



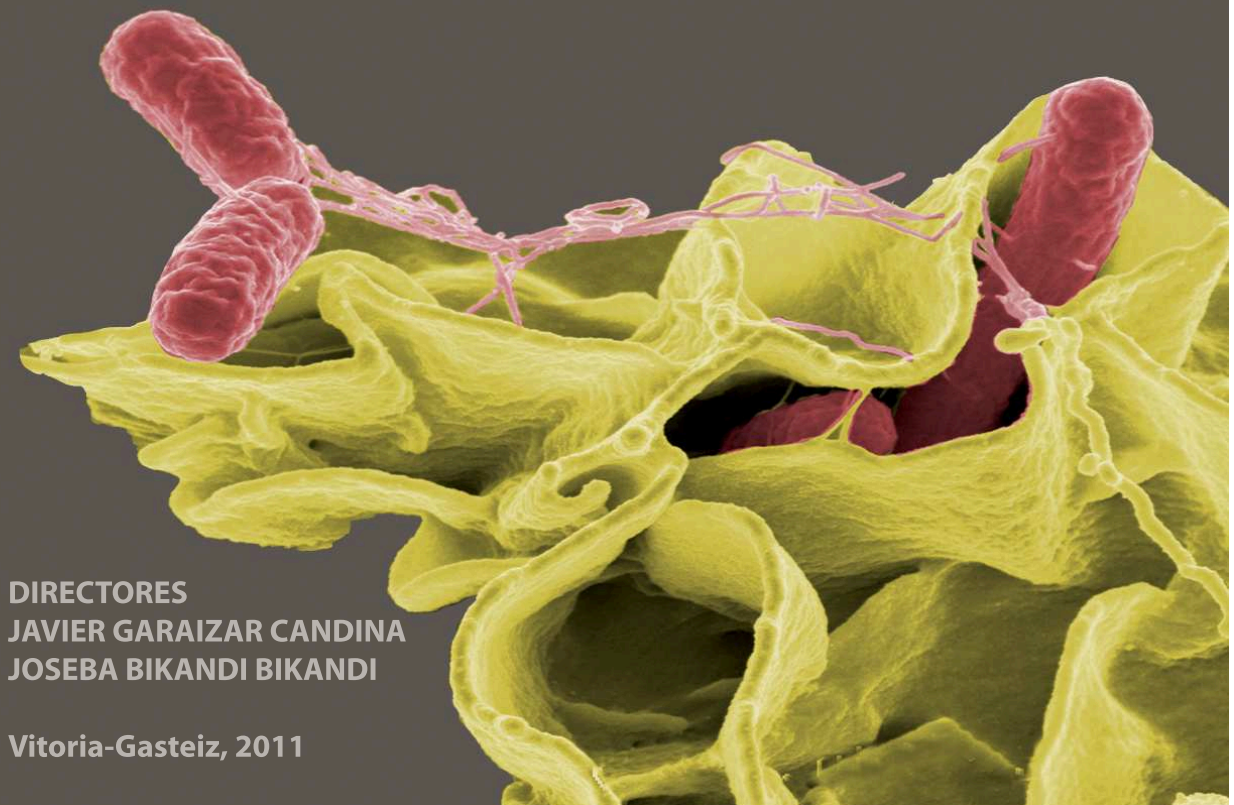
Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

## TESIS DOCTORAL

Desarrollo de métodos de detección de *Salmonella* basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias.

ILARGI MARTÍNEZ BALLESTEROS



DIRECTORES  
JAVIER GARAIZAR CANDINA  
JOSEBA BIKANDI BIKANDI

Vitoria-Gasteiz, 2011

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco    Euskal Herriko Unibertsitatea

## TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *SALMONELLA*  
BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SU  
VALIDACIÓN EN MUESTRAS ALIMENTARIAS.

