

Título	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE <i>Salmonella</i> spp. EN AGUA POTABLE Y AGUA DE MAR, BARRANQUILLA, 2014-2015.
Tipo de documento	Trabajo de investigación
Nivel	Pregrado
Año /Mes	Abril - 2016
Programa	Microbiología
Resumen	Los brotes transmitidos por el agua se consideran un problema mundial de salud pública, que afecta a millones de personas al año; estos están relacionados con la presencia de bacterias patógenas capaces de causar infección. Los métodos microbiológicos convencionales dificultan la identificación de estos microorganismos en el agua; sin embargo, a través de técnicas moleculares, como la PCR, se pueden obtener resultados rápidos y veraces debido a su alta especificidad y sensibilidad; siendo la variante en tiempo real mucho más sensible y específica que la PCR convencional. El objetivo de este trabajo fue validar el método de determinación cualitativa de <i>Salmonella</i> spp por PCR en tiempo real en agua potable y agua de mar, para ello se evaluaron en primera medida los protocolos de extracción de ADN orgánico y el uso de un kit comercial después de la realización de un pre enriquecimiento de las muestras; posteriormente, se determinaron los parámetros de validación como el límite de detección, la sensibilidad y la especificidad, para esto último se analizaron tanto por el método de PCR y por el método microbiológico muestras estériles inoculadas y sin inocular con <i>Salmonella</i> spp. Los resultados evidenciaron que es posible la obtención de ADN por ambos protocolos de extracción, obteniéndose mayor cantidad con el método de extracción orgánico pero mayor pureza con el uso del kit comercial. El límite de detección obtenido fue de 0.5 UFC/100 mL, la sensibilidad fue del 100%, la especificidad del 87% y la eficiencia del método del 96%. Estos resultados revelan la posibilidad de implementar protocolos de este tipo como una herramienta para evaluar la calidad del agua potable y marina.
Palabras Claves	<i>Salmonella</i> ; Real tiem PCR; Validation studies; Water.
Autores	Bertha Cristina Granados Pantoja Camila Andrea Pichón González
Tutores	Zamira Soto Varela David Rosado Porto
ISBN/ISSN	
Referencias Bibliográficas	1. Mendes Silva D, Dominguez L. On the track for an efficient detection of <i>Escherichia coli</i> in water: A review on PCR-based methods. <i>Ecotoxicology and environmental safety</i>. 2015; 113:400-411. 2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Guías para la calidad del agua potable [recurso electrónico]: incluye el primer apéndice. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición.2006. 3. Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Hofle M.G, Guzman C.A. Establishment of a Real-Time PCR-Based Approach for Accurate Quantification of Bacterial RNA Targets in Water, Using <i>Salmonella</i> as a Model Organism. <i>Applied and Environmental Microbiology</i>.2004; 70(6): 3618-3623. 4. ICONTEC. Guía Técnica Colombiana. GTC 84. Calidad de agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. Bogotá: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2003.

5. Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research* 2007; 41: 3517–38.
6. Ahmed W, Sawant S, Huygens F, Goonetilleke A, Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research* 2009; 43: 4918–28.
7. Gilbride K. Chapter Eight - Molecular Methods for the Detection of Waterborne Pathogens. *Waterborne Pathogens*. 2014: 231-290. 42
8. Girones R, Ferrús M.A, Alonso J.L, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, Abreu Corrêa A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*.2010; 44: 4325-4339.
9. García Feliz C. Salmonelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana [tesis doctoral]. León (España): Universidad de León.2011.
10. Melara Cruz S.L, Salazar Artiga B.G. Determinación de la multiresistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* sp aislada a partir de muestras de chorizos comercializados en mercados de Santa Tecla [tesis]. San Salvador (Salvador): Universidad de El Salvador. 2012.
11. Hernández Muñoz T.M. Estudio epidemiológico de la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* en pollos de importación de la isla de Tenerife. [tesis doctoral]. Santa Cruz de Tenerife (España): Universidad de la Laguna.1999.
12. Barakat S. M. Mahmoud. *Salmonella – a dangerous foodborne pathogen*. 1ª. Rijeka, Croatia: InTech; 2011.
13. Wray C.*Salmonella/* properties and occurrence En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2ª. Gran Bretaña: Academic Press; 2003. P 5074–5079.
14. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces). *ERS* 2002.pp 63. 43
15. Paucar Sánchez L.R, Tenecora Quito J.C. Determinación de *Salmonella* spp en materia prima cárnica de la empresa italimentos mediante la técnica visual inmunoensayo teca *Salmonella* via. [tesis]. Cuenca (Ecuador): Universidad de la Cuenca.2013.
16. Percival.S.L, Williams D.W. Chapter ten: *Salmonella* En: *Microbiology of waterborne diseases*.2ª.Gran Bretaña: Elsevier; 2004. p.209-222.
17. Ministerio de la Protección Social (MPS).Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA). Instituto Nacional de Salud (INS). Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas.2011.
18. Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*. 2008; 6(9):65-75.
19. Luque J, Herraiz A.Capítulo 15.2 Amplificación de la cadena in vitro del DNA: reacción en cadena de la polimerasa o PCR En: *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*.1ª .Madrid: Elsevier España; 2001:188-196.
20. Willey J,Sherwood L, Woolverton C.Prescott,Harley, and Klein's *Microbiology*.7a .Nueva York: Mc Graw Hill; 2008.
21. Tamay de dios L,Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*.2013; 2(2):70-78.

22. Aguilera P, Ruiz Tachiquín M, Rocha Munive M.R, Pineda Olvera B, Cháñez Cárdenas M.E. PCR en tiempo real En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1a .Mexico.D.F: SEMARNAT, INECC, UAM-I; 2014:175-201. 44
23. Levin R. Rapid Detection and Characterization of Foodborne Pathogens by Molecular Techniques. 1a .Florida: CRC Press; 2010.
24. Sambrook J, Russell D.W. Chapter 8: Invitro amplification of DNA by the Polimerase Chain Reaction. En: Molecular cloning: A laboratory manual. 3ª. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
25. Colombia. Ministerio de la protección social (MPS). Decreto 1575 de 2007, Mayo 9, por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Bogotá: El Ministerio; 2007.
26. Colombia. Ministerio de la protección social, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Resolución 2115 de 2007, Junio 22, por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano Bogotá: El Ministerio; 2007.
27. B. Prevost, B. Prevost, F.S. Lucas, Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. Water Research. 2016: 68-96.
28. Bartram J. y Rees G. Monitoring Bathing Waters-A practical Guide To the Design and Implementation of Assessments and Monitoring programmes. CRC Press. 2000.
29. Knap A, Dewailly E., Furgal C, Glvin J, Baden D., Bower R, Depledge M, Duguay L. Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. Environmental Health Perspectives. 2002; 110(9): 839.
30. Law R.J, Blake S. J, Spurrier CJ Butylin compounds in liver tissues of pelagic cetaceans stranded on the coast of England and Wales. Marine pollution bulletin. 2000; 38(12):1258-1261
30. Ruisánchez, I and Trullols E. (2007) validacion de metodos analiticos cuantitativos, Universidad Rovira I Virgili España.
31. A. Pulido I, Ruisánchez R, Boqué F.X. Rius. Analítica. Chim. Acta; 455 (2002)
32. Janjarasjitt N, Leukyai T., Suvarnakuta J. Study on Optimal Condition for *Salmonella* spp. Detection in Drinking Water by Polymerase Chain Reaction. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014.9.
33. Očepek M, Pate M, Kušar D, Hubad B, Avberšek J, Logar K, Lapanje A, Zrimec A. Comparison of DNA extraction methods to detect *Salmonella* spp. in tap water. Slov Vet Res. 2011; 48 (3/4): 93-98.
34. Blerk GN, Leibach L, Mabunda A, Chapman A, Louw D. "Rapid and specific detection of *Salmonella* in water samples using real-time PCR and High Resolution Melt (HRM) curve analysis.," Water Sci. Technol. 2011; 64 (12): 2453.
35. Hsu B.M, Huang K.H, Huang S.W, Tseng K.C, Su M.J, Lin W.C, Ji D.D, Shih F.C, Chen J.L, Kao P.M. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. Science of the Total Environment. 2011; 409(20):4435-4441.
36. Bonetta S, Borelli E, Bonetta S, Conio O, Palumbo, Carraro E. Development of a PCR protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface water. Environ Monit Assess 2011; 177:493-503.
37. Ahmed W, Hodgers L, Sidhu JP, Toze S. "Fecal indicators and zoonotic pathogens in household drinking water taps fed from rainwater tanks in Southeast Queensland, Australia," Appl. Environ. Microbiol. Jan 2012; 78 (1):219-226, 2012.

	38. Fan H, Wu Q, Kou X. Co-detection of five species of water-borne bacteria by multiplex PCR. Life Science Journal.2008;5(4). 46 39. Rani N, Vajpayee P, Bhatti S, Singh S, Shanker R, Gupta K.Quantification of <i>Salmonella Typhi</i> in water and sediments by molecular-beacon based qPCR. Ecotoxicology and environmental safety.2014.108: 58-64.
--	--