueden ocurrir contaminaciones entre los productos de PCR. Aunque mediante PCR se pueden detectar los ácidos nucleídos de un único organismo, el volumen de 1-10 $\mu$ l de muestra que normalmente se utiliza en la reacción restringe el límite de detección a 10<sup>3</sup> células/ml. Normalmente los patógenos alimentarios están presentes en los alimentos a concentraciones muy bajas, por lo tanto, la detección directa es prácticamente imposible. Por eso, se realizan grandes esfuerzos en intentar desarrollar métodos de extracción capaces de concentrar los microorganismos diana, de separarlos de la matriz alimentaria y solucionar posibles inhibiciones de la reacción de PCR causadas por sustancias presentes en los alimentos (Hanna, 2005).

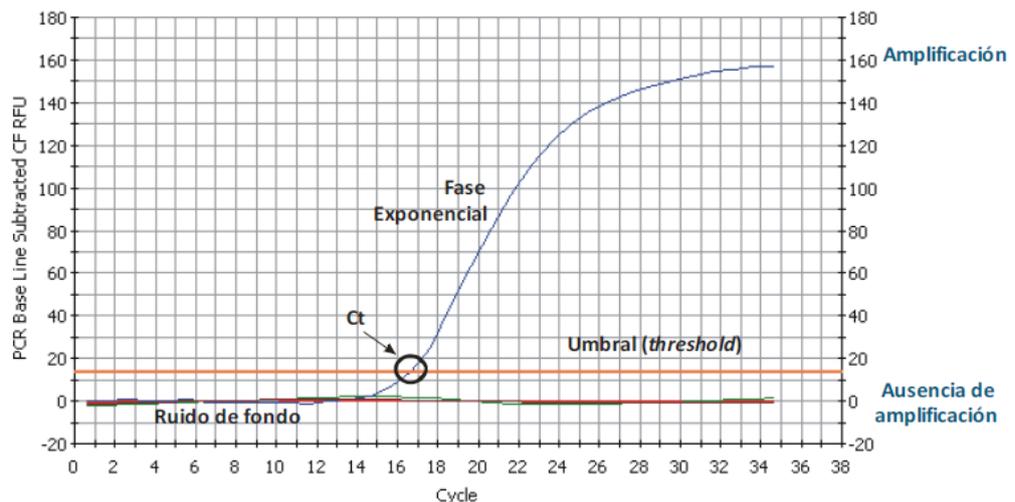
#### 3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR – RT)

La PCR a tiempo real es una técnica que permite realizar la detección y visualización de los resultados a medida que el proceso de amplificación va progresando. El proceso de amplificación es monitorizado a tiempo real mediante el uso de fluorescencia, que se corresponde con un incremento en

el producto de PCR en cada ciclo de amplificación. Es una técnica rápida, fácil de realizar y que disminuye las posibilidades de contaminación ya que se elimina el análisis post amplificación que hay que realizar en la PCR convencional (Martinez, 2011).

Los resultados de la PCR a tiempo real se visualizan mediante curvas de amplificación (Figura 3). Durante la fase exponencial se produce un aumento exponencial de la fluorescencia que se corresponde con un aumento de la cantidad de producto amplificado. El valor umbral es un nivel de fluorescencia a partir del cual la señal fluorescente alcanza un valor por encima del ruido de fondo, y el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral se conoce como ciclo umbral o Ct (threshold cycle). Se considera que la amplificación es positiva si la curva de amplificación sobrepasa ese umbral, y que es negativa si la curva se mantiene por debajo de el (Martinez, 2011).

Figura 3. Curvas de amplificación (positiva y negativas) en una PCR a tiempo real



Martinez, I. (2011). Desarrollo de métodos de detección de Salmonella basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias.(Tesis de doctorado). País Vasco: Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.

Después de la amplificación también se puede realizar un análisis de las curvas de disociación. Las secuencias amplificadas se pueden caracterizar y diferenciar con respecto a su temperatura de disociación ( $T_m$ ), que varía dependiendo del tamaño del producto y de su composición de bases (Wilhelm, 2003).

La PCR a tiempo real se puede utilizar tanto para detección básica como para cuantificación. Cuanta más cantidad de ADN haya en la muestra, la fluorescencia alcanzara antes el nivel de fluorescencia umbral. El  $C_t$  obtenido en una muestra se puede comparar con el de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas con cantidades conocidas de ADN. De este modo se puede cuantificar la cantidad de ADN de una muestra (Wilhelm, 2003).

#### 3.1.1.1. Sistemas de detección

##### a. SYBR Green

El SYBR Green I es una molécula que se une al ADN de doble cadena, por lo tanto, a medida que la cantidad de producto de PCR aumenta también aumenta la cantidad de moléculas fluorescentes que se unen al ADN bicatenario. Como el SYBR Green I se une a cualquier tipo de ADN de doble cadena, también puede unirse a productos inespecíficos generados durante la amplificación o a dímeros formados por los iniciadores. De todas formas, aunque esta inespecificidad pueda ser un factor en contra de la utilización del SYBR Green I, puede estudiarse la especificidad de los fragmentos amplificados mediante el análisis de las curvas de disociación: analizando la temperatura de disociación de cada fragmento se puede diferenciar entre el amplicon deseado y los productos inespecíficos. También se pueden diferenciar distintos amplicones

por ejemplo en reacciones de PCR multiple. Además, no es una técnica cara y es bastante sensible. Una molécula de SYBR Green I unida tiene 1000 veces más fluorescencia que una suelta, por eso mismo, es muy adecuado para monitorizar la acumulación de producto de PCR durante la amplificación (Hanna, 2005) (Wilhelm, 2003).

#### b. Molecular beacons

Son sondas formadas por oligonucleótidos de 25-35 bases. Tienen 5-8 bases en el extremo 3' y en el 5' que son complementarias entre si, formando de una manera intencionada una estructura secundaria en horquilla en la cual queda una zona interna complementaria al amplicon. En el extremo 5' tienen una molécula fluorescente y en el 3' un quencher o extinguidor, cuando estas dos moléculas están próximas el quencher absorbe la señal emitida por el fluoróforo. Cuando la sonda se une a la secuencia complementaria del amplicon, la estructura en horquilla desaparece y se puede detectar la emisión de fluorescencia (Hanna, 2005).

Es una técnica más específica que la utilización de otro tipo de sondas porque si cambia una única base entre la secuencia de la sonda y la del amplicon ya no habrá hibridación entre ambas, y por lo tanto, no habrá detección. La sonda se mantendrá en forma de horquilla en vez de unirse a la diana (Hanna, 2005).

#### c. Sondas TaqMan

Son oligonucleótidos que se unen de forma específica al amplicon. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un quencher. Cuando la sonda se une al amplicon, la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa

escinde la sonda dejando libre la molécula fluorescente. El fluoróforo al estar libre emitirá fluorescencia, que no será absorbida por el quencher ya que estarán alejados uno del otro. Las sondas TaqMan son más específicas que el SYBR Green I porque solo se unen a la secuencia que se desea dentro del amplicon. En comparación con las molecular beacons, que no admiten ninguna variación en la secuencia nucleotídica, las sondas TaqMan pueden unirse al ADN diana aunque haya una ligera variación, pero como consecuencia se produce una disminución en la eficacia de la sonda (Hanna, 2005).

#### d. Sondas Scorpion

El iniciador y la sonda se sintetizan como una unidad: en el extremo 5' del iniciador estaría la secuencia de la sonda con un fluoróforo en el 5' y un quencher en el 3', formando una estructura en horquilla similar a las molecular beacons. Como el fluoróforo y el quencher están próximos no habrá emisión de fluorescencia (Hanna, 2005).

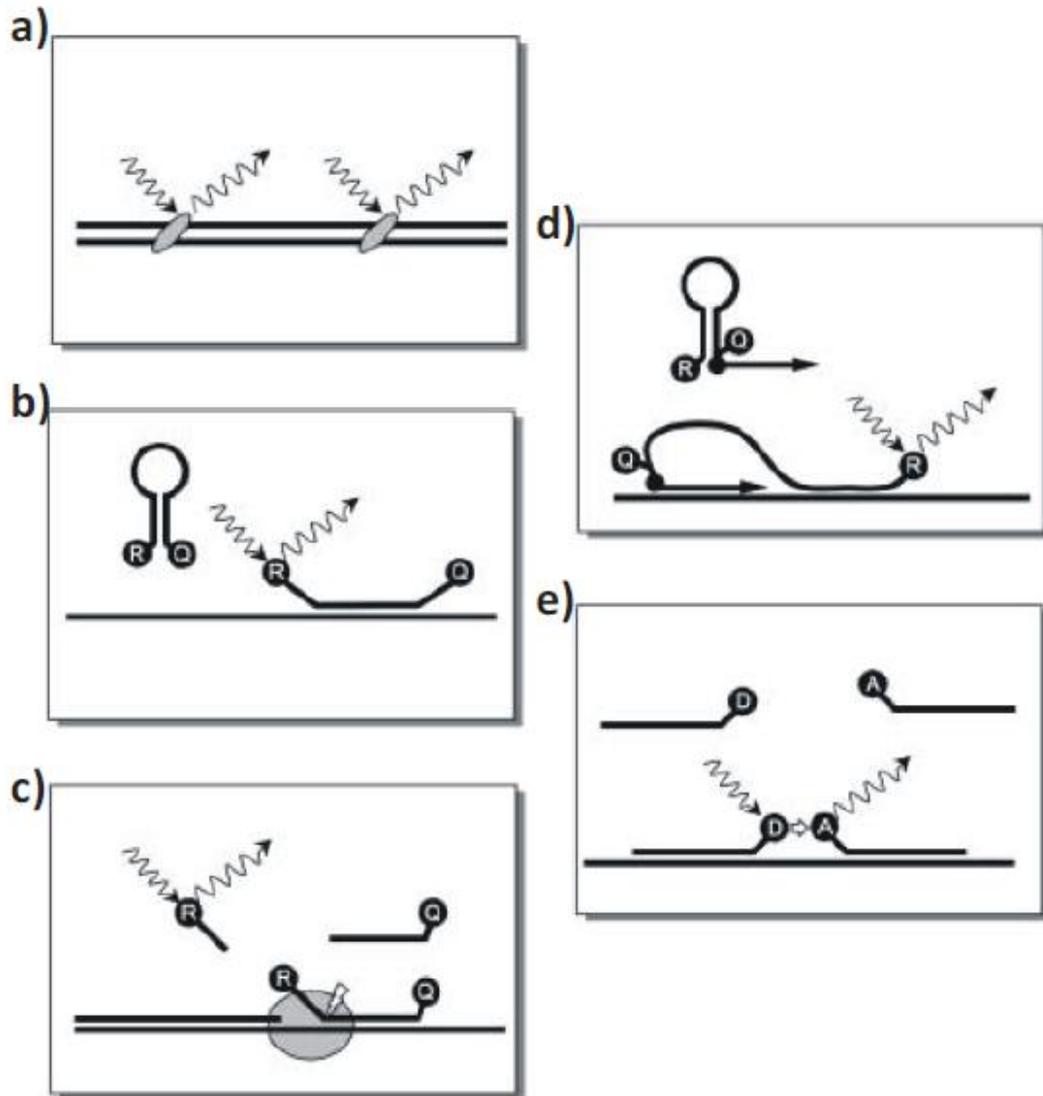
La sonda es complementaria a una secuencia generada por la extensión del iniciador adyacente, donde se unirá después de separarse del ADN diana en el siguiente ciclo de desnaturalización y anillamiento. Cuando la sonda hibrida con el amplicon, el fluoróforo queda separado del quencher, y por lo tanto habrá emisión de fluorescencia (Hanna, 2005).

### 3.1.2. Tendencia actual del uso de PCR en tiempo real

En los métodos de PCR para detectar patógenos en alimentos se recomienda realizar una fase previa de enriquecimiento de entre 6h a 24h para aumentar el número de células diana, ya que en la extracción del ADN se utiliza un

volumen pequeño de muestra. También se recomienda la utilización de un control interno en la reacción de PCR para descartar posibles inhibiciones (Malorny, 2003).

Figura 4. Sistemas de detección más utilizados en la PCR a tiempo real



a) SYBR Green I; b) molecular beacon; c) sonda TaqMan, el círculo gris señala la ADN polimerasa hidrolizando la sonda TaqMan; d) sonda scorpion; e) tecnología FRET. R: fluoroforo, Q: quencher, D: fluoroforo donador, A: fluoroforo receptor.

Hanna, S. E. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science*, 70(3): 49-53.

## D. SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD BASADO EN ISO/IEC 17025:2005

### 1. Sistema de Gestión de Calidad

Un sistema es conjunto de elementos mutuamente relacionados o que interactúan entre sí. Para conducir y operar una organización en forma exitosa con respecto a la calidad, se puede lograr el éxito implementando y manteniendo un sistema de gestión que esté diseñado para mejorar continuamente su desempeño mediante la consideración de las necesidades de todas las partes interesadas. La gestión de una organización comprende la gestión de la calidad entre otras disciplinas de gestión (ISO 9001, 2008).

El sistema de gestión de la calidad es aquella parte del sistema de gestión de la organización enfocada en el logro de resultados, en relación con los objetivos de la calidad, para satisfacer las necesidades, expectativas y requisitos de las partes interesadas, según corresponda. Los objetivos de la calidad complementan otros objetivos de la organización, tales como aquellos relacionados con el crecimiento, los recursos financieros, la rentabilidad, el medio ambiente y la seguridad y salud ocupacional. Las diferentes partes del sistema de gestión de una organización pueden integrarse conjuntamente con el sistema de gestión de la calidad, dentro de un sistema de gestión único, utilizando elementos comunes. Esto puede facilitar la planificación, la asignación de recursos, el establecimiento de objetivos complementarios y la evaluación de la eficacia global de la organización (ISO 9001, 2008).

Los sistemas de gestión de la calidad pueden ayudar a las organizaciones a aumentar la satisfacción de sus clientes. Los clientes necesitan productos / servicios con características que satisfagan sus necesidades y expectativas (ISO 9001, 2008).

El enfoque a través de un sistema de gestión de la calidad anima a las organizaciones a analizar los requisitos del cliente, definir los procesos que

contribuyen al logro de productos aceptables para el cliente y a mantener estos procesos bajo control. Un sistema de gestión de la calidad puede proporcionar el marco de referencia para la mejora continua con objeto de incrementar la probabilidad de aumentar la satisfacción del cliente y de otras partes interesadas. Proporciona confianza tanto a la organización como a sus clientes, de su capacidad para proporcionar productos que satisfagan los requisitos de forma coherente (ISO 9001, 2008).

## 2. Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR

La Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) es el Organismo Nacional de Normalización. Es una entidad adscrita al Ministerio de Economía cuya principal misión es la de proporcionar soporte técnico al sector productivo y protección al consumidor, por medio de la actividad de normalización (NGR/ISO/IEC 17025: 2005 , 2005).

La Comisión Guatemalteca de Normas preocupada por el desarrollo de la actividad productiva de bienes y servicios en el país, atiende las solicitudes de los sectores industrial, comercial, oficial y académico, a fin de elaborar o revisar las normas que se requieran con el objeto de mantenerlas actualizadas (NGR/ISO/IEC 17025: 2005 , 2005).

El estudio de la presente norma estuvo a cargo del Comité Técnico de Trabajo para la Elaboración de Normas para la Acreditación de Laboratorios, integrado por los miembros que se indican a continuación:

- Departamento de Toxicología / USAC
- Instituto de Nutrición para Centroamérica y Panamá (INCAP)
- Distribuidora Mercurio, S.A. (DISMERSA)
- Comisión Guatemalteca de Laboratorios/Avícola Villalobos
- Asociación de Químicos Biólogos de Guatemala
- Consultoras independientes
- Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR)

### 3. Organización Internacional de Normalización ISO

ISO (Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las normas internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica (ISO 9001, 2008).

### 4. Sistema de Gestión de Calidad basado en NGR/ISO/IEC 17025:2005

La norma NGR/ISO/IEC 17025:2005 contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios de ensayo y de calibración si desean demostrar que poseen un sistema de gestión, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos (NGR/ISO/IEC 17025: 2005 , 2005).

La NGR/ISO/IEC 17025:2005 incluye muchos de los criterios contenidos dentro de las normas 9001 y 9002, sin embargo esta ha sido preparada específicamente tomando en cuenta las actividades de los laboratorios de ensayo y calibración. Se hace énfasis en los documentos del sistema de la calidad y en los temas de la competencia técnica pertinentes a las operaciones de un laboratorio lo que permite el aseguramiento de la calidad. El capítulo 4 establece los requisitos para una gestión sólida. El capítulo 5 establece los requisitos para la competencia técnica en los tipos de ensayos o de calibraciones que el laboratorio lleva a cabo (NGR/ISO/IEC 17025: 2005 , 2005) (Instituto Ecuatoriano de acreditación, 2009).

Los laboratorios de ensayo y de calibración que cumplen esta Norma Internacional funcionarán, por lo tanto, también de acuerdo con la Norma ISO 9001. La conformidad del sistema de gestión de la calidad implementado por el laboratorio, con los requisitos de la Norma ISO 9001, no constituye por sí sola una prueba de la competencia del laboratorio para producir datos y resultados técnicamente válidos. Por otro lado, la conformidad demostrada con esta Norma Internacional tampoco significa que el sistema de gestión de la calidad implementado por el laboratorio cumple todos los requisitos de la Norma ISO 9001: 2008 Requisitos del sistema de gestión de la calidad (NGR/ISO/IEC 17025: 2005 , 2005).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas enfermedades se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o bien por las sustancias tóxicas que ellos producen. Para prevenirlas, existen controles en todos los países que garantizan los mejores niveles de seguridad, higiene y calidad a lo largo de la cadena. Sin embargo aún se siguen produciendo brotes de ETA's (Consejo para la información sobre la seguridad de los alimentos y nutrición, 2013).

En América Latina las ETA's representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud. El principal causante de ETA's es *Salmonella entérica* siendo el agente causal de 46.9% de las infecciones (Consejo para la información sobre la seguridad de los alimentos y nutrición, 2013) (Méndez & Badillo, 2010).

En Guatemala se desconoce la incidencia exacta de las enfermedades ocasionadas por la ingestión de alimentos, debido en parte a limitaciones del servicio de información epidemiológica y a dificultades por parte de los laboratorios para identificar el o los agentes causales (Shneider, 2005).

En la industria de alimentos, principalmente los exportadores, la detección de *Salmonella entérica* en los productos alimenticios tiene una gran importancia, un resultado erróneo o atraso en el resultado puede conllevar a grandes pérdidas económicas por rechazo o recolecta del producto.

Los métodos internacionales validados por "Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods" y "Standard Methods for the Water and Waste Water Examination" consideran 5 fases para la recuperación de *Salmonella entérica* las cuales son preenriquecimiento, enriquecimiento, siembra en agares selectivos, pruebas bioquímicas y serotipificación; siendo el tiempo mínimo para la entrega de resultados de 5 días.

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleídos, tienen la potencialidad de ser altamente específicos, tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Yáñez, 2008).

Para poder demostrar la competencia técnica de un laboratorio de ensayo, es necesario acreditar los servicios de análisis ofrecidos, garantizándoles así, a los clientes resultados confiables. A través de un sistema de acuerdos internacionales, los laboratorios acreditados reciben un reconocimiento internacional, el cual permite que sus resultados sean reconocidos por mercados internacionales. Este reconocimiento permite reducir costos a las industrias, evitando que los análisis se tengan que enviar a otros países (International laboratory accreditation cooperation, 2013).

Actualmente BIOLAB, S.A.<sup>®</sup> cuenta con un sistema integrado de gestión de calidad basado en las normas ISO/IEC 17025:2005 e ISO/ IEC 15189:2012, habiendo alcanzado la acreditación para análisis microbiológicos en aguas y alimentos. Debido al aumento en la demanda por parte de las industrias de alimentos de análisis acreditados para la detección *Salmonella entérica*, se ve la necesidad de la ampliación del alcance, apoyando de esta manera las industrias de exportación a las cuales se les exige análisis acreditados que garanticen a nivel internacional la inocuidad de su producto.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

1. Ampliar el alcance del sistema de gestión de calidad del laboratorio BIOLAB, S.A.<sup>®</sup> en base a la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración para la detección de *Salmonella entérica* por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT- PCR) en aguas y alimentos.

### B. Objetivos específicos

2. Evaluar el cumplimiento del sistema de gestión ya establecido en el laboratorio con la norma COGUANOR ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
3. Elaborar los documentos específicos para asegurar la competencia del personal que trabaja en el área de biología molecular.
4. Elaborar los documentos específicos de instalaciones y condiciones ambientales aplicables para el área de Biología molecular.
5. Revisar y complementar los documentos de Equipo para incluir equipos utilizados en el análisis de *Salmonella entérica* por RT – PCR.
6. Realizar la verificación *in situ* del método de análisis de *Salmonella entérica* por RT – PCR en aguas y alimentos en el laboratorio de ensayo.
7. Evaluar los procedimientos de la fase post analítica y su cumplimiento con la norma COGUANOR ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

## V. METODOLOGÍA

### A. Recursos Humanos

- Investigadores:

Gabriela Penados Richter

### B. Recursos Institucionales

- Laboratorio BIOLAB, S.A. área de de Biología molecular

### C. Recursos Físicos

#### 1. Reactivos

- *TaqMan® Salmonella enteric Detection Kit – Applied Biosystems*
  - Detecta 1 – 10 copias de AND de *Salmonella entérica* y 1 UFC en 25 gramos de alimentos
  - Cuenta con certificación de AOAC Research Institute y distinción de AFAQ/AFNOR (ISO 16140)
- *Salmonella entérica* Real time PCR Kit – Life River, Shanghai Zhijiang Biotechnology Co., Ltd.
- PrepMan Ultra – Applied Biosystems
- Caldo Lactosado
- Agar MacConkey
- Batería (TSI, LIA, Citrato, SIM, Urea)
- Antisueros *Salmonella* spp.

#### 2. Equipos

- Pipetas Automáticas de volumen variable (10-100 µl y 100-1000 µl)

- Pipeta serológicas (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L)
- Refrigeradora
- Congelador
- Termobloque
- Agitador
- Vortex
- Potenciómetro
- Micro centrífuga (13,400rpm)
- Campana de trabajo
- Termociclador en tiempo real
- Autoclave
- Estufa
- Campana de flujo laminar
- Incubadora

### 3. Materiales

- Puntas de pipetas desechables (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L)
- Tubos de reacción 1.5mL libres de DNA, RNA, RNAasa
- Guantes de nitrilo sin polvo
- Papel mayordomo
- Marcadores indelebles
- Cronómetro
- Tubos de 0.2 $\mu$ L para PCR en tiempo real
- Erlenmeyer
- Bolsas estériles

#### 4. Otros

- Papel Bond tamaño carta 80grs
- Computadora
- Impresora

#### D. Tipo de estudio

- Prospectivo Transversal

#### E. Universo de Trabajo

- Laboratorios de ensayo de Guatemala

#### F. Población

- Laboratorio BIOLAB, S.A.<sup>®</sup>

#### G. Muestra

- Área de Biología Molecular, Laboratorio BIOLAB, S.A.<sup>®</sup>

#### H. Procedimiento

1. Se evaluó la conformidad del capítulo 4 Sistema de gestión de la norma NGR/ISO/IEC 17025: 2005 mediante una tabla cruzada con el manual de calidad del laboratorio.

2. Se elaboraron documentos específicos de los requisitos técnicos

- Requisitos específicos de personal
- Requisitos específicos de las instalaciones y condiciones ambientales.
- Requisitos específicos de equipos utilizados, programa de mantenimiento y equipo.

- Aseguramiento de la calidad para las técnicas moleculares.
- Procedimiento operativo estándar para la detección de *Salmonella* entérica por RT-PCR.

### 3. Verificación del método *in situ* utilizando TaqMan® *Salmonella enteric* Detection Kit – Applied Biosystems (C. Zini, 2010)

- Evaluación de la competencia del personal
  - i. Se evaluó la precisión de pipeteo
- Límite de detección
  - i. Se prepararon 9 soluciones bacterianas con diferentes concentraciones de *Salmonella entérica* con rango entre  $10^4$  - 0 UFC/mL según la preparación de estándar de McFarland.
  - ii. Se agregó la solución bacteriana 75 UFC/mL a 25gr de Carne molida, Huevo, Lechuga.
  - iii. Se realizaron pre-enriquecimiento de  $24 \pm 2$  horas en caldo lactosado a  $41^\circ\text{C}$ .
  - iv. Se extrajo las muestras con Prep Man Ultra.
    - Se tomó 1 ml de muestra pre-enriquecida homogenizada y centrifugar por 5 min a 13.4 rpm. Se descartó sobrenadante, se agregó 100 $\mu\text{L}$  de PrepMan Ultra. Se incubó por 10 min a  $100^\circ\text{C}$  en termobloque.
    - Se agitó fuertemente en vortex por 10 segundos.
    - Se centrifugó por 3 min a 13.4 rpm. Se Realizó una dilución 1: 10 con el sobrenadante.
- i. Amplificación según protocolo de trabajo.
  - 10  $\mu\text{L}$  de Taqman Master mix, 2  $\mu\text{L}$  de polimerasa y 8  $\mu\text{L}$  de ADN extraído.

- 5  $\mu$ L Taqman Master mix, 1  $\mu$ L de polimerasa y 4  $\mu$ L de ADN extraído.

Paso	Hold	PCR	
		45 ciclos	
Tiempo	10 min	15 s	1 min
Temperatura	95°C	95°C	60°C

- Lectura de *Salmonella* entérica en canal FAM y control interno -IPC- en VIC.
- i. Se comparó con kit de *Salmonella entérica* Real time PCR Kit – Life River, Shanghai Zhijiang Biotechnology Co., Lts el cual cuenta con estándar para realizar el ensayo cualitativamente.
- 35 $\mu$ L de Master mix, 1  $\mu$ L de IPC y 0.5  $\mu$ L de enzima.

Paso	Hold		PCR	
			45 ciclos	
Tiempo	2 min	2 min	15 s	1 min
Temperatura	37°C	94°C	93°C	60°C

- Control de calidad Interno para cada corrida
  - i. Control positivo de *Salmonella entérica*
  - ii. Control negativo
  - iii. Control interno para asegurar que no hayan inhibidores de la reacción.
- Participación en ensayos inter laboratorios / Ensayo de aptitud UDEA - Comisión de laboratorios AGEXPORT
- 4. Análisis de resultados
  - Estadística descriptiva de la muestra

## VI. RESULTADOS

Para ampliar el alcance del sistema de gestión de calidad del laboratorio se utilizó la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo, se revisaron los requisitos de la norma así como requisitos internacionales para las técnicas moleculares.

Para evaluar la conformidad del área de gestión se revisaron los requisitos del capítulo 4, por ser un laboratorio acreditado conforme esta norma, y los procedimientos son comunes para todas las áreas, se verifica su cumplimiento en su totalidad. Tabla No. 2

En relación a los hallazgos para verificar el cumplimiento de los aspectos técnicos de la norma, fue necesario la implementación de de procedimiento y documentos correspondientes para los siguientes requisitos:

- 5.2 Personal
- 5.3 Instalaciones y condiciones ambientales
- 5.4 Métodos de ensayo y calibración y validación de los métodos
- 5.5 Equipos
- 5.9 Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y calibración

Tabla 2. Tabla cruzada COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 y sistema de gestión de BIOLAB, S.A. para el capítulo 4 de la norma.

ISO/IEC 17025:2005 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo	MANUAL DE CALIDAD BIOLAB	
	<i>Capítulo</i>	
4 Requerimientos administrativos		
4.1 Organización	6	ORGANIZACIÓN Y ADMINISTRACIÓN
4.2 Sistema de calidad	5	SISTEMA DE CALIDAD
	5	ACREDITACIÓN
4.3 Control de documentos	7	CONTROL DE DOCUMENTOS
4.4 Revisión de solicitudes, ofertas de pago y contratos	8	REVISIÓN DE CONTRATOS
4.5 Subcontratación de ensayos y calibraciones	9	DELEGACIÓN DE SERVICIOS (SUB CONTRATACIÓN DE ENSAYOS)
4.6 Compra de servicios y suministros	10	PROVEEDORES (SERVICIOS EXTERNOS Y SUMINISTROS)
4.7 Servicio al cliente	11	SERVICIOS DE ASESORÍA
4.8 Reclamos	12	QUEJAS (RESOLUCIÓN DE RECLAMOS)
4.9 Control de ensayos y/o trabajo de calibración inconformes	13	IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE NO CONFORMIDADES
4.10 Acción correctiva	14	ACCIONES CORRECTIVAS
4.11 Acción preventiva	15	ACCIONES PREVENTIVAS
	16	MEJORA CONTINUA
4.12 Control de registros	7	CONTROL DE DOCUMENTOS
4.13 Auditorías internas	17	AUDITORÍAS INTERNAS Y REVISIONES POR LA DIRECCIÓN
4.14 Revisiones de la gerencia		

Fuente: Datos experimentales

El laboratorio debe asegurar la competencia de quienes realizan análisis en el área de biología molecular, para esto se modificó el documento G P 02 Organización y Personal anexo 6 con la especificaciones requeridas para el director técnico / técnico profesional que realice ensayos moleculares. Se establecieron los requisitos en cuanto a educación, formación, habilidades y experiencia. Figura 5.

Figura 5. Modificación al documento GP 02 Organización y Personal

<b>BIOLAB</b>	<b>ORGANIZACIÓN Y PERSONAL</b>			<i>G DO 02 - Anexo 6</i>
<b>Descripción de Puestos</b>				
<i>Elaborado: CRP</i>	<i>Revisado por: GP</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>	
<i>Fecha de elaboración : 20/08/2012</i>		<i>Fecha de Actualización: 05/10/2013</i>		<i>Página: 3 de 5</i>
<b>1. Director Técnico / Técnico profesional – Área de Biología Molecular</b>				
<b>Nombre del Puesto:</b> Director Técnico		<b>Educación, formación y experiencia</b>		
<b>Propósito del Puesto:</b> Dirigir, coordinar y supervisar las actividades de las diferentes áreas de BIOLAB, S.A.		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Experiencia años en puestos similares (<i>Deseable</i>)</li> <li>▪ Profesional Químico Biólogo, Bioquímico o carreras afines</li> <li>▪ Con Iniciativa y colaborador.</li> <li>▪ Ético, responsable, honorable</li> <li>▪ Hombre / Mujer</li> <li>▪ Curso en técnicas moleculares (<i>deseable</i>)</li> </ul>		
<b>Tipo de Contratación:</b> Por contrato		<b>Habilidades y destrezas</b>		
<b>Jefe Superior:</b> Director General		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Espíritu de superación</li> <li>▪ Actitud (discreción)</li> <li>▪ Trabajo en equipo</li> <li>▪ Buenas habilidades administrativas.</li> <li>▪ Toma de decisión en el momento oportuno. Capacidad gerencial.</li> <li>▪ Habilidades de negociación.</li> <li>▪ Buena administración del personal a su cargo. Precisión y eficacia en el desarrollo de actividades. Trabajo en equipo.</li> <li>▪ Buenas relaciones interpersonales. Excelente control y estabilidad emocional. Facilidad para la expresión oral y escrita.</li> </ul>		
<b>Comunicación Directa</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ascendente: Director General y Director de Calidad.</li> <li>▪ Descendente: Secretaria Recepcionista</li> <li>▪ Externa: Proveedores y clientes</li> </ul>				
<b>Ambiente de Trabajo</b>		<b>Atribuciones y responsabilidades:</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Los Directores Técnicos realizarán sus labores en la 30 calle 17-50 zona 12, Colonia Santa Rosa II y/o Avenida Petapa 28-98 zona 12.</li> <li>▪ Los recursos y materiales para realizar su trabajo serán proporcionados por BIOLAB.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atención al cliente: Asesoría técnica a los clientes, toma de muestras</li> <li>▪ Evaluar constantemente las necesidades del cliente, para la implementación de nuevas pruebas y metodologías de trabajo, para ampliar y mejorar el servicio.</li> <li>▪ Velar y coordinar las actividades del área en cuestión</li> <li>▪ Supervisión y verificación para que los procedimientos se cumplan tal y como han sido establecidos.</li> <li>▪ Sistema de Gestión de Calidad</li> <li>▪ Apoyo en el procesamiento de muestras cuando sea necesario (falta de personal, exceso de trabajo, o cualquier otra situación que lo requiera)</li> <li>▪ Disponibilidad de Inventario de Materiales, Reactivos</li> <li>▪ Mantenimiento preventivo y correctivo de equipos</li> <li>▪ Recursos Humanos - Capacitación de Personal</li> <li>▪ Apoyo en actividades de gestión administrativa</li> <li>▪ Seguridad en el Laboratorio: Personal, Clientes, medio ambiente.</li> <li>▪ Cuidar Instalaciones de laboratorio – Cumplir las condiciones ambientales</li> </ul>		

Fuente: G DO 02 Anexo 6 Organización y personal – Descripción de puestos – Manual de Calidad Laboratorio BIOLAB, S.A.®

En cuanto al entrenamiento del personal nuevo en el área se modificó el documento G P 09 Inducción y entrenamiento de personal agregando la inducción específica a las áreas según los requerimientos técnicos específicos.

Figura 6. Modificación al documento GP 09 Inducción y entrenamiento de personal

<b>BIOLAB</b>		<b>INDUCCION – PERSONAL DE NUEVO INGRESO</b>		<i>G P 09</i>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: CRP</i>	<i>Aprobado: LP</i>	<i>Versión: 2</i>	
<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Fecha: 19/03/2012</i>	<i>Actualización: 05/10/13</i>	<i>Página: 2 de 6</i>	

**4.1 Inducción específica**

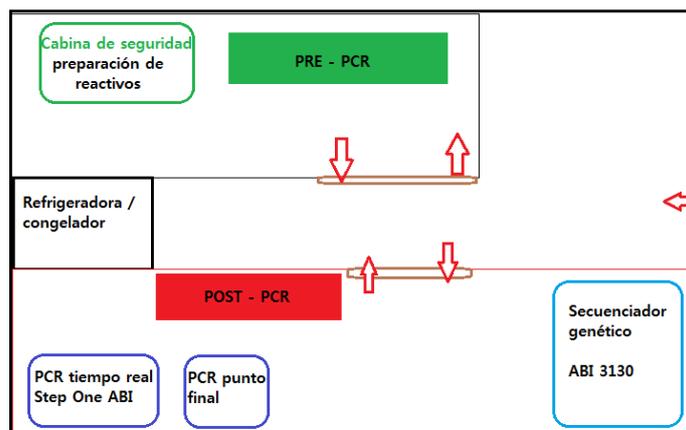
- a) Descripción en detalle del puesto de trabajo
- b) Registro en firmas aprobadas
- c) Autorización al sistema de BIOLAB
- d) Lectura de procedimientos – Capacitación – Entrenamiento
- e) Elaborar un plan de capacitación
  - a. El tiempo requerido dependerá del analista, técnica y experiencia.
  - b. Debe incluir por lo menos pero no limitarse en: buenas prácticas en el laboratorio, puntos críticos en las marchas analíticas, seguridad en el laboratorio.
- f) Evaluar la capacitación
  - a. Antes de autorizar el análisis de muestras sin supervisión se deberá evaluar el desempeño del analista.
  - b. Realizar 4 replicados de una muestra positiva, 4 replicados de una muestra negativa y 2 muestras desconocidas.
  - c. Se deberá realizar evaluación de puntos críticos en la marcha analítica de forma teórica, así como de seguridad en el laboratorio.
  - d. Realizar evaluación de la precisión de pipeteo.
- g) Autorización para uso de equipo (*R 05 02*)

Fuente: Inducción – Personal de nuevo ingreso – Manual de Calidad Laboratorio BIOLAB, S.A.<sup>®</sup>

El laboratorio debe asegurar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o afecten adversamente la calidad requerida de las mediciones. La alta sensibilidad de las técnicas moleculares requiere condiciones especiales como la distribución de las áreas, medidas de seguridad entre otros.

El área de biología molecular está diseñada para evitar contaminación cruzada de los productos de amplificación hacia la preparación de materiales y reactivos. Ver figura 7.

Figura 7. Instalaciones físicas del área de biología molecular



Se agregó un anexo al procedimiento de aseguramiento de la calidad – Área de Biología Molecular donde se detallan buenas prácticas de laboratorio específicas para un laboratorio de biología molecular. Ver figura 8.

Figura 8. Procedimiento de Aseguramiento de la Calidad – Biología molecular

BIOLAB	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD – Biología molecular		G P 13 – Anexo 4
Elaborado por: GPR	Revisado por: CRP / GC	Aprobado por: LP	Versión: 2
Fecha: 5/09/2013	Fecha de actualización: 4/04/2014		Página: 1 de 4

**ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD – BIOLOGÍA MOLECULAR**

- OBJETIVOS**
  - Contar con procedimientos para garantizar los resultados de los análisis realizados por técnicas moleculares tanto para el área clínica como para el área industrial
- ALCANCE**
  - Procedimientos relacionados con los análisis por técnica moleculares, PCR punto final, PCR nested, PCR en tiempo real, RT - PCR, secuenciación genética.
- REFERENCIAS**
  - Quality Assurance / Quality control Guidance form laboratories Performing PCR Analyses on Environmental samples, EPA, October 2004
- PROCEDIMIENTOS**
  - Requisitos mínimos que debe cumplir el personal en cuanto al perfil del puesto y capacitación se describen en G DO 02 anexo 6 – Descripción de Puestos y G P 09 Inducción de Personal Nuevo.
  - Requisitos mínimos que deben cumplir las instalaciones se describen en G P 07 Seguridad en el laboratorio.
  - Procedimientos para Asegurar la calidad de los equipos y reactivos: Procedimiento para garantizar el uso correcto de cada uno de los equipos se detalla en el Manual de Calidad y en el documento *G P 11 Instalaciones y Equipo*.
    - Se garantiza el buen funcionamiento de los equipos mediante:
      - Mantenimientos preventivos
      - Verificación de calibración de Micro pipetas
      - Verificación de Volumen de Pipetas serológicas

<b>BIOLAB</b>	<b>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD – Biología molecular</b>		<i>G P 13 – Anexo 4</i>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: CRP /GC</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha: 5/09/2013</i>	<i>Fecha de actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página: 2 de 4</i>

**5.3.2 Certificaciones:** Se realizan calibraciones periódicas de los equipos de medición, para garantizar la trazabilidad de las mediciones.

**5.3.3 Registros de Temperaturas:** Temperaturas de Refrigeradoras, incubadoras y baño de maría, se registran en formularios correspondientes (*R 11*), con el objetivo de estar alerta de los cambios, y tendencias que puedan ocurrir y causar daño a los reactivos.

**5.3.4 Control de balanzas:**

- a) Balanzas: Verificación antes de cada uso empleando masas certificadas. Registrar en formulario *R 13B*.
  - Balanza analítica: Se cuenta con certificado de verificación de calibración, realizado por un organismo competente.
  - Balanza semi-analítica Empleada para la pesada de muestras y medios de cultivo para su preparación. Su calibración se verifica empleando masas.
- b) Juego de Masas:
  - Se verificó su masa en el laboratorio, mediante el uso de la balanza analítica.
  - Se solicitó a Centro Nacional de metrología su verificación de calibración. Certificado en cartapacio de Equipos

**5.4 Procedimientos de control Interno**

Se deben analizar controles positivos y negativos en cada corrida para demostrar el adecuado funcionamiento de los métodos.

- **Control Positivo**

El control positivo es analizado para asegurar que el método es capaz de la recuperación y amplificación de la diana. La concentración de la secuencia de interés debe ser 10 – 100 veces más del límite de detección. Si el ensayo no lo requiere es posible utilizar únicamente el control interno positivo IPC como verificación de que el ensayo funcionó, esto disminuye la posibilidad de contaminación cruzada.

- **Control Negativo**

El control negativo es analizado con cada corrida para asegurar que no hay contaminación en la reacción. Deberá contener todos los reactivos utilizado en la corrida exceptuando la muestra a analizar. Si se analizan dos o más patógenos deberá haber una línea de por medio entre cada uno y cada patógeno deberá tener si control negativo.

- **Control Interno Positivo (IPC)– Inhibidores de la reacción**

El control interno es para cada muestra a analizar, y garantiza que no hay inhibidores en cada reacción de PCR.

En caso de muestras humanas puede utilizarse control de globina o controles internos agregados al pozo de reacción.

En el caso de las muestras de alimentos, aguas, superficies el control interno debe ser agregado a la reacción y depende del reactivo a utilizar.

- Registrar la información en R 27 M.

<b>BIOLAB</b>	<b>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD – Biología molecular</b>		<i>G P 13 – Anexo 4</i>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: CRP/GC</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha: 5/09/2013</i>	<i>Fecha de actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página: 3 de 4</i>
<p><b>5.5 Procedimientos de Evaluación Externa de Calidad y Ensayos de Aptitud</b></p> <p><b>5.5.1</b> BIOLAB, participa en Ensayos de inter comparación coordinados por la Unidad de Ensayos de Aptitud - UDEA - de la Comisión Guatemalteca de Laboratorios, AGEXPORT. Resultados se archivan en cartapacio de Aseguramiento de Calidad</p>			
<p><b>6. VESTIMENTA</b></p> <p><b>6.1</b> Bata de laboratorio, manga larga, cerrada exclusivas para las áreas de biología molecular, diferente bata para cada área (pre PCR, post PCR). Se deben lavar al menos una vez a la semana, utilizar batas descartables.</p> <p><b>6.2</b> Guantes sin polvo, deben ser cambiados después de manipular muestras, controles, amplicones, contacto de la parte exterior con la piel, esto previene la introducción de enzimas predominantes en la piel como DNAsas, RNAsas los cuales degradan el ADN.</p> <p><b>6.3</b> Uso de mascarilla protectora en casos donde no haya cabina de seguridad.</p>			
<p><b>7. DISEÑO DE FACILIDADES Y FLUJO DE TRABAJO</b></p> <p><b>7.1</b> La alta sensibilidad de las técnicas de PCR requiere de ciertas condiciones especiales. El laboratorio debe operar de tal manera que se prevenga la contaminación de las reacciones con productos de amplificación y contaminación cruzada.</p> <p><b>7.2</b> Se cuentan con áreas físicas separadas para la preparación de las reacciones de PCR y la amplificación y manipulación de ácido nucleídos amplificados. Cada área cuenta con su equipo de laboratorio necesario y NO es permitido llevar equipo ni materiales de un área a otra</p> <p><b>7.3</b> Sólo es permitido en flujo unidireccional del área de pre PCR a post PCR y las puertas deben mantenerse siempre cerradas.</p> <p><b>7.4</b> Se cuenta con cabina de seguridad con luz UV en área de pre PCR para la preparación de las reacciones.</p>			
<p><b>8. Instalaciones</b></p> <p><b>8.1</b> Las instalaciones se deberán mantener siempre limpias, la limpieza de pisos dependerá del uso del área. Siempre se realizará la limpieza en orden unidireccional iniciando por Pre-PCR y finalizando por Post – PCR. No está permitido regresar al área de Pre- PCR.</p> <p><b>8.2</b> El equipo (pipetas), material (pizetas, marcadores, cuadernos, entre otros) NO se deberán intercambiar entre áreas.</p> <p><b>8.3</b> Las mesas de trabajo, cabina de seguridad y equipo se deberán limpiar según instructivo I 121 siempre antes de utilizar las instalaciones y al finalizar la jornada para prevenir la contaminación cruzada entre muestras y con productos de amplificación de reacciones previas.</p> <p><b>8.4</b> Condiciones de temperatura y humedad</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>8.4.1</b> Temperatura : Rango entre 15 -30°C</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>8.4.2</b> Humedad: 20 – 80%</p>			

<b>BIOLAB</b>	<b>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD – Biología molecular</b>		<i>G P 13 – Anexo 4</i>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: CRP/GC</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha: 5/09/2013</i>		<i>Fecha de actualización: 4/04/2014</i>	<i>Página: 4 de 4</i>
<p><b>9. Buenas Practicas</b></p> <p><b>9.1</b> Luego de tocar cualquier parte de la piel con los guantes se deben cambiar para eliminar enzimas prevalentes en la piel.</p> <p><b>9.2</b> Al pipetear asegurar que la punta del tip no toque cualquier superficie no deseada, en caso de ocurrencia, descartar el tip inmediatamente.</p> <p><b>9.3</b> Evitar la formación de burbujas en las reacciones de amplificación, esto evitara la degradación de la polimerasa por la tensión superficial.</p> <p><b>9.4</b> De ser posible alicuotar los reactivos para evitar los ciclos de congelación y descongelación.</p> <p><b>9.5</b> Cuando se preparen las reacciones evitar el calentamiento excesivo de los reactivos utilizando un bloque frío para su conservación.</p> <p><b>9.6</b> Siempre antes de utilizar reactivos, muestras mezclar bien, evitar la agitación excesiva de la polimerasa, y luego bajar el reactivo de la tapadera y paredes con un shortspin (7 seg)</p> <p><b>9.7</b> Utilizar la pipeta de volumen más pequeño para alcanzar una buena precisión al pipetear.</p> <p><b>9.8</b> Mantener las puertas de las diferentes áreas siempre cerradas.</p> <p><b>10. DOCUMENTOS RELACIONADOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• G P 11 Instalaciones y Equipo</li> <li>• R 11 Registro de Temperaturas</li> <li>• Procedimientos y Registros – Preparación de Medios de Cultivos (descritos en 4.4)</li> <li>• Certificados – Calibración de Balanza, Masas</li> <li>• Certificados – Cepas bacteriológica</li> <li>• R 27 M Cuaderno de trabajo</li> </ul>			

Fuente: Aseguramiento de la calidad, Biología Molecular – Manual de Calidad Laboratorio BIOLAB, S.A.®

Los métodos elegidos cuenta con certificación de organismos internacionales como AOAC, ISO y Comunidad Europea (CE®). Se realizó el protocolo de trabajo siguiendo las directrices del método. Figura 9

Figura 9. Protocolo de trabajo, Detección de *Salmonella entérica* por PCR en Tiempo Real (Método Taqman)

<b>BIOLAB</b>	<b>DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)</b>			<b>P B M I 01</b>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: GC/CRP</i>	<i>Aprobado por: LP</i>		<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha de Elaboración: 5/10/2013</i>		<i>Fecha de Actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página 1 /5</i>
<p><b>DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)</b></p> <p><b>1. OBJETIVO</b></p> <p><input type="checkbox"/> Describir el procedimiento para realizar detección de <i>Salmonella entérica</i> por PCR en tiempo real en agua y alimentos por el método TaqMan®</p> <p><input type="checkbox"/> Contar con un procedimiento para la estandarización y obtención de resultados confiables, reproducibles para la interpretación correcta.</p> <p><b>2. LISTA DE DISTRIBUCIÓN</b></p> <p><input type="checkbox"/> Director Técnico – Laboratorio Análisis Industriales</p> <p><input type="checkbox"/> Personal Técnico – Laboratorio Análisis Industriales</p> <p><b>3. ALCANCE</b></p> <p><input type="checkbox"/> Procedimientos para los análisis de <i>Salmonella entérica</i> por PCR en tiempo Real.</p> <p><b>4. REFERENCIAS</b></p> <p><input type="checkbox"/> Protocolo de trabajo "TaqMan® <i>Salmonella entérica</i> detection kit User guide"</p> <p><input type="checkbox"/> Protocolo de trabajo "PrepMan Ultra"</p> <p><input type="checkbox"/> BAM: <i>Salmonella</i>. Chapter 5. 2013 Versión</p> <p><b>5. Definiciones</b></p> <p><b>5.1. Amplificación:</b> Proceso de hacer copias/ incrementar el numero de una secuencias especifica de ADN.</p> <p><b>5.2. Master Mix:</b> Reactivo común para todos los ensayos de detección de patógenos, es utilizado para preparar un premix. Contiene la polimerasa que inicia la amplificación en presencia de los primes específicos.</p> <p><b>5.3. Control Interno Positivo – IPC:</b> Control presente en todas los posos de reacción. El IPC debe dar siempre resultados positivos; de lo contrario puede haber un problema con la amplificación.</p> <p><b>5.4. Control Negativo:</b> Control para monitorear contaminación y la integridad de los reactivos. Se necesita un control negativo para cada patógeno.</p> <p><b>5.5. Control positivo:</b> Control que evalúa la amplificación de un blanco (target). Un control positivo es opcional y no se recomienda ya que puede causar contaminación cruzada.</p> <p><b>5.6. Primer:</b> Segmento de ADN complementario a la secuencia blanco, necesario para iniciar la reacción.</p> <p><b>5.7. Blanco (target):</b> Patógeno evaluado</p>				

<b>BIOLAB</b>	<b>DETECCIÓN DE SALMONELLA ENTERICA POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)</b>			<b>P B M I 01</b>
<i>Elaborado por: GPR</i>		<i>Revisado por: GC/CRP</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha de Elaboración: 5/10/2013</i>		<i>Fecha de Actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página 2 / 5</i>

## 6. METODOLOGÍA

### 1. PRE ENRIQUECIMIENTO

- a. Atemperar 225ml de Caldo lactosado  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$
- b. Preparar el control negativo con Caldo lactosado sin muestra.
- c. Pesar asépticamente 25 gr de alimento y agregarle 225ml de caldo lactosado. Mezclar bien por lo menos un minuto.
- d. Ajustar el pH si fuera necesario  $6.8 \pm 0.2$

Huevo líquido, huevos deshidratados, leche líquida, polvos mixtos preparados, fórmula de infantes Semillas y productos	- Preferentemente no congelar las muestras antes de su análisis, si están congeladas deberán descongelarse para obtener la porción analítica.  - Si es en polvo agregar 15 ml de caldo lactosado, revolver con cuchara estéril y luego agregar el resto del caldo lactosado.  -Ajustar el pH $6.8 \pm 0.2$
Carne, sustitutos de carne, productos cárnicos, sustancias animales, productos glandulares, y comidas /pescado, carne, hueso) Fruta en pedazos	Mezclar con caldo lactosado, dejar reposar por $60 \text{ min} \pm 5 \text{ minutos}$ .
Jugo de naranja, cidra de manzana, jugo de manzana. (Pasteurizada y no Pasteurizada)	Utilizar caldo lactosado, no ajustar pH. Dejar reposar por $60 \text{ min} \pm 5 \text{ minutos}$ .
Melones	Colocar el melón dentro de una bolsa, agregar caldo lactosado hasta que el melón "Flote". No ajustar el pH, dejar reposar $60 \text{ min} \pm 5 \text{ minutos}$ .
Muestras ambientales Esponjas / Hisopos	Agregar 225ml de caldo lactosado. Dejar reposar $60 \text{ min} \pm 5 \text{ minutos}$ . Ajustar el pH si es necesario a $6.8 \pm 0.2$ (ver PI M 321)
Agua	Filtrar por lo menos 100 ml de agua, colocar el filtro en 225 ml de caldo lactosado.
Otras Matrices	Consultar BAM: Capítulo 5

- a. Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1$  por  $24 \pm 2$  horas.

BIOLAB	DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)			P B M I 01														
Elaborado por: GPR	Revisado por: GC/CRP	Aprobado por: LP	Versión: 2															
Fecha de Elaboración: 5/10/2013	Fecha de Actualización: 4/04/2014			Página 3 / 5														
<p>1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS</p>																		
<p>a. Registrar en R 27 M las muestras a trabajar.</p> <p>b. Transferir 1 ml de muestra pre enriquecida a tubo cónico estéril de 1.5 ml.</p> <p>c. Centrifugar a velocidad máxima (13.4rpm) por 3 minutos.</p> <p>d. Eliminar sobrenadante, dejando únicamente el pellet en el tubo.</p> <p>e. Agregar 100µL de PrepMan ® Ultra, re-suspender el pellet, agitar con vortex por 10 ± 5 segundos.</p> <p>f. Calentar en termobloque a 100°C ± 5, por 10 ± 2 minutos. <i>Cuidar que las tapaderas de los tubos no se levanten por la presión del vapor colocando peso por encima de los tubos.</i></p> <p>g. Agitar con vortex por 10 ± 5 segundos.</p> <p>h. Centrifugar a velocidad máxima (13.4rpm) por 5 minutos .</p> <p>i. Transferir 50 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, la muestra puede almacenarse hasta un mes de 2 – 8 °C.</p> <p>j. Diluir la muestra con agua grado biología molecular combinando 10 µL de muestra con 90 µL de agua. (Dilución 1:10)</p> <p>k. Mezclar con vortex por 10 ± 5 segundos. La muestra está lista para PCR.</p>																		
<p>2. PREPARACIÓN DE LA PCR</p>																		
<p>a. Preparar el protocolo de amplificación de la siguiente forma</p>																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Paso</th> <th rowspan="2">Hold</th> <th colspan="2">PCR</th> </tr> <tr> <th colspan="2">45 ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tiempo</td> <td>10 min</td> <td>15 s</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>Temperatura</td> <td>95°C</td> <td>95°C</td> <td>60°C</td> </tr> </tbody> </table>					Paso	Hold	PCR		45 ciclos		Tiempo	10 min	15 s	1 min	Temperatura	95°C	95°C	60°C
Paso	Hold	PCR																
		45 ciclos																
Tiempo	10 min	15 s	1 min															
Temperatura	95°C	95°C	60°C															
<p>b. Mezclar todos los reactivos, y realizar un “Shortspin” para bajar los reactivos.</p> <p>c. Preparación de la Premezcla</p> <p>i. 15 µL de MasterMix</p> <p>ii. 3 µL de enzyme mix</p> <p>d. Mezclar la solución, dispensar 18 µL de Master Mix en cada tubo Fast PCR tube.</p> <p>e. Agregar 12 µL de muestra y cerrar.</p> <p>f. Para cada corrida debe haber un control negativo. (Los reactivos tienen control interno para asegurar el correcto funcionamiento de la corrida)</p>																		
<p>3. PREPARACIÓN DEL EQUIPO</p>																		
<p>a. Set up – Advanced Setup</p> <p>b. EXPERIMENT PROPERTIES</p> <p>i. En nombre del proyecto colocar fecha _Salmonella</p> <p>ii. Instrument – StepOne Instrument (48 wells)</p> <p>iii. What type of experiment – Quantification (Standard Curve)</p>																		

<b>BIOLAB</b>	<b>DETECCIÓN DE SALMONELLA ENTERICA POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)</b>		<b>P B M I 01</b>												
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: GC/CRP</i>	<i>Aprobado por: LP</i>	<i>Versión: 2</i>												
<i>Fecha de Elaboración: 5/10/2013</i>	<i>Fecha de Actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página 4 / 5</i>												
<p style="margin-left: 40px;">i. Detection of target sequence - TaqMan® Reagents</p> <p style="margin-left: 40px;">ii. Ramp Speed – Standard ( 2 horas)</p> <p>e. PLATE SETUP</p> <p style="margin-left: 40px;">i. Define targets :</p> <p style="margin-left: 80px;">1. Salmonella enteric – FAM - NFQ-MGB Quenchnr</p> <p style="margin-left: 80px;">2. IPC – VIC - NFQ-MGB Quenchnr</p> <p style="margin-left: 40px;">ii. Define samples</p> <p style="margin-left: 80px;">1. Identificación de muestras</p> <p style="margin-left: 40px;">iii. Assign target and samples</p> <p style="margin-left: 80px;">1. Elegir los pozo donde están las muestras y cuáles son los targets a analizar.</p> <p style="margin-left: 80px;">2. Dye as passive reference – ROX</p> <p>f. RUN METHOD</p> <p style="margin-left: 40px;">i. Open run method – TaqMan P_A (Presencia/Ausencia)</p> <p><b>g. START RUN</b></p> <p>2. REVISIÓN DE RESULTADOS</p> <p>a. Revisar los resultados de todas las muestras trabajadas.</p> <p>b. Chequear cada muestra revisando FAM (fluoróforo para <i>Salmonella enterica</i> y VIC fluoróforo para control interno positivo IPC.</p> <p>c. Evaluar el CT de cada muestra.</p> <p style="margin-left: 40px;">i. CT Menor de 15: Negativo</p> <p style="margin-left: 40px;">ii. CT Mayor o igual a 15 pero menor o igual a 38: Positivo</p> <p style="margin-left: 40px;">iii. CT Mayor de 35 pero menor de 40: Indeterminado</p> <p style="margin-left: 40px;">iv. CT Mayor de 40: Negativo</p>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">FAM <i>Salmonella entérica</i></th> <th style="width: 33%;">VIC IPC – Control interno</th> <th style="width: 33%;">Resultado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Positivo</td> <td>Positivo / negativo</td> <td>Positivo</td> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>Positivo</td> <td>Negativo</td> </tr> <tr> <td>Negativo</td> <td>Negativo</td> <td>Inhibido**</td> </tr> </tbody> </table>				FAM <i>Salmonella entérica</i>	VIC IPC – Control interno	Resultado	Positivo	Positivo / negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Inhibido**
FAM <i>Salmonella entérica</i>	VIC IPC – Control interno	Resultado													
Positivo	Positivo / negativo	Positivo													
Negativo	Positivo	Negativo													
Negativo	Negativo	Inhibido**													
<p>d. Registrar resultados en R27 M y el R39 de análisis microbiológicos para su reporte.</p>															

<b>BIOLAB</b>	<b>DETECCIÓN DE SALMONELLA ENTERICA POR PCR EN TIEMPO REAL (Método TaqMan®)</b>			<b>P B M I 01</b>
<i>Elaborado por: GPR</i>	<i>Revisado por: GC/CRP</i>	<i>Aprobado por: LP</i>		<i>Versión: 2</i>
<i>Fecha de Elaboración: 5/10/2013</i>		<i>Fecha de Actualización: 4/04/2014</i>		<i>Página 5 / 5</i>
<b>3. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS</b>				
<b>Observación</b>	<b>Causa Probable</b>	<b>Recomendación</b>		
No hay señal en el canal FAM o VIC	Inhibición de la PCR	Repetir la preparación de la muestra, repetir el ensayo.  Si PCR todavía está inhibido diluir la muestra 1:5 o 1:10 para diluir inhibidores.		
	Master mix no almacenado correctamente	Repetir el ensayo con reactivos almacenados correctamente		
	Error de pipeteo	Repetir el ensayo, verificar el correcto pipeteo.		
No hay señal de IPC, pero si hay señal de Salmonella enterica.	Hay un gran número de copias de Salmonella en la muestra, resultando en amplificación selectiva.	Ninguna acción es requerida		
No hay señal IPC, pero si hay detección de Salmonella en otros pozos.	Contaminación cruzada de las muestras	Repetir el ensayo utilizando nuevas alicuotas del reactivo.		
En control positivo no hay amplificación.	Reactivos almacenados incorrectamente	Repetir el ensayo con nuevos reactivos.		
<b>7. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS</b>				
a. La Confirmación de resultados se realizará mediante:				
<ul style="list-style-type: none"> <li>i. <i>Salmonella enterica</i> Life River® - Amplificación por TaqMan® diferentes primers.</li> <li>ii. Bactoreiología convencional (BAM) – Confirmación con sueros polivalentes</li> </ul>				

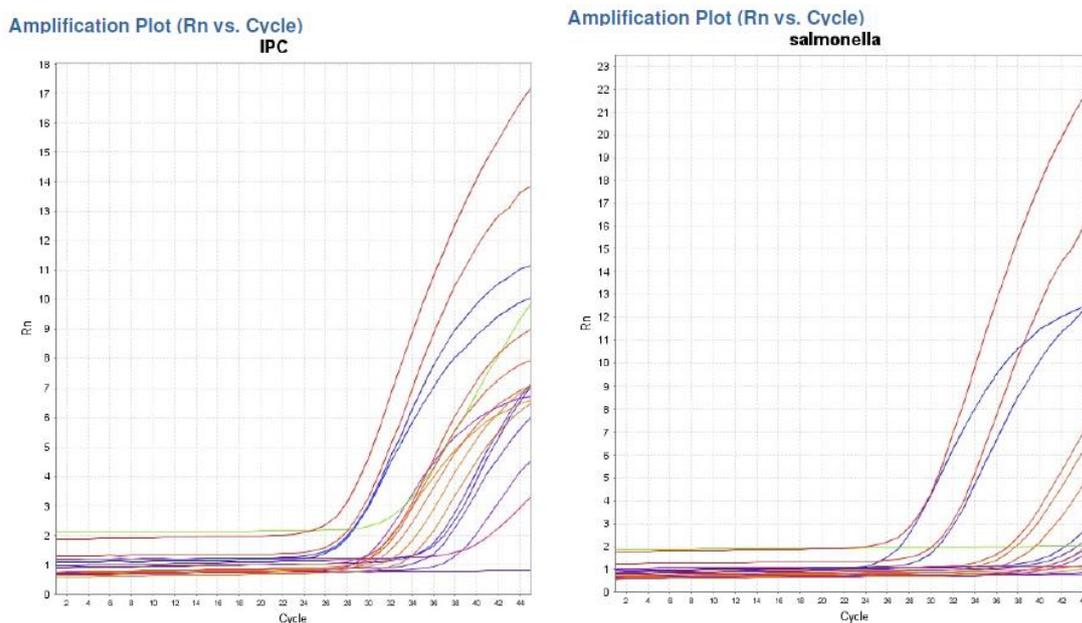
Se realizó la verificación *in situ* del método, se utilizaron 9 concentraciones diferentes partiendo de estándar de Macfarland de una solución conteniendo *Salmonella entérica* y se analizaron con los dos reactivos a evaluar para determinar la sensibilidad del método. Ver tabla 3.

Tabla 3. Verificación de la sensibilidad analítica

Concentración	Salmonella enteric - Taqman®				Salmonella entérica Life River®			
	Volumen final							
	10 µL		20 uL		36 µL		18µL	
	Ciclo de amplificación							
	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
10 <sup>4</sup> UFC/ml	(+) 26.9	+	(+) 22.7	+	(+) 24.1	+	(+) 25.0	+
10 <sup>3</sup> UFC/ml	(+) 27.9	+	(+) 24.4	+	(+) 26.2	+	(+) 29.0	+
500 UFC/ml	(+) 30.7	+	(+) 27.2	+	(+) 27.1	+	(+) 30.1	+
250 UFC/ml	(+) 32.1	+	(+) 30.8	+	(+) 31.0	+	(+) 30.9	+
125 UFC/ml	(+) 33.6	+	(+) 31.0	+	(+) 31.9	+	(+) 31.5	+
75 UFC/ml	-	-	(+) 32.9	+	(+) 32.1	+	(+) 32.4	+
10 UFC/ml	(+) 34.7	+	(+) 33.8	+	(+) 34.5	+	(+) 36.1	+
1 UFC/ml	(+) 35.3	+	(+) 34.4	+	(+) 36.7	+	-	+
0 UFC/ml	-	+	-	+	-	+	-	+

FAM= Lectura de *Salmonella entérica* VIC= Lectura de control interno positivo CT= Ciclo de amplificación, (+) = Resultado positivo, (-) = Resultado negativo

Fuente: Datos experimentales

Figura 10. Curvas de amplificación: Control Interno IPC y *Salmonella entérica*

Fuente: Datos experimentales

Para verificar la precisión del método se contaminaron muestras alimentarias con solución de *Salmonella entérica* aproximadamente 75 UFC/ml en 25 gramos de alimento, los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas con cada uno de los métodos ensayados se muestran detalladamente en la tabla 4.

Tabla 4. Precisión de los métodos de PCR en Tiempo Real

Concentración	Salmonella enteric - TaqMan®				<i>Salmonella entérica</i> Life River®			
	Volumen final							
	10 µL		20 uL		36 µL		18µL	
	Ciclo de amplificación							
	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
Carne Molida	(+) 33.1	+	(+) 30.5	+	(+) 34.1	+	(+) 34.9	+
Huevo	(+) 34.3	+	(+) 33.2	+	(+) 32.9	+	(+) 33.1	+
Lechuga	(+) 30.2	+	(+) 29.4	+	(+) 30.1	+	(+) 30.9	+

FAM= Lectura de *Salmonella entérica* VIC= Lectura de control interno positivo CT= Ciclo de amplificación

Fuente: Datos experimentales

Se realizó el análisis para identificar todos los componentes de la incertidumbre de medición. Tabla 5

Tabla 5. Estimación de la incertidumbre de la medición

No.	Factor	Como se controla
1	Tipo de muestra Cantidad de proteínas, grasas, colorantes	Tratamiento correcto de la muestra, utilización de control interno para identificar inhibidores de la reacción.
2	Tamaño de muestra	Verificación de balanzas.
3	Volumen de muestra y reactivos	Mantenimientos, verificación de pipetas. Verificación de pipeteo, capacitación del personal.
4	Tiempos de incubación	Seguimiento de los protocolos de trabajo. Registros hora de procesamiento.
5	Temperaturas de incubación	Control de temperaturas, verificación de termómetros
6	Condiciones de muestreo	Procedimientos de muestreo. Personal capacitado.
7	Medio de cultivo	Evaluación de los medios de cultivos, pH, esterilidad.
8	Equipo	Mantenimiento preventivo, calibraciones.
9	Contaminación cruzada	Procedimientos de limpieza I103, medidas de seguridad GP 07 Seguridad en el laboratorio.

Fuente: Datos experimentales

El laboratorio debe estar provisto con todos los componentes de los equipos para el muestreo, la medición y el ensayo requeridos para la ejecución correcta de los ensayos. Se estableció una identificación inequívoca para cada equipo utilizada en el área así como la frecuencia de calibración, mantenimiento interno, mantenimiento preventivo y manuales y registros asociados, así mismo se realizó la programación de mantenimiento anual del año 2013 - 2014. Ver tabla 6

Tabla 6. Identificación y descripción de equipo – Área de Biología Molecular

Nombre	Identificación	Manual	Calibración / Verificación	Mantenimiento
<b>Área Pre – PCR</b>				
<b>Termo bloque</b>	BM 309	NO	Anual	Limpieza
<b>Microcentrífuga</b>	BM 308	SI	---	Limpieza
<b>Vortex</b>	BM 312	NO	---	Limpieza
<b>Agitado magnético</b>	BM 307	NO	---	Limpieza
<b>Campana</b>	BM 306	SI	--	Limpieza
<b>Pipeta 1000 µL</b>	BM 314	SI	Anual	Limpieza
<b>200 µL</b>	BM 315	SI	Anual	Limpieza
<b>20 µL</b>	BM 316	SI	Anual	Limpieza
<b>10 µL</b>	BM 317	SI	Anual	Limpieza
<b>2.5 µL</b>	BM 318	SI	Anual	Limpieza
<b>Termómetro termobloque</b>	T BiolMol2	NO	Anual	---
<b>Post – PCR</b>				
Step One PCR en tiempo real SN 271001803	BM 301	SI	<b>Mensual</b> -Calibración fluorescencia base <b>1.5 años</b> Spatial calibration y dye calibration	1.5 años
Computadora Step One	BM 302	SI	Anual	Anual
Microcentrífuga	BM 310	SI	---	Limpieza
Vortex	BM 313		---	Limpieza
Impresora ABI	BM 319	NO	---	Limpieza
Luminómetro	BM 322	SI	Anual	Limpieza
Pipeta 1000 µL	BM 323	SI	Anual	Limpieza
100 µL	BM 324	SI	Anual	Limpieza
10 µL	BM 325	SI	Anual	Limpieza
<b>Compartidos</b>				
Refrigeradora	BC 220	NO	---	Limpieza
Termómetro	T BiolMol	NO	Anual	---
UPS	BM 326	SI	Anual	Limpieza

Fuente: Datos experimentales

Para evaluar la calibración de las pipetas y la precisión de pipeteo se realizaron 10 mediciones para la verificación de las pipetas automáticas en balanza analítica, para las pipetas del área de pre- PCR los resultados fueron los siguientes:

Tabla 7. Precisión de pipeteo – Área Pre- PCR

Pipeta	BM 314			BM 315			
	Volumen ( $\mu\text{L}$ )						
	100	500	1000	20	50	100	200
Media	0.097 E	0.4868	0.9816	0.0195	0.0487	0.0979	0.2009
DS	2.8 E-4	4.49E -3	5.9 E -4	2.4 E -4	1.1E-4	2.1E-4	1.64E-4
CV %	0.28	0.92	0.06	1.22	0.23	0.21	0.82

CV= Coeficiente de variación; DS = Desviación estándar

Fuente: datos experimentales

Tabla 8. Precisión de pipeteo – Área Pre- PCR

Pipeta	BM 316			BM 317			BM 318	
	Volumen ( $\mu\text{L}$ )							
	2	10	20	2	5	10	1.5	2.5
Media	0.0018	0.0098	0.0197	0.00186	0.00483	0.00950	0.0014	0.0024
DS	0.0000	0.0001	0.0002	0.00005	0.00012	0.00025	0.0000	0.0001
CV %	2.62	1.30	0.90	2.776	2.401	2.672	2.28	2.61

CV= Coeficiente de variación; DS = Desviación estándar

Fuente: datos experimentales

Tabla 9. Precisión de pipeteo – Área Post- PCR

Pipeta	BM 323			BM 324			BM 325		
	Volumen ( $\mu\text{L}$ )								
	1	5	10	10	50	100	100	500	1000
Media	0.0009	0.0049	0.0097	0.0098	0.0943	0.0987	0.1006	0.4943	0.9896
DS	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0043	0.0012	0.001	0.001	0.002
CV %	3.48	1.05	0.53	1.10	1.95	1.20	0.62	0.24	0.16

CV= Coeficiente de variación; DS = Desviación estándar

Fuente: datos experimentales

El laboratorio debe contar con procedimientos para el transporte, la recepción, el manejo, la protección, el almacenamiento, la conservación o la disposición final de los objetos a ensayar o a calibrar, incluidas todas las disposiciones necesarias para proteger la integridad del objeto a ensayar o a calibrar, así como los intereses del laboratorio y del cliente, estos procedimientos se detallan en el procedimiento GP 17 Fase Post Analítica e Informe de Resultados.

Los resultados de la participación en comparaciones inter laboratorios mostraron una concordancia de 100% en muestras con presencia y ausencia de *Salmonella entérica*.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

*Salmonella entérica* es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial. La vía principal a través de la que causa infección en los humanos son los alimentos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos rápidos y con alta sensibilidad para detectar contaminación por *Salmonella* en los alimentos es esencial. La dosis infectiva de *Salmonella* se encuentra en torno a 10<sup>6</sup> UFC (unidades formadoras de colonia), pero esta cifra varía dependiendo de las características concretas de las personas, del alimento implicado y de la cepa involucrada. Se sabe que una dosis de entre 1 a 10 células también puede causar enfermedad en los humanos.

Actualmente la detección de *Salmonella* en alimentos se realiza principalmente mediante técnicas de cultivo tradicional, pero éstas son lentas y laboriosas, y en ocasiones no son lo suficientemente rápidas para detectar posibles contaminaciones. Para el correcto control y regulación de los alimentos se requieren métodos sensibles y específicos para la detección de patógenos para monitorizar la producción animal primaria, las fábricas de producción alimentarias y los productos finales. Las técnicas moleculares permiten obtener los resultados en menos tiempo y con una alta sensibilidad. El uso de la PCR a tiempo real para detectar *Salmonella* de una manera específica en muestras de alimentos ha ido en aumento gracias a su rapidez y capacidad de utilización en el control de muestras contaminadas a lo largo de la cadena de producción alimentaria (Malorny B et al., 2004).

El acta de modernización de seguridad alimentaria de FDA “FSMA” promulgada en 2011, permite que laboratorios del país de origen de los alimentos, realicen los análisis correspondientes de seguridad alimentaria, siempre y cuando sean metodologías acreditadas internacionalmente. Así mismo, el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:0 Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos, establece el análisis de *Salmonella* sp. en la mayoría de productos para su comercialización en Centro América.

Teniendo en cuenta lo anteriormente señalado, el objetivo del presente trabajo fue la ampliación del alcance del sistema de gestión de calidad basado en la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 para la detección de *salmonella entérica* en agua y alimentos por PCR en tiempo real.

Según los requisitos de la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 el laboratorio debe asegurar la competencia del personal que realiza las pruebas de biología molecular, se tomo como referencia el manual de la EPA (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos) para el aseguramiento y control de la calidad en laboratorios de realizan análisis de PCR en muestras ambientales en el cual establece que el personal debe tener conocimientos teóricos y entrenamiento específico para dichas técnicas, así como una guía para el uso de material de protección. Para la aplicación de estos temas en el laboratorio se modificaron los documentos correspondientes al sistema de gestión GDO 06 anexo 6 descripción de puestos y GP 09 Entrenamiento de personal. Con la modificación de estos documentos se cumplieron los requisitos especificados en la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 y el la guía de aseguramiento y control de calidad de EPA.

El tiempo requerido para el entrenamiento del personal varía según el analista y la técnica, así que en el procedimiento no se especifica el tiempo de entrenamiento, y se enfatiza en las evaluaciones que deberá aprobar para poder trabajar las técnicas sin supervisión.

El GP 13 Aseguramiento de la calidad Anexo 3 se modificó para cumplir con los requisitos de condiciones ambientales y buenas prácticas de laboratorio, para lo que se utilizó de referencia del manual de la EPA para el aseguramiento y control de la calidad en laboratorios de realizan análisis de PCR en muestras ambientales. Se especifica que se deben tener batas de manga larga de uso exclusivo para cada área y guantes sin polvo de uso único. El cambio de batas y guantes reduce la probabilidad de la contaminación con ADN /ARN diana o amplicones. Los guantes deben ser cambiados después de la manipulación de muestras, amplicones o contacto con la piel, esto previene la introducción de enzimas prevalentes en la piel con DNasa y RNasas, que degrada los

ácido nucleicos. En las área donde no se cuente con campana de protección se deberá usar mascarilla para reducir el riesgo de contaminación con aerosoles con ácido nucleicos del analista.

La guía EPA recomienda que las batas de laboratorio sean lavadas regularmente para reducir la probabilidad de contaminación y que esta frecuencia se deberá establecer según la cantidad de trabajo que se maneje. Se estableció que el lavado de las batas será semanalmente ya que el volumen de trabajo es medio.

La norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 establece que el laboratorio debe asegurar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o afecten adversamente la calidad requerida de las mediciones. La alta sensibilidad de las técnicas moleculares requiere condiciones especiales. El laboratorio está diseñado y operado de manera que se previene la contaminación de las reacciones con productos de amplificación de ensayos previos y contaminación cruzada entre muestras los cuales pueden causar resultados falsos positivos.

La contaminación entre muestras y con productos de amplificación es una fuente potencial de resultados inválidos, por esto la separación es crítica. El laboratorio está dividido en áreas, preparación de reactivos, preparación de muestras y amplificación/detección de ADN /ARN. El flujo de trabajo es unidireccional para reducir la probabilidad de contaminación. No se intercambian los materiales y equipo entre las diferentes áreas. Todo material utilizado en área post PCR es descartado o lavado según instructivo de limpieza I 123.

El protocolo de trabajo está documentado como un procedimiento estándar e incluye los criterios de aceptación o rechazo de las corridas y las acciones a seguir en caso de rechazo.

La norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 establece como requisito que un método no normalizado debe ser validado, es decir contar con evidencia objetiva que se cumplen los requisitos para una utilización o aplicación específica. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. Para realizar la validación

se utilizaron diferentes metodologías, entre estos la comparación con resultados obtenidos con diferentes métodos, la evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado y la evaluación de la incertidumbre de los resultados basado en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

Los métodos utilizados para la comparación son “TaqMan® *Salmonella Detection Kit*” de Applied Biosystems el cual cuenta con certificación de AOAC, que utilizó ISO 6579 como método de referencia para la validación, así mismo, cuenta con la certificación “NF validation”; la cual utiliza la ISO 16140 para la validación de métodos alternativos, el kit fue comparado y encontrado equivalente al método de referencia ISO 6579. El segundo método es *Salmonella entérica* de Life River® el cual tiene certificación de la comunidad europea. El método de referencia ISO 6579 contempla como matriz todas las comidas y piensos. Ambos métodos utilizan las sondas TaqMan® como mecanismo de detección. Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos que hibridan específicamente con una zona del fragmento amplificado por los iniciadores.

En la práctica, cuando se aplican las técnicas de PCR al análisis de ácidos nucleicos en matrices complejas como los alimentos, la eficiencia de la amplificación puede reducirse significativamente por la presencia de sustancias inhibitoras como la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas o las proteínas. El Comité Europeo para la Estandarización (CEN) junto con la International Standard Organization (ISO) han creado una guía general para el uso de la PCR para la detección de patógenos alimentarios que indica expresamente la necesidad de utilizar controles internos de amplificación en las reacciones de PCR (Hoorfar J et al., 2004). Estas indicaciones se recogen en la norma ISO 22174:2005 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones” (ISO 22175:2005). Ambas PCR para la detección específica de *Salmonella entérica* contienen un control interno de amplificación.

Se realizaron estándares con diferentes concentraciones para determinar la sensibilidad y linealidad del método. La muestra conteniendo 75 UFC/ml trabajada con volumen final de 10µL mostro inhibición ya que tanto el control interno como la *Salmonella*

*entérica* no amplificaron, esto demuestra la importancia del control interno de amplificación. Las muestras con presencia de inhibidores deben tratarse, se puede trabajar con diluciones 1/10 y 1/100 de las extracciones de ADN de esas muestras y repetir la PCR utilizando las diluciones del ADN para eliminarlos, garantizando así el resultado. Se consiguió eliminar la inhibición y obtener resultados de detección positivos tras una dilución 1/10.

Las diferencias del Ct entre los diferentes métodos son debidas a que cada estandarización de los reactivos, cantidad de sal en la mezcla maestra, polimerasa etc. influyen en la emisión de fluorescencia, estudios realizados por Sohni, Y. y colaboradores (2008) hablan sobre el efecto que tiene sobre la sensibilidad de la PCR a tiempo real la composición y las concentraciones de los reactivos de la mezcla maestra, aparte de otros factores como los iniciadores, las sondas y la plataforma donde se realizan los análisis. Ambos reactivos fueron capaces de detectar la *Salmonella entérica* hasta en 1 UFC/ml en las condiciones según la validación del método.

La detección de células estresadas es más complicada que la detección de células en buen estado. La extracción de los ácidos nucleicos a partir de muestras de alimentos es un punto crítico para la utilización de métodos moleculares, se ve influenciada por el tipo de alimento que se procesa, ya que dependiendo de las características de éste (cantidad de grasa, azúcares, presencia de sangre, naturaleza física, etc) es el método de extracción a utilizar. Los objetivos de la preparación de la muestra son reducir las sustancias inhibitorias presentes en los alimentos que disminuyen la capacidad de amplificar el ADN, aumentar la concentración del microorganismo diana y disminuir la heterogeneidad de la muestra (Radström P et al., 2004). Además, teniendo en cuenta que normalmente la cantidad de células de *Salmonella* que se puede encontrar en los alimentos, en los alimentos para animales y en las muestras medioambientales es relativamente bajo (Malorny B et al., 2008) esos procesos previos a la extracción del ADN son esenciales.

Se verificó y completó la documentación correspondiente a los equipos utilizados cuando fue necesario, se revisó que todos los equipos tuvieran una identificación inequívoca del equipo y que contaran con el procedimiento para su uso, en caso de no hacerlos se elaboraron los documentos específicos. Se realizó la verificación de las

pipetas utilizadas en el área, todas las pipetas cumple con un coeficiente de variación menor de 5% para el pipeteo correcto de volúmenes bajos.

El laboratorio BIOLAB<sup>®</sup> es un laboratorio acreditado bajo la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005, por lo que ya cuenta con los procedimientos generales para la parte de gestión y procedimientos generales para el muestreo, transporte, manipulación, y almacenamiento de muestras; así como para el informe de resultados.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se amplió el alcance del sistema de gestión de calidad de BIOLAB, S.A. en base a la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 para *Salmonella entérica* por RT- PCR en aguas y alimentos.
2. Se evaluó el cumplimiento del sistema de gestión de calidad del laboratorio BIOLAB conforme a la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005, se encontró cumplimiento total del capítulo 4 requisitos relativos a la gestión y aspectos metodológicos generales.
3. Se revisaron los requisitos conforme la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 en cuanto los requisitos de personal, elaboraron los documentos específicos de competencia, capacitación y entrenamiento del personal que trabaja en el área de biología molecular.
4. Se realizaron las modificaciones a los documentos del sistema de gestión del laboratorio para asegurar que el personal que trabaja en el área cuenta con la competencia necesaria.
5. Se elaboraron los documentos específicos de instalaciones aplicables para el área de Biología molecular conforme a los requisitos a la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005 y requisitos de normas internacionales de laboratorios que trabajan las técnicas moleculares.
6. Se revisaron los documentos de equipo para incluir equipos utilizados en el análisis de *Salmonella entérica* por RT – PCR y se elaboraron los procedimientos de equipo correspondientes, se verificó la precisión de las pipetas utilizadas donde todas cumplieron con un coeficiente de variación menor al 5%.
7. Se realizó la verificación in situ del método de análisis de *Salmonella entérica* por RT – PCR en aguas y alimentos en el laboratorio BIOLAB, S.A. ® donde

se encontró que ambas metodologías probadas lograron la detección de 1 UFC/ml de *Salmonella entérica* siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

8. Se verificó el cumplimiento de los procedimientos de la fase post – analítica del laboratorio cumplieran con los requisitos de la norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025:2005.

## IX. RECOMENDACIONES

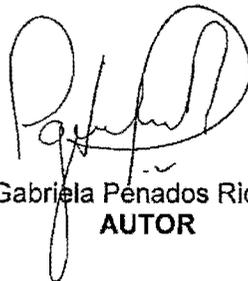
1. Cuando se planifica ampliar el alcance de acreditación se deberá evaluar el impacto de la acreditación en la oferta de servicios de la organización, para justificar dicha aplicación.
2. Cuando se planifica aumentar el alcance del sistema de gestión, se deben planificar auditorías internas en la programación anual, para asegurar el cumplimiento de las mismas.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

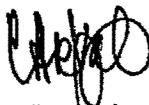
1. ISO 17025 : 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
2. ISO 22174:2005: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
3. Alicia Herrera Benavides, M. Q. (2010). *Salmonelosis enfermedad transmitida por alimentos*. Durango: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. .
4. C. Zini, M. N. (2010). *Guía para la evaluación de métodos cualitativos de amplificación y detección de ácidos nucleicos para diagnóstico molecular*. Córdoba.: Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP). Medina Allende y Haya de la Torre. Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad Universitaria.
5. CENAM. (2008). *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*. Mexico: CENAM.
6. Consejo para la información sobre la seguridad de los alimentos y nutrición. (11 de Julio de 2013). CISAN. Obtenido de <http://www.cisan.org.ar>
7. Crump, J. A. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82: 346-353.
8. Departamento de Seguros de Texas. (2008). *Hoja Informativa sobre las Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Texas: División de Compensación para Trabajadores (TDI, DWC).
9. Edna Yáñez, S. M. (2008). *Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería*, Córdoba. Asociación Colombiana de Infectología.
10. Espy, M., Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. C. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill III, and T. F. Smith. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1): 165-256.
11. F. W. Brenner, R. G. (2000). Salmonella Nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 2465–2467.

12. Gantois, I. R. (2009). Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4): 718-738.
13. Gisella Kopper, G. C. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico, Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Roma: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
14. Gonzalez Tania, R. R. (2005). *Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico*. Guadalajara: Unidad Surestedel Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica.
15. Hanna, S. E. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science*, 70(3): 49-53.
16. Hein, I., G. Flekna, M. Krassnig, and M. Wagner. 2006. Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods* 66: 538-547.
17. Hoorfar, J., P. Ahrens, and P. Radström. 2000. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of Salmonella entérica. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3429-3435.
18. Inda Marcela Figueroa Ochoa, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 25 - 42.
19. International laboratory accreditation cooperation. (2013). *Razones por las cuales debería obtenerse la acreditación de un laboratorio*. Obtenido de [https://www.ilac.org/documents/Bro\\_spanish/ES\\_why\\_become.pdf](https://www.ilac.org/documents/Bro_spanish/ES_why_become.pdf)
20. ISO 9001. (2008). COGUANOR NTG /ISO 9001:2008 Sistemas de gestión de la calidad Requisitos. ISO / IEC.
21. ISO 9001. (2008). COGUANOR NTG /ISO 9001:2008 Sistemas de gestión de la calidad Requisitos. ISO / IEC.
22. Iván Alberto Méndez, C. A. (2010). Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de santander.
23. Jasson, V. L. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 710-730.

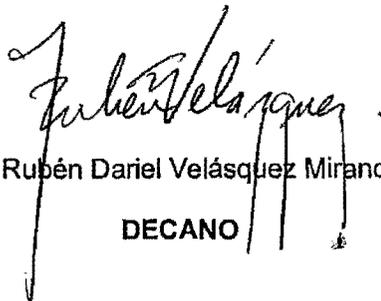
24. JL, S. (1994). Arthritis and Foodborne Bacteria. *Journal of Food Protection*, 935-941.
25. Malorny, B. P. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 39-48.
26. Manuel Fuentes, L. C. (2005). *Enfermedades transmitidas por los alimentos, definición e historia*. Organización Mundial de la Salud.
27. Martinez, I. (2011). *Desarrollo de métodos de detección de Salmonella basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias*. (Tesis de doctorado). País Vasco: Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.
28. Mónica Insunza B., A. S. (2008). Salmonelosis: una enfermedad que se transmite por los alimentos. *Tecnovet*. 112: 831
29. NGR/ISO/IEC 17025 . (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. ISO.
30. Patrick A.D. Grimont, F.-X. W. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. Francia: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur.
31. Pérez, C. M. (2008). Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de Salmonella entérica. *Arch Med Vet*, 235 - 242.
32. Public health Agency of Canada. (18 de Julio de 2013). Salmonella entérica spp. Pathogen safety data sheet - infectious substances. Obtenido de <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>
33. Radström, P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lövenklev, and C. Löfström. 2004. *Pre-PCR processing*. *Molecular Biotechnology* 26: 133-146.
34. Shneider, S. (2005). *Estudio de caso: Enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala*. Guatemala: FAO.
35. Vela., N. R. (2000). *Especificidad y sensibilidad de la PCR para detectar Salmonella spp. en cultivos puros y en alimentos*. Universidad Pública de Navarra.
36. Wilhelm, J. a. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 1120-1128.



Gabriela Penados Richter  
**AUTOR**



Dra. Carolina Arévalo Valdez  
**DIRECTORA**



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda  
**DECANO**