



## Detección y enumeración de *Salmonella sp.* en carne de llama (*Llama glama*) mediante qPCR

### Detection and enumeration of *Salmonella sp.* in llama meat (*Llama glama*) using qPCR

Miguel Alejandro Gómez-Castillo<sup>1,\*</sup>; Marcial Ibo Silva-Jaimes<sup>3</sup>; Bettit Salvá-Ruiz<sup>2</sup>; Carlos Elías-Peñañiel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Universidad s/n. La Molina, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios, Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. Av. La Universidad s/n. La Molina, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Departamento de Ingeniería de Alimentos y Productos Agropecuarios, Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. Av. La Universidad s/n. La Molina, Lima, Perú.

Received March 26, 2019. Accepted September 1, 2019.

#### Resumen

Esta investigación plantea una metodología para detectar y cuantificar en tiempo real la presencia de *Salmonella sp.* en carne de llama (*Llama glama*) empleando qPCR, el método se validó a través del recuento en placa. El método consistió en detectar la presencia o ausencia de *Salmonella sp.* en muestras de carnes de llama, los resultados positivos se identificaron mediante el sistema bioquímico acelerado RapID ONE, finalmente los resultados de la identificación se confirmaron por medio de la PCR en tiempo real, empleando un cebador delantero e inverso del gen *invA*, al igual que una sonda fluorescente anclada a un fragmento del gen *invA*. Finalmente, se cuantificaron 17 muestras de carne de llama, resultando que el 53,13% de las muestras estaba contaminado por *Salmonella sp.*

**Palabras clave:** *Salmonella sp.*; qPCR; llama; RapID ONE.

#### Abstract

This research proposes a methodology to detect and quantify in real time the presence of *Salmonella sp.* in llama meat (*Llama glama*) using qPCR, the method was validated through the plate count. The method consisted of detecting the presence or absence of *Salmonella sp.* in llama meat samples, the positive results were identified by the Rapid ONE accelerated biochemical system, finally the identification results were confirmed by real-time PCR, using a forward and reverse primer of the *invA* gene, as well as a fluorescent probe anchored to a fragment of the *invA* gene. Finally, 17 samples of llama meat were quantified, resulting in 53.13% of the samples being contaminated by *Salmonella sp.*

**Keywords:** *Salmonella sp.*; qPCR; llama; RapID ONE.

#### 1. Introducción

La llama (*Lama glama*), una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos (CSA), se encuentra localizada en la zona andina de Bolivia, Perú, Chile, Argentina y Ecuador, en altitudes entre 2800 y 5000 msnm (Mamani-Linares *et al.*, 2014; Campero, 2005). La llama está adaptada a zonas de forraje fibroso cuyos carbohidratos estructurales hacen difícil su digestión (Mamani-Linares *et al.*, 2014; Sumar, 2010) y tiene un gran potencial como fuente de

carne en el altiplano, produciendo carcasas más grandes que las de alpacas (*Lama pacos*) (Mamani-Linares *et al.*, 2014; Cristofanelli *et al.*, 2005).

La producción de carne es importante en la crianza de camélido, porque se trata de un alimento de alto valor nutritivo, además, de posibilitar la obtención de beneficios económicos comparables con el aporte de la fibra con un debido reordenamiento de la estructura de los rebaños y mejora del manejo y la sanidad (FAO, 2005).

#### How to cite this article:

Gómez-Castillo, M.A.; Silva-Jaimes, M.I.; Salvá-Ruiz, B.; Elías-Peñañiel, C. 2019. Detección y enumeración de *Salmonella sp.* en carne de llama (*Llama glama*) mediante qPCR. Scientia Agropecuaria 10(3): 403 – 411.

\* Corresponding author  
E-mail: [gomez\\_917@hotmail.com](mailto:gomez_917@hotmail.com) (M.A. Gómez-Castillo).

La mayor afluencia de alpacas y llamas a los mataderos ocurre en las zonas de mayor población de estos animales como Puno, Huancavelica, Apurímac y Cusco, en los que también hay mayor demanda de la población por estas carnes (FAO, 2005). No existen mataderos destinados exclusivamente al sacrificio de camélidos; se utilizan los mismos donde también se sacrifican otras especies, las condiciones higiénicas de los mataderos formales, aunque varían de un lugar a otro, son en general aceptables y cuentan con los servicios de inspección veterinaria. Por el contrario, el beneficio clandestino, fuera de los mataderos, se lleva a cabo en condiciones higiénicas poco adecuadas y carentes de control sanitario e inspección veterinaria, lo que constituye un medio de propagación de enfermedades (FAO, 2005). Por su valor nutricional podría crear pequeñas actividades agroindustriales logrando desarrollo y fomento, así como una mayor retribución económica y una diversificación de productos cárnicos para su consumo (Tellez, 1992). Este producto no ha logrado aún su valorización comercial. Por lo tanto, se pierde un apreciable volumen de su producción (Ayala, 1999).

La carne de llama tiene una composición nutritiva similar a la de otras especies domésticas; por lo tanto, es una importante fuente de proteínas y otros elementos esenciales como minerales y vitaminas (69,2 – 73,8% de humedad, 19,4 – 24,8% de proteína, 1,2 – 4,8% grasa, 1,2 – 1,7% de cenizas y 0.16% de colesterol), sus características organolépticas no difieren de la carne de otras especies (FAO, 2005). Su consumo es en la forma de carne fresca o procesada (carne deshidratada o embutidos), ambas formas se procesan de manera artesanal, siguiendo en muchos casos técnicas ancestrales (FAO, 2005). Así mismo, la carne de camélido es adecuada para el consumo humano, tanto por su composición química como desde el punto de vista de la calidad. La llama y la alpaca representan la más importante fuente de proteína para la población andina (Mamani-Linares et al., 2014; Pérez et al., 2000). Contienen alta biodisponibilidad de hierro y zinc (3,3 y 4,4 mg/100 g), siendo casi el doble que otras carnes rojas (Mamani-Linares et al., 2014; Polidori et al., 2007). Ambas especies producen carne con bajos niveles de grasa (0,49-2,05%) y colesterol (39,0-56,3 mg/100 g) comparada con otras carnes rojas (Mamani-Linares et al., 2014; Mamani-Linares et al., 2013). Se han señalado varios factores que limitan el mayor consumo de carne a mejores precios, como son:

rechazo por prejuicios socioculturales, alto decomiso por incidencia de Sarcocystosis, falta de normas técnicas de clasificación de carnes, falta de canales de comercialización adecuados, falta de canales adecuados y técnicas de beneficio, distorsión de precios por intermediación comercial (Godoy, 2006). Información científica sobre producción, calidad de carne y contenido nutricional es requerida por los ganaderos para promocionar la carne de llama en mercados locales e internacionales (Mamani-Linares et al., 2014). La caracterización microbiológica de la carne de llama es parte de la información científica que se requiere para poder regular los aspectos sanitarios que implican el beneficio de las llamas y de esta manera aportar a la mejora de su calidad higiénico-sanitaria.

Las carcasas pueden estar contaminadas durante el transporte o el sacrificio, lo cual puede ser fatal debido a la posibilidad de multiplicación de las células en la carne, lo que conlleva un alto riesgo para los consumidores, en consecuencia, para identificar los puntos críticos de contaminación y proporcionar a los modeladores de riesgo datos cuantitativos para cada cadena de procesamiento, se necesitan métodos rentables que también puedan enumerar niveles bajos de *Salmonella* (Malorny et al., 2008). En el Perú, entre el 2010 al 2012, se reportó 35 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos por año, de los cuales un 47% fueron salmonelosis según la Dirección General de Epidemiología (Soto, 2012). En nuestro país, los serotipos de *Salmonella* aislados en bacteriemia más prevalentes son *Enteritidis*, *Typhimurium* y *Typhi* (45, 36 y 11% respectivamente) (Parra y Rondón, 2018; Silva et al., 2017). *Salmonella* es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *S. enterica* subespecie *enterica* la que agrupa a la mayoría de los serotipos patogénicos para el humano. Los serotipos *S. Typhi* y *S. Paratyphi* son causantes de la fiebre entérica y son restringidos a humanos, y los serotipos no tifoideos (por ejemplo, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*), pueden colonizar el tracto gastrointestinal del humano y de muchos animales. (Parra y Rondón, 2018; Crump, 2016). Los serovares *Typhimurium* y *Enteritidis* son los más comunes dentro de la cadena alimentaria (Langridge et al., 2012). La mayoría de los programas de vigilancia de *Salmonella* se realizan mediante ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para una detección rápida y precisa (Resendiz-Nava et al., 2019; Kasturi y Drgon, 2017; Bell et al., 2016), existen otras

técnicas de identificación de *Salmonella* como la serotipificación por aglutinación, siguiendo el esquema de Kauffmann-White-Le Minor (KWL) (Gand et al., 2019; Grimont y Weill, 2007) y la técnica Multilocus sequence typing (MLST) (Gand et al., 2019; Achtman et al., 2012). A la fecha existen alrededor de 7000 investigaciones enfocadas en la detección de *Salmonella* (Resendiz-Nava et al., 2019), como la identificación del serotipo *S. Heidelberg* por qPCR (Zhai et al., 2019), la rápida detección de *Salmonella Typhimurium* directamente de muestras de alimentos sin previa incubación (Vinayaka et al., 2019) y en huevos (Nurjayadi et al., 2019), así como la completa identificación de *S. Paratyphi B dT-IdT+* (Gand et al., 2019), sin embargo, estudios enfocados a la cuantificación de este patógeno abordan la cuantificación por el Número Más Probable (NMP) como los realizados por Prasertsee et al. (2019) y Pavic et al. (2010) con resultados significativos, así mismo, sin embargo, las pruebas de NMP han sido criticadas por ser engorrosas, lentas y laboriosas, además, se considera propenso a errores cuando se trata de grandes conjuntos de muestras (Pavic et al., 2010), otros investigadores determinan la concentración del microorganismo empleando un estándar de comparación Mac Farland (Riyaz-UI-Hassan et al., 2013), o por densidad óptica evaluada por espectrofotometría (Templar et al., 2017). Debido a esto se realizó una cuantificación de *Salmonella sp.* por qPCR basada en curvas estándar utilizando como referencia recuentos en plate count agar, empleando carne de llama (*Lama glama*) proveniente de diferentes sistemas de alimentación, pastoreo en pradera natural (control), pastoreo en pradera natural + suplemento con heno de alfalfa (T1) y pastoreo en pradera natural + suplemento con heno de alfalfa + suplemento vitamínico (T2), aplicando un pre-enriquecimiento, aislamiento en TSI y LIA, detección con el sistema Rapid™ ONE, y cuantificación por qPCR de *Salmonella sp.* Con el fin de aportar en el desarrollo de los aspectos sanitarios que implican el beneficio de las llamas e impulsar la mejora de la calidad higiénica sanitaria de la carne de llama.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Muestras de carne de llama

Se trabajó con 32 muestras de carne de llama provenientes de llamas alimentadas con pastoreo natural (Control, n = 16), pastoreo natural con suplemento de alfalfa (T1, n = 8) y pastoreo natural con suplemento de alfalfa y vitaminas (T2, n = 8). Las llamas

fueron criadas en el distrito de Ninacaca, provincia de Pasco, departamento de Pasco. Estos animales experimentales fueron sacrificados en condiciones artesanales. Todas las muestras de carne de llama se analizaron en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias, ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina, las muestras fueron traídas en un camión frigorífico desde el distrito de Ninacaca, las cuales se muestrearon, etiquetaron, codificaron y almacenaron a -20 °C, para su posterior análisis.

### 2.2. Preparación de cultivo puro

Se trabajó con una cepa pura de *Salmonella typhimurium* proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, esta cepa pura se replicó en caldo tripticasa de soya a 37 °C por 24 horas, así mismo, se preparó y esterilizó una solución de glicerol al 50%, luego se mezclaron 500 µl de caldo cultivado con 500 µl de glicerol al 50% en un criovial de 2 ml, se mezcló suavemente y se almacenó a -40 °C, se elaboraron 10 crioviales.

### 2.3. Preparación de las muestras de carne

La detección de *Salmonella sp.*, se basó en la metodología del Manual Analítico Bacteriológico (BAM) (FDA/CFSAN, 2001). Se pesaron asépticamente 25 g de muestra en un Erlenmeyer estéril de 500 ml, se añadieron 225 ml de caldo lactosa estéril y mezclaron 2 min con un agitador magnético. Se transfirió asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha, tapón de rosca (500 ml) u otro recipiente apropiado, se dejó reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente, luego se ajustó el pH a 6,8 ± 0,2. Se desajustó la tapa del recipiente 1/4 de vuelta y se incubó la mezcla de muestra durante 24 ± 2 h a 35 °C.

### 2.4. Aislamiento de *Salmonella sp.*

Luego de la etapa de incubación, se cerró la tapa y se agitó suavemente la muestra incubada por menos de un minuto, luego se transfirió 0,1 ml de la mezcla a un tubo de ensayo con 10 ml de medio Rappaport-Vassiliadis (RV) estéril y 1ml de la mezcla a otro tubo de ensayo con 10ml de caldo tetratoato (TT) estéril. Debido a la sospecha de que las muestras contengan una alta carga microbiana, los tubos de medio RV se incubaron durante 24 ± 2 h a 42 ± 0,2 °C, mientras que los tubos de TT se incubaron a 24 ± 2 h a 43 ± 0,2 °C, la incubación de estos tubos se realizó en dos baños maría digitales.

**Tabla 1**

Cebadores y sondas fluorogénicas empleadas para la amplificación de una región de 102bp del gen *invA* de *Salmonella sp.*

Descripción	Secuencia	$T_m$ (°C)
invA-F (Cebador delantero)	5'-GCGTTCTGAACCTTTGGTAATAA-3'	57
invA-R (Cebador inverso)	5'-CGTTCGGGCAATTCGTTA-3'	57
Sal-P (Sonda)	5'-FAM-TGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCT-3'	63

\*FAM: 6-carboxifluoresceína

Pasada la etapa de incubación, se retiraron los tubos de los baños maría, se secaron con papel tisú y se homogenizaron suavemente con un vortex, luego con la ayuda de un asa de khole se recogió un volumen de caldo TT y se sembró por agotamiento en placas de agar bismuto sulfito (BS), agar lisina xilosa desoxicolato (XLD) y agar Hektoen Entérico (HE), lo mismo se realizó con un volumen de medio RV. Las placas se incubaron por  $24 \pm 2$  h a  $35^\circ\text{C}$ , finalizada la incubación se examinaron las colonias desarrolladas empleando el “*Salmonella* Flipbook” del Manual Analítico Bacteriológico (FDA/CFSAN, 2001). Se aislaron 5 colonias de cada placa tocando ligeramente el centro de la colonia con una aguja de inoculación estéril, se inoculó en agar TSI por picadura rayando el agar inclinado, sin flamear, se inoculó un tubo con agar LIA por picadura (2 veces) con una profundidad de 4 cm. Se almacenaron las placas de agar selectivas seleccionadas a  $5 - 8^\circ\text{C}$ . Los tubos de TSI y LIA fueron incubados a  $35^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h.

## 2.5. Cebadores y sondas usadas en la metodología qPCR – RT

Los cebadores y sondas (Tabla 1) empleados en esta investigación fueron diseñados a partir de lo reportado por Daum et al. (2002) y sintetizados por Bioneer Corporation (Daejeon, Corea).

## 2.6. Identificación de *Salmonella sp.*

Los cultivos aislados en los tubos de TSI y LIA fueron identificados mediante el sistema RapID™ ONE de Thermo Scientific – Remel y la metodología qPCR – RT.

### 2.6.1. Identificación bioquímica acelerada

Una muestra de las colonias aisladas en los tubos de TSI y LIA se sembró en placas de agar nutritivo durante 24 horas, luego se tomó una muestra suficiente y se inoculó en los pozillos del kit por 4 horas a  $35 - 37^\circ\text{C}$  (se siguió la metodología del kit del sistema RapID™ ONE de Thermo Scientific – Remel). Los resultados de color obtenidos se analizaron con el sistema de identificación estadístico ERIC de Remel.

### 2.6.2. Detección por PCR

Se extrajo ADN genómico de los aislamientos desarrollados en agar nutritivo, se empleó el Kit de Extracción de ADN AccuPrep® Genomic (K-3032) Bioneer. La identificación de *Salmonella sp.* fue realizada en el Sistema PCR – RT 9600Plus con un volumen total de reacción de  $25 \mu\text{l}$  conteniendo  $12,5 \mu\text{l}$  de AccuPower® Plus DualStar™ qPCR 2X Master Mix (Bioneer),  $500 \text{ nM}$  de cebador delantero e inverso (cada uno) y  $100 \text{ nM}$  de sonda. La sonda *invA* de *Salmonella* fue marcada con 6-carboxifluoresceína (colorante de reporte). Se empleó ADN de un cultivo puro de *Salmonella typhimurium* como control positivo. La programación de la PCR en tiempo real consistió 1 ciclo de activación del UDG a  $37^\circ\text{C}$  por 2 min, 1 ciclo de predesnaturalización a  $94^\circ\text{C}$  por 1 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a  $94^\circ\text{C}$  por 1 s y una alineación, extensión y detección a  $60^\circ\text{C}$  por 20 s.

### 2.7. Recuento en placa de *Salmonella sp.*

Un criovial se descongeló a temperatura ambiente, se tomó una alícuota de  $1000 \mu\text{l}$  con una micropipeta, la cual se sembró en  $9 \text{ ml}$  de caldo lactosa e incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h. El cultivo obtenido se empleó como solución madre, de la cual se hicieron diluciones decimales seriadas ( $10^1 - 10^8$ ) con agua peptonada, las diluciones fueron sembradas por extensión en placas de agar PC (plate count) por triplicado durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, se hizo un recuento en placa para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g). Esto mismo se aplicó en cada muestra que resultó positiva en la detección de *Salmonella sp.*

### 2.8. qPCR de *Salmonella sp.*

Las diluciones anteriormente preparadas se centrifugaron en tubos falcon de  $45 \text{ ml}$  a  $15000 \text{ RPM}$  por 5 min, al sedimento microbiano (pellet) obtenido de cada dilución se le extrajo ADN genómico con el Kit de Extracción de ADN AccuPrep® Genomic (K-3032) Bioneer, el ADN extraído se detectó mediante PCR, obteniéndose un umbral de amplificación (Ct) del ADN contenido en cada dilución.

Una curva estándar fue generada empleando las relaciones lineales entre la concentración de *Salmonella typhimurium* y el valor del umbral de amplificación. La validez del método se realizó con otra curva estándar obtenida a partir de ADN bacteriano extraído a partir de carne de llama contaminada artificialmente con *Salmonella typhimurium*.

**2.9. Análisis de datos**

Todos los datos fueron analizados por triplicado con el programa MINITAB 17. Los recuentos de patógenos se normalizaron por transformación a Log UFC/g.

**3. Resultados y discusión**

Un total de 32 muestras de carne de llama fue recolectado de una población de 32 llamas, de las cuales 16 tuvieron un régimen alimentario con pasto natural (control), 8 fueron alimentadas con pasto natural y alfalfa (T1), y 8 con pasto natural, alfalfa y vitaminas (T2). Estas llamas fueron criadas en el distrito de Ninacaca provincia de Pasco, departamento de Pasco.

De las muestras de carne de llama, control, T1 y T2 dieron positivo para la presencia de *Salmonella sp.*, de acuerdo a los resultados

que mostraron los agares selectivos (XLD, BS y HE) y los agares de aislamiento (TSI y LIA). En la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de identificación convencional (BAM/FDA), el sistema bioquímico acelerado RapID ONE, la identificación de muestras por PCR en tiempo real y, finalmente, la cuantificación de las UFC/g de *Salmonella sp.* Encontradas en las muestras que resultaron positivas en la prueba de identificación de *Salmonella sp.* en cada muestra.

En la **Tabla 2** se puede apreciar que un 62,5% de las muestras resultaron positivas para la presencia de *Salmonella sp.*, mientras que un 37,5% resultó con ausencia del patógeno. Así mismo, se encontró que el 55% de las muestras positivas evidenciaron el desarrollo de colonias típicas de *Salmonella sp.* mientras que el 45% fueron colonias atípicas, se pudo hacer esta diferencia por medio de la comparación de las colonias formadas en los agares selectivos Hektoen, XLD y BS, y de la coloración formada en los aislamientos de estas colonias con los agares inclinados de TSI y LIA, de acuerdo con lo descrito en el *Salmonella Flipbook (FDA/CFSAN, 2001)*.

**Tabla 2**

Muestras de carne de llama de diferentes tratamientos (control, T1 y T2) evaluadas para *Salmonella sp.* mediante el método convencional BAM/FDA, la prueba bioquímica acelerada RapID ONE y qPCR, además del número de UFC/g encontrado en las muestras positivas con el Qpcr

Tratamiento	Carcasa N°	Resultado de:				
		BAM/FDA	RapID ONE	PCR	qPCR	
					(Ct)	Log10 (UFC/g)
Control (pastoreo natural)	26	+(T)	+	+	24,37 ± 0,0802	3,03 ± 0,002
	1	+(T)	+	+	25,08 ± 0,0252	2,82 ± 0,007
	24	+(A)	-	-	-	-
	21	+(T)	+	+	23,54 ± 0,0153	3,27 ± 0,005
	13	+(A)	-	+	22,18 ± 0,0115	3,66 ± 0,004
	32	+(A)	-	+	25,36 ± 0,012	2,74 ± 0,007
	23	+(A)	-	+	21,39 ± 0,0115	3,89 ± 0,004
	27	+(T)	+	+	24,60 ± 0,0058	2,96 ± 0,002
	2	+(T)	+	+	22,94 ± 0,0173	3,45 ± 0,006
	10	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	17	+(A)	+/-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-
T1 (pastoreo natural con alfalfa)	19	+(T)	+	+	26,7 ± 0,0058	2,35 ± 0,002
	16	-	-	-	-	-
	31	-	-	-	-	-
	9	+(T)	+	+	25,89 ± 0,0115	2,58 ± 0,004
	7	-	-	-	-	-
	22	+(A)	+/-	+	26,47 ± 0,0173	2,42 ± 0,004
T2 (pastoreo natural con alfalfa y vitaminas)	15	+(A)	+/-	-	-	-
	29	+(T)	+	+	23,65 ± 0,0115	3,24 ± 0,004
	18	+(T)	+	+	25,92 ± 0,016	2,58 ± 0,004
	20	+(A)	+	+	26,59 ± 0,0351	2,38 ± 0,004
	5	+(A)	+	+	21,34 ± 0,0153	3,91 ± 0,005
	12	-	-	-	-	-
	30	+(T)	+	+	25,84 ± 0,0173	2,6 ± 0,006
	11	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	4	+(T)	+	+	22,15 ± 0,0265	3,67 ± 0,008

T: *Salmonella* típica; A, *Salmonella* atípica; +/-, resultado confuso; +, positivo; -, negativo; Ct, umbral de amplificación.

Los tubos de TSI y LIA sospechosos de la presencia de *Salmonella sp.* fueron evaluados mediante la prueba bioquímica acelerada para enterobacterias RapID™ ONE de Remel, el cual confirmó la presencia de *Salmonella sp.* en algunas muestras, mientras que en otras los resultados fueron confusos (+/-), esto se pudo observar en los resultados probabilísticos de la base de datos ERIC, estos resultados confusos fueron traslapes de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Shigella*, otro grupo de muestras evidenció una superposición de detección entre *Escherichia coli* y *Salmonella*. Debido a esto, todas las muestras que resultaron tanto positivas como confusas en la etapa de detección bioquímica, se definieron mediante la PCR en tiempo real, la cual confirmó mediante la amplificación del ADN genómico de *Salmonella sp.* de los cebadores (Tabla 1), confirmando que el 53,13% de las muestras de carne de llama (n = 32) estaban contaminadas con *Salmonella sp.* Luego de evidenciar estos resultados se procedió a cuantificar la presencia de *Salmonella sp.* empleando la metodología qPCR en tiempo real. La cuál consistió en dos etapas, la estandarización de una curva de cuantificación y la cuantificación de *Salmonella sp.* en las muestras de carne de llama.

#### Curva estándar de cuantificación

Las muestras confirmadas mediante la detección con la PCR fueron cuantificadas mediante una curva estándar, realizada con un cultivo puro de *Salmonella typhimurium*, el cual se incubó por 24 horas, se diluyó (1:9) en soluciones de agua peptonada ( $10^1 - 10^8$ ), la concentración de microorganismos en el cultivo puro se cuantificó mediante el recuento en placa con agar PC, a su vez, se determinó el umbral de amplificación (Ct) de cada dilución mediante la qPCR, esta etapa se repitió con carne de llama contaminada artificialmente. Los resultados obtenidos en el diseño de la curva estándar para la cuantificación de *Salmonella sp.* se presentan en la Figura 1, en la cual se puede observar la correlación entre los diferentes umbrales de amplificación de ADN con la serie de diluciones decimales empleadas, Malorny et al. (2008) menciona que el tiempo de recuperación de cualquier muestra debe ser tomado en cuenta antes del análisis en el PCR, por lo que es necesaria la realización de una curva estándar que correlacione los valores umbrales de amplificación (Ct) y la concentración del microorganismo en cada dilución empleada

que permita validar los resultados futuros de otras muestras que compartan una similitud en su composición, a su vez esto es apoyado por Malorny et al. (2008), Daum et al. (2002), Zhou et al. (2017), Riyaz-Ul-Hassan (2013), Siala et al. (2017), quienes emplearon esta metodología de trabajo como base de sus experimentos con *Salmonella sp.*

**Tabla 3**

Umbrales de amplificación de la dilución seriada de un cultivo puro de *Salmonella sp.* y una muestra de carne de llama contaminada artificialmente

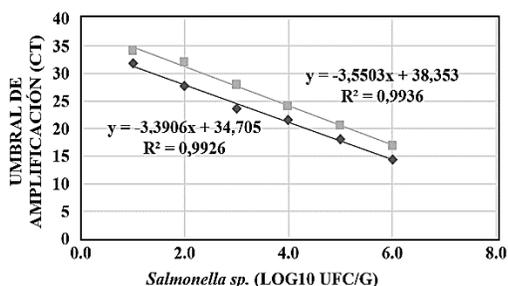
<i>Salmonella sp.</i> (Log10 UFC/g)	Umbral de amplificación	
	Cultivo puro (Ct <sub>p</sub> )	Contaminación artificial (Ct <sub>a</sub> )
6,00	16,87 ± 0,12	14,35 ± 0,05
5,00	20,56 ± 0,23	18,03 ± 0,15
4,00	24,03 ± 0,15	21,51 ± 0,21
3,00	28,01 ± 0,19	23,53 ± 0,13
2,00	32,07 ± 0,05	27,78 ± 0,23
1,00	34,02 ± 0,01	31,83 ± 0,17

Ct<sub>p</sub>, umbral de amplificación de cultivo puro.

Ct<sub>a</sub>, umbral de amplificación de contaminación artificial.

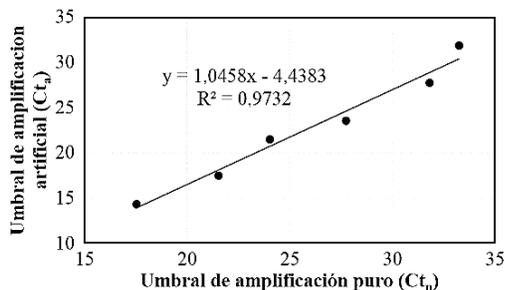
Los puntos graficados en la Figura 1 se pueden apreciar con detalle en la Tabla 3, en ambas se aprecia que las diluciones mínima y máxima empleadas fueron  $6,5 \times 10^1$  y  $6,5 \times 10^6$ . La curva estándar obtenida del cultivo puro de *Salmonella sp.* mostró una correlación lineal:  $R^2 = 0,9936$ , la curva estándar de carne contaminada artificialmente también evidenció una tendencia lineal con un  $R^2 = 0,9926$ . Ambas curvas estándar mostraron un límite de cuantificación y detección de  $6,5 \times 10^1$  UFC/g, el cual fue el número más bajo evaluado (Siala et al., 2017; Keer, 2008), el límite de detección determinado es cercano al hallado por Zhou et al. (2017), quien determinó un límite de detección de 100 UFC/ml para la cuantificación de *Salmonella sp.*, así mismo los límites de cuantificación (LC) mostrados por ambas curvas son menores que el hallado por Chen et al. (2019) (LC =  $10^3$  UFC/g). La curva estándar de cultivo puro presentó una diferencia promedio entre diluciones de 3,55 ciclos, mientras que la curva de contaminación artificial fue de 3,39 ciclos, Keer (2008) menciona que la pendiente de una curva estándar debe estar en el rango de 3,1 – 3,52 para ensayos que emplean sondas TaqMAN™ como es el caso de esta investigación, así mismo, el valor de la pendiente permite determinar la eficiencia de amplificación con la fórmula:  $\%E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) * 100\%$ , esto resulta en que la curva estándar de cultivo puro y contaminación artificial muestran una eficiencia de amplificación del 91,28 y 97,21%, respectivamente, las eficiencias de ambas curvas fueron

mayores que el determinado por Chen *et al.* (2019) ( $E = 85\%$ ), pero menores que la eficiencia determinada por Lopes *et al.* (2018) ( $E = 99,03\%$ ). Estos resultados validarían la capacidad de la curva estándar de contaminación artificial de estimar el Log (UFC/g) de *Salmonella*. La curva estándar de carne contaminada se estableció para determinar la factibilidad de este ensayo, por lo cual, se puede mencionar que esta investigación puede ser aplicada para detectar y cuantificar *Salmonella sp.* en carne de llama.



**Figura 1.** Amplificación de ADN extraído a partir de una serie de diluciones decimales inoculadas artificialmente en muestras de pulpa de carne de llama (\*) y de un cultivo puro de *Salmonella sp.* (■), partiendo de  $6,5 \times 10^6$  hasta  $6,5 \times 10^1$  UFC/g en las series de diluciones, empleando el qPCR.

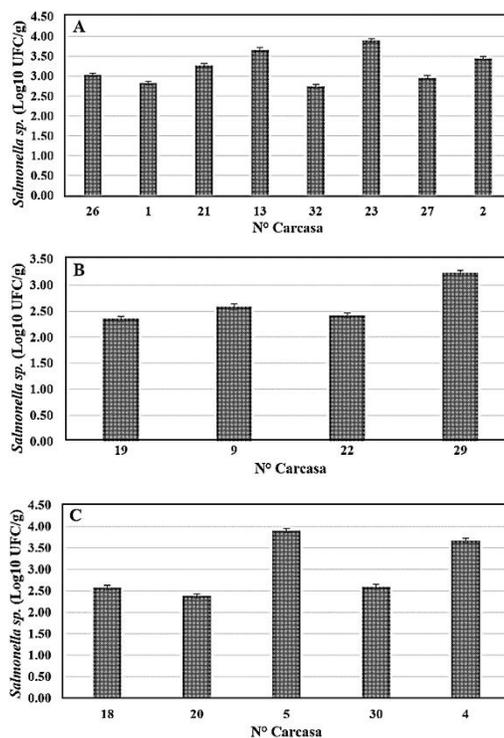
Luego de determinar los umbrales de amplificación de la dilución seriada de cultivo puro y una muestra de pulpa de carne de llama contaminada artificialmente, se procedió a validarlos, esto puede observarse en la Figura 2, en ella se aprecia que los umbrales de amplificación del cultivo puro y la contaminación artificial tienen una alta correlación al presentar un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9932, esto determinó que la curva estándar determinada con la pulpa de carne puede emplearse como un referente para cuantificar la cantidad de *Salmonella sp.* localizada en las muestras de carne de llama, pertenecientes al control, T1 y T2.



**Figura 2.** Correlación entre los umbrales de amplificación de las diluciones empleando un cultivo puro de *Salmonella sp.* ( $Ct_p$ ) y los de una contaminación artificial en pulpa de carne de llama ( $Ct_a$ ).

En la Figura 3 se puede apreciar el número de Log (UFC/g) de *Salmonella sp.* obtenidos

con la curva estándar de contaminación artificial, las muestras de carne provenientes de pasto natural, natural con alfalfa, y natural con alfalfa y vitaminas evidenciaron un  $3,2 \pm 0,4$ ,  $2,6 \pm 0,4$  y  $3,0 \pm 0,7$  Log (UFC/g) de *Salmonella sp.*, respectivamente. Los niveles de *Salmonella sp.* cuantificados variaron de 2,3 – 3,9 Log (UFC/g) de *Salmonella*, estos niveles fueron similares a los determinados por Chen *et al.* (2019), quien encontró niveles de *Salmonella sp.* en carne de res de 3 a 5,2 Log (UFC/g).



**Figura 3.** Enumeración de *Salmonella sp.* por qPCR en las muestras de llama A) Pasto natural B) Pasto natural con alfalfa C) Pasto natural con alfalfa y vitaminas.

Se determinó que no existen diferencias significativas respecto a los niveles de *Salmonella sp.* encontrados entre las muestras de carne provenientes de llamas alimentadas con pasto natural, pasto natural con alfalfa y pasto natural con alfalfa y vitaminas ( $p$ -valor  $> 0,05$ ). Además, se podría afirmar que el tipo de alimentación no afecta necesariamente a la población de *Salmonella sp.* encontrada luego del faenamiento, sin embargo, es necesario que se realice una cuantificación de la población de *Salmonella sp.* contenida en el tracto intestinal, con la finalidad de conocer si el tipo de alimentación tiene influencia directa en la población de *Salmonella sp.* ubicada en el interior del tracto intestinal, para poder hallar una

relación directa entre el tipo alimentación y la población del patógeno en cuestión. Estos resultados confirman que la curva estándar de contaminación artificial pudo detectar y cuantificar los niveles de *Salmonella sp.* en las muestras de carne de llama.

#### 4. Conclusiones

Se determinó una curva estándar de cultivo puro con una eficiencia de amplificación (%E) de 91,28% y una de contaminación artificial con una eficiencia del 97,21%, la curva estándar de contaminación artificial tuvo una mayor capacidad de predicción cuantitativa. El 53,13% de las muestras de carne de llama (n = 32) resultaron positivas para la presencia de *Salmonella sp.*, dentro de este porcentaje, el 55% estaba conformado por células de salmonela típicas y un 45% de atípicas. Las muestras con células de salmonela atípicas, dieron resultados confusos en la aplicación del sistema bioquímico acelerado Rapid ONE. La metodología qPCR confirmó la presencia o ausencia de células de salmonela, así como, la cuantificación de éstas en las muestras de carne de llama.

#### Agradecimientos

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato N° 129-PNICP-PIAP-2015 “Mejoramiento de la producción, calidad y procesamiento tecnológico de la carne de llama procedente de la sierra central del Perú”.

#### ORCID

M. Silva-Jaimes  <https://orcid.org/0000-0002-4648-4907>

B. Salvá-Ruiz  <https://orcid.org/0000-0001-5383-0890>

#### Referencias bibliográficas

- Achtman, M.; Wain, J.; Weill, F.-X.; Nair, S.; Zhou, Z.; Sangal, V.; Krauland, M.G.; Hale, J.L.; Harbottle, H.; Uesbeck, A.; Dougan, G.; Harrison, L.H.; Brisse, S.; the S. enterica MLST study group. 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. PLOS Pathogens 8(6): 1-19.
- Ayala, C. 1999. Estudio Detallado de la Ocurrencia de Sarcocystis en el altiplano boliviano. En: Progress in South American Camelids research, The European Association for Animal Production. Göttingen, Germany. P. 181-185.
- Bell, R.L.; Jarvis, K.G.; Ottesen, A.R.; McFarland, M.A.; Brown, E.W. 2016. Re-cent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective. Microb Biotechnol 9(3): 279-92.
- Campero, J. 2005. Lama (*Lama glama*) and guanaco (*Lama guanicoe*): general perspective. Proc ICAR/FAO Seminar ICAR. Technical Series 11: 11-18.
- Chen, Z.; Biswas, S.; Aminabadi, P.; Stackhouse, J.W.; Jay-Russell, M.T.; Pandey, P.K. 2019. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella spp.* in solid bovine manure in California using real-time quantitative PCR. Letters in Applied Microbiology 69(1): 23-29.
- Cristofanelli, S.; Antonini, A.; Torres, D.; Polidori, P.; Renieri, C. 2005. Carcass characteristics of Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. Small Rum Res 58: 219-222.
- Crump, J.A. 2016. Salmonella infections (including enteric fever). En: Goldman L, Schafer AI, editores. Goldman-Cecil Medicine. 25a Edición. Filadelfia: 1971-1975.
- Daum, L.T.; Barnes, W.J.; McAvin, J.C.; Neidert, M.S.; Cooper, L.A.; Huff, W.B.; Gaul, L.; Riggins, W.S.; Morris, S.; Salmen, A.; Lohman, K.L. 2002. Real-time PCR detection of salmonella in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr county, Texas. J. of clinical microbiology 40(8): 3050-2.
- FAO. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Disponible en: [http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia\\_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf](http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf).
- FDA/CFSAN. 2001. Bacteriological Analytical Manual online. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>
- Gand, M.; Mattheus, W.; Saltykova, A.; Roosens, N.; Dierick, K.; Marchal, K.; De Keersmaecker, S.C.J.; Bertrand, S. 2019. Development of a real-time PCR method for the genotyping of *Salmonella Paratyphi B* variant Java. Applied Microbiology and Biotechnology 103(12): 4987-4996.
- Grimont, P.; Weill, F.-X. 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur: 1-166.
- Godoy, R. 2006. Saneamiento y detoxificación de carne de llama (*Lama glama*) con *Sarcocystis aucheniae* mediante cocción, horneado, fritura y congelado. Tesis para optar el título profesional de médico veterinario. E.A.P de Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Kasturi, K.N.; Drgon, T. 2017. Real-time PCR method for detection of *Salmonella spp.* in environmental samples. Appl Environ Microbiol 83(14): 1-12.
- Keer, J.T. 2008. Quantitative Real-time PCR Analysis. Chapter 7. Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach. 132-166.
- Langridge, G.C.; Wain, J.; Nair, S. 2012. Invasive Salmonellosis in Humans. EcoSal Plus 5(1): 1-14.

- Lopes, A.T.; Albuquerque, G.R.; Maciel, B.M. 2018. Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Quantification of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in Different Food Matrices: Advantages and Disadvantages. BioMed research international: 1-12.
- Malorny, B.; Löfström, C.; Wagner, M.; Krämer, N.; Hoorfar, J. 2008. Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. Applied and environmental microbiology 74(5): 1299-304.
- Mamani-Linares, L.W.; Cayo, F.; Gallo, C.B. 2013. Calidad tecnológica de doce músculos de llama jóvenes (*Lama glama*) bajo un sistema de crianza extensiva. Rev Inv Vet Perú 24: 168-175.
- Mamani-Linares, L.W.; Cayo, F.; Gallo, C. 2014. Características de canal, calidad de carne y composición química de carne de llama: una revisión. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 25(2): 123-150.
- Nurjayadi, M.; Pertiwi, Y.P.; Islami, N.; Azizah, N.; Efrianti, U.R.; Saamia, V.; Wiranatha, I.M.; Nastassya, L.; El-Enshasye, H.A. 2019. Detection of the *Salmonella typhi* bacteria in contaminated egg using real-time PCR to develop rapid detection of food poisoning bacteria. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 20: 1-7.
- Parra, V.; Rondón, C. 2018. Factores relacionados con salmonelosis invasiva en un hospital de lima- Perú entre 2013-2017. Tesis de Bachiller en Medicina. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. Perú. 25 pp.
- Pavic, A.; Groves, P.J.; Bailey, G.; Cox, J.M. 2010. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. Journal of Applied Microbiology 109(1): 25-34.
- Pérez, P.; Maino, M.; Guzman, R.; Vaquero, C.; Kobrich, C.; Pokniak, J. 2000. Carcass characteristics of llamas (*Lama glama*) reared in central Chile. Small Rum Res 37: 93-97.
- Polidori, P.; Renieri, C.; Antonini, M.; Passamonti, P.; Pucciarelli, F. 2007. Meat fatty acid composition of llama (*Lama glama*) reared in the Andean highlands. Meat Sci 75: 356-358.
- Prasertsee, T.; Chokesajjawatee, N.; Santiyanont, P.; Chuammitri, P.; Deeudom, M.; Tadee, P.; Patchanee, P. 2019. Quantification and rep-PCR characterization of *Salmonella spp.* in retail meats and hospital patients in Northern Thailand. Zoonoses and Public Health 66(3): 301-309.
- Resendiz-Nava, C.; Esquivel-Hernandez, Y.; Alcaraz-Gonzalez, A.; Castaneda-Serrano, P.; Nava, G.M. 2019. PCR Assays Based on invA Gene Amplification are not Reliable for *Salmonella* Detection. Jundishapur Journal of Microbiology 12 (2): e68764.
- Riyaz-Ul-Hassan, S.; Verma, V.; Qazi, G.N. 2013. Real-time PCR-based rapid and culture-independent detection of *Salmonella* in dairy milk - addressing some core issues. Letters in Applied Microbiology 56(4): 275-282.
- Siala, M.; Barbana, A.; Smaoui, S.; Hachicha, S.; Marouane, C.; Kammoun, S.; Gdoura, R.; Messadi-Akrouf, F. 2017. Screening and detecting *Salmonella* in different food matrices in Southern Tunisia using a combined enrichment/real-time PCR method: correlation with conventional culture method. Frontiers in microbiology 8: 1-10.
- Silva, C.; Betancor, L.; García, C.; Astocondor, L.; Hinojosa, N.; Bisio, J.; Rivera, J.; Perezgasga, L.; Escanda, V.P.; Yim, L.; Jacobs, J.; Chabalgoity, J.A.; Portillo, F.G.; Puente, J.L. 2017. Characterization of *Salmonella enterica* isolates causing bacteremia in Lima, Peru, using multiple typing methods. PLoS ONE 12(12): e0189946.
- Soto, M.G. Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País. Lima: Ministerio de Salud, Dirección General de Epidemiología; 2012. 2 p. Reporte No.: 50.
- Sumar, J. 2010. Nutrition in camelids. In: Wittwer, F.; Chihuailaf, R.; Contreras, H.; Gallo, C.; Kruze, J., Lanuza, F., Letelier, C., Monti, G., Noro, M. (ed). Updates on ruminant production and medicine. XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile. Pp 343-357.
- Tellez, J. 1992. Tecnología e industrias cárnicas. 1ª ed. Tomo II. P. 360-376, 460-468. Ed. Acribia. Zaragoza
- Templar, A.; Schofield, D.M.; Nesbeth, D.N. 2017. Measuring *E. coli* and bacteriophage DNA in cell sonicates to evaluate the CAL1 reaction as a synthetic biology standard for qPCR. Biomolecular detection and quantification 11: 21-30.
- Vinayaka, A.C.; Ngo, T.A.; Kant, K.; Engelsmann, P.; Dave, V.P.; Shahbazi, M.A.; Wolff, A.; Bang, D.D. 2019. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. Biosensors and Bioelectronics 129: 224-230.
- Zhai, L.; Li, J.; Tao, T.; Lu, Z.; Lv, F.; Bie, X. 2019. Propidium monoazide real-time PCR amplification for viable *Salmonella* species and *Salmonella Heidelberg* in pork. Canadian Journal of Microbiology 65(7): 477-485.
- Zhou, B.; Liang, T.; Zhan, Z.; Liu, R.; Li, F.; Xu, H. 2017. Rapid and simultaneous quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in milk through multiplex real-time PCR. Journal of Dairy Science 100(11): 8804-8813.