ILARGI MARTÍNEZ BALLESTEROS

DIRECTORES:

Dr. JAVIER GARAIZAR CANDINA

Dr. JOSEBA BIKANDI BIKANDI

Vitoria-Gasteiz, 2011



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes Proyectos de Investigación:

1. Microbiología molecular: desarrollo de metodologías diagnósticas para bacterias y hongos basadas en el uso de herramientas bioinformáticas y técnicas moleculares. Grupos de Investigación Consolidados del Sistema Universitario Vasco financiado por el Gobierno Vasco: IT-343-10 (2010-2012).
2. Nuevas aproximaciones a la detección de patógenos mediante el uso de la genómica microbiana, la microbiología molecular y la inmunología. Convocatoria Saiotek 2009. Proyectos de Incubación Científico-Tecnológicos. UPV/EHU: S-PC09UN04 (2009-2011).
3. Subvención General a Grupo de Investigación de la UPV/EHU: GIU05/42 (2006-2008) y GIU08/20 (2009-2011).
4. Detección de *Salmonella* en alimentos de forma rápida y específica mediante técnicas genéticas. Acciones Destinadas a la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica de productos industriales en Álava. UPV/EHU-Dpto. de Educación, Universidades e Investigación de Gobierno Vasco: PFA07/07 (2008).
5. Contratos de I+D en Empresas: Contratos de I+D con Laboratorios Bromatológicos Araba S.A. para la realización de un método de detección de *Salmonella* en alimentos. (2002-2007).

Por otra parte, El Vicerrectorado de Investigación de la Universidad del País Vasco y el Vicerrectorado de Euskara de la Universidad del País Vasco, han financiado también este trabajo mediante la concesión de las siguientes becas:

1. Ayuda para la Formación de Personal Investigador en la Universidad de País Vasco. (Junio 2007-Mayo 2011).
2. Ayudas para fomentar la realización de tesis en euskara en la Universidad del País Vasco. (Octubre 2006-Mayo 2007).

Este trabajo ha sido objeto de la Patente nº P200801267: “Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* ssp.”, en la cual constan como Entidades Titulares la UPV/EHU y Laboratorios Bromatológicos Araba. (Abril 2008).

El trabajo incluido en la presente Tesis Doctoral ha sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:

- Martínez-Ballesteros, I., Santaolalla, I., Perez, F., Lopitz, F., Bikandi, J., Rementeria, A., Garaizar, J. Two real time PCR methods for *Salmonella* detection. 3rd ASM Conference on *Salmonella*: Biology, Pathogenesis and Prevention. Aix-en-Provence, France. 2009.
- Santaolalla, I., Perez, F., Martínez-Ballesteros, I., Lopitz, F., Bikandi, J., Rementeria, A., Garaizar, J. Detección de *Salmonella* mediante dos métodos de PCR a tiempo real. XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Córdoba. 2008.

A lo largo de todo este camino tanto de subidas como de bajadas, han sido muchas las personas que de un modo u otro han estado a mi lado. Quisiera agradecer a todas ellas el apoyo incondicional que me han ofrecido.

En primer lugar debo agradecer al Dr. Ramón Cisterna Cáncer, Director del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, el haber permitido realizar esta Tesis Doctoral en el Departamento.

A mis directores de Tesis, el Dr. Javier Garaizar Candina y el Dr. Joseba Bikandi Bikandi, por abrirme las puertas del laboratorio y dejarme vivir esta experiencia. Gracias por haber confiado en mí en todo momento, por ayudarme a sacar este trabajo adelante y apoyarme en todos los momentos. Javi, gracias por todos tus ánimos y esperanzas depositadas en mí. Joseba, mila esker zure laguntzogatik, bereziki ibilbide honen bukaeran. Ezinbestekoa izan zara lan guzti hau bukatu ahal izateko.

Quisiera dar las gracias a Isabel Santaolalla y Fernando Pérez de Laboratorios Bromatológicos Araba por su implicación en este proyecto. En parte gracias a su colaboración ha sido posible realizarlo. En especial quiero agradecer a Isabel el haberme ofrecido sus conocimientos y su ayuda.

También quisiera agradecer al Dr. Salvatore Rubino la oportunidad para visitar su laboratorio en Sassari, Cerdeña. Aunque el trabajo realizado allí finalmente no haya sido incluido en esta Tesis Doctoral, el periodo discurrido allí me sirvió gratamente para ampliar mis conocimientos sobre *Salmonella*, pero sobre todo como superación personal. Gracias a Guistina Casu por ayudarme con todo y a la Dra. Bianca Paglietti por su ayuda y paciencia con el idioma. Pero sobre todo gracias a Davide y a Speranza por hacerme sonreír y pasar conmigo tan buenos ratos.

Durante estos años he coincidido con muchas personas en el Departamento. A todas ellas: muchas gracias! Por mi grupo de investigación también han sido muchas las personas con las que he compartido muy buenos ratos, y el cariño y apoyo recibido de ellos siempre estará presente en mí. Pero sobre todo tengo que agradecerle a Lorena el haber recorrido conmigo todo este camino. Gracias por tu ayuda, por motivarme y animarme en todo momento.

## *Agradecimientos*

---

A todos mis compis del Departamento: Raúl, María, Toño, Maialen, Andrea, Irati, Ceci, Héctor, Andoni. Nunca me podría imaginar todo esto sin que hubierais estado allí. Los buenos momentos que he pasado junto a vosotros me hacen olvidar los malos, y eso es lo más importante que me habéis podido dar. Raúl, menos mal que estabas ahí (sino creo que seguiría calculando las diluciones), gracias de verdad por toda tu ayuda.

No puedo olvidarme del Dr. Fernando Lopitz y darle también las gracias porque él fue quien comenzó todo esto, el que me inició en el proyecto y me enseñó la base de todo.

A toda mi kuadrilla. Gracias por preguntar, por escuchar, por animar, por volverme un poco más optimista, por darle la vuelta a las sensaciones y hacerme ver que todo es más fácil de lo que parece. Aun no dándoos cuenta siempre habéis estado ahí.

A la kuadrilla de Maide. Por el interés que han mostrado todos ellos, por preguntar cómo estás, cómo lo llevas y darme siempre ánimos.

Y tranquilos, que esto lo celebramos!!!

A Jon, por aportar el toque artístico a la Tesis.

A Ianire, porque aunque de lejos, siempre has mostrado tu interés y me has apoyado. Sé que siempre estarás ahí.

A toda mi familia. Es tan difícil expresar todo lo que os debo que lo único que puedo decir es gracias a todos de corazón! A mi ama, a la mima, a mi aita, a Maika, a Irene, a mi abuelo: esta tesis es tanto mía como vuestra porque cada uno habéis aportado vuestro granito de arena. Gracias por confiar en todo momento en mí y apoyarme en todas mis decisiones. A todos mis ti@s: por vuestro interés, apoyo y preocupaciones. A mi abuela: porque toda mi vida he recibido de ti tu apoyo, tus consejos, tus ánimos. Porque siempre has depositado en mí toda tu confianza. Por eso ahora es el momento de agradecértelo. Porque tú me has hecho como soy.

A Alfredo, Mari Cruz y Lur, porque también habéis estado ahí, interesándoos por mí en todo momento.

Y por supuesto a Maide. Si hay una persona a la que tengo que agradecerle todo, esa eres tú. Ha sido un viaje largo que hemos recorrido entre los dos, y tú siempre has estado a mi lado. Gracias por no fallarme. Gracias por ser como eres. Gracias por todo.

Mila esker guztio!!!





*A mi Abuela*



*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*



## **“Desarrollo de métodos de detección de *Salmonella* basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en alimentos”**

### **RESUMEN**

*Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial y causante de enfermedades gastroentéricas en humanos y animales. La presencia de *Salmonella* en un alimento, sea en la cantidad que sea, se considera peligroso y por lo tanto no será apto para el consumo humano. Por ello, los controles microbiológicos rutinarios en la cadena alimentaria son de vital importancia para no comprometer la salud del consumidor. Los controles se deben realizar a lo largo de todo el proceso de elaboración del alimento, es decir, controlando desde las condiciones implantadas en la granja hasta la calidad del producto final que llegará al consumidor. Tradicionalmente los métodos microbiológicos empleados para detectar patógenos en los alimentos han sido métodos basados en el cultivo. El método tradicional de detección de *Salmonella* comprende cuatro fases: una primera fase de preenriquecimiento no selectivo, una segunda fase de enriquecimiento selectivo, un paso adicional de aislamiento en medios sólidos selectivos, y una última fase de confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Estos procesos tradicionales de cultivo son laboriosos y alargan la obtención de los resultados hasta una semana.

Las técnicas moleculares han sido un gran avance de las cuales la microbiología se ha beneficiado para desarrollar métodos nuevos de detección de patógenos. Entre ellas, las técnicas basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) proporcionan una estrategia rápida y sensible para la detección de patógenos. Además, la mejora que ha supuesto la PCR a tiempo real permite obtener los resultados incluso en menos tiempo y evitar el procesado post-PCR que puede provocar contaminación cruzada debido a la manipulación de las muestras.

En todo caso, para el desarrollo de métodos basados en PCR es esencial la elección de una diana genética adecuada a cada patógeno que permita diseñar técnicas totalmente específicas de la bacteria que se quiera detectar en cada caso.

El objetivo principal de este trabajo fue crear métodos de detección de *Salmonella* basados en la PCR que facilitasen y disminuyesen el tiempo requerido para la obtención de los resultados. Para ello se cumplieron las siguientes etapas: i) elección de una diana genética específica de *Salmonella*, ii) desarrollo de una PCR para el diagnóstico de *Salmonella*, iii) desarrollo de sistemas de PCR a tiempo real para detección de *Salmonella*, iv) validación de los métodos de PCR a tiempo real diseñados frente al método tradicional de detección de *Salmonella* en muestras de alimentos.

En primer lugar se estudiaron diferentes genes propuestos por diversos autores como dianas genéticas de *Salmonella*. Tras realizar diversas reacciones de PCR con las parejas de iniciadores correspondientes, se estableció que el gen más adecuado para utilizar como diana genética de *Salmonella* en métodos de PCR era el gen *invA*. La proteína codificada por este gen pertenece a un sistema de secreción totalmente necesario para causar la invasión bacteriana de las células epiteliales del intestino. Al ser un gen involucrado con la virulencia de *Salmonella*, presuntivamente estará en todos los aislamientos de *Salmonella*, o por lo menos, en todas las cepas virulentas.

Una vez elegido el gen *invA* como diana genética específica de *Salmonella* se diseñó una PCR, utilizando los mismos iniciadores descritos anteriormente por Rahn K y colaboradores (1992), a la cual se añadió un control interno de amplificación diseñado específicamente en este trabajo. La incorporación de controles internos de amplificación a los métodos de PCR es esencial para detectar posibles inhibiciones en las reacciones de PCR, causadas principalmente por componentes presentes en los alimentos. Las 40 cepas de *Salmonella* analizadas mediante esta PCR mostraron un resultado positivo para la amplificación del gen *invA*, mientras que todos los aislamientos analizados de microorganismos relacionados con esa bacteria fueron negativos.

Con la intención de disminuir aun más los tiempos de obtención de resultados, se decidió adaptar esa PCR a un formato de PCR a tiempo real. Existen diferentes sistemas de detección utilizados en PCR a tiempo real. En este trabajo se eligió diseñar por un lado una PCR utilizando sondas TaqMan® como sistema de detección, y por otro lado una PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I. En la PCR a tiempo real con SYBR Green I los iniciadores utilizados fueron los mismos

que para la PCR convencional, pero se diseñó un nuevo control interno adecuado para la PCR a tiempo real. Sin embargo, para la PCR a tiempo real con sonda se diseñaron unos nuevos iniciadores y una sonda que hibridase específicamente con el fragmento amplificado por esos iniciadores, además de un nuevo control interno que fuese detectado mediante otra sonda adicional marcada con un fluoróforo diferente. La especificidad de ambas reacciones de PCR a tiempo real fue probada tanto de forma teórica mediante programas informáticos como de manera experimental. La tecnología con sondas TaqMan® resultó ser más sensible que la tecnología SYBR Green I en este estudio, aunque por otro lado, la ausencia de reacción de la sonda con una de las cepas de *Salmonella* analizadas indicó que esa tecnología era a su vez menos específica que el SYBR Green I.

Los métodos de PCR a tiempo real fueron comparados frente al método tradicional de detección de *Salmonella* en diferentes muestras de alimentos. Para realizar esta validación se siguió lo descrito en la norma ISO 16140:2003. Se calcularon tanto la inclusividad y exclusividad de los métodos, así como la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de los métodos moleculares, y también el nivel de detección relativa de éstos. En la PCR a tiempo real con sonda TaqMan® se utilizaron dos *master mix* comerciales diferentes (una *master mix* de Takara y otra de Applied Biosystems) con el fin de analizar también la influencia que ejerce la *master mix* empleada en los resultados. Para el cálculo de la inclusividad se utilizaron 50 aislamientos diferentes de *Salmonella* según lo indicado en la citada norma ISO, obteniendo para todos ellos un resultado positivo para la detección del gen *invA*. Para el test de exclusividad se analizaron 30 cepas de microorganismos relacionados con *Salmonella*, los cuales mostraron un resultado negativo en las reacciones de amplificación. Para el cálculo de la eficacia, especificidad y sensibilidad relativas se utilizaron 309 muestras de alimentos diferentes según las categorías alimentarias descrita en la norma ISO. Para obtener una amplia variedad de resultados positivos y negativos, aproximadamente la mitad de esas 309 muestras de alimentos fueron contaminadas artificialmente con *Salmonella*. Se obtuvieron unos valores comprendidos entre 80%-100%, excepto en la sensibilidad relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems que fue del 62,4%. Los niveles de detección relativa se calcularon según lo descrito en la



norma ISO para cinco alimentos diferentes (uno de cada categoría alimentaria), utilizando para cada alimento 5 o 6 niveles de contaminación. Los resultados obtenidos abarcaron un rango de 0,1-10 células/25gr de alimento. Excepto en la PCR a tiempo real con sonda en la cual el límite de detección en muestras de pescado fue de alrededor de 100 células/25gr.

A lo largo de todo el análisis realizado en alimentos se identificaron diferentes etapas que se consideraron críticas a la hora de emplear métodos moleculares para la detección de patógenos en alimentos. Uno de los principales problemas surgidos fue la influencia que ejercía la composición del alimento a lo largo de todo el proceso. Los mayores problemas se detectaron en los alimentos con un alto contenido en grasa, dado que la grasa influye notablemente en la capacidad de detección de los métodos moleculares. Otro de los puntos críticos fue el método de extracción de ADN, que puede influir en la concentración del ADN recuperado y en su calidad. Por todo ello, y al no existir un protocolo universal de procesamiento de las muestras previo a las reacciones de PCR, se debe optimizar cada método de análisis teniendo en cuenta el alimento que se debe analizar y el patógeno que se quiere detectar, y amoldarlo a las circunstancias especiales de cada laboratorio.

## **“Polimerasaren kate-erreakzioan oinarritutako *Salmonella*-ren detekzioarako metodoen garapena eta baliozkotzea elikagaietan”**

### **LABURPENA**

*Salmonella*, mundu mailan elikagaien bidez transmititu daitekeen bakterio garrantzitsuenetakoa da, eta gaixotasun gastroenterikoen eragilea da gizaki eta animalietan. Bere presentzia elikagaietan, edukiarekiko independenteki, arriskutsua kontsideratzen da, eta beraz, giza kontsumorako ez egokia. Horregatik, kontsumitzaileen osasuna ziurtatzeko, elikagai-katean zehar ohiko kontrolak beharrezkoak izaten dira. Kontrol horiek elikagaiaren ekoizpen-prozesu osoan zehar beharrezkoak izaten dira, hots, lehengaien manipulazio eta tratamendutik hasi eta kontsumitzaileera heltzen den azken produktuaren kalitatea aztertu beharko da. Elikagaietan patogenoak detektatzeko ohiko metodoak kultiboetan oinarritutakoak izan dira. *Salmonella* detektatzeko metodo tradizionala lau fasez osatuta dago: lehen aberaste-fasea hazkuntza-medio ez-hautakorrean, bigarren aberaste-fasea hazkuntza-medio hautakorrean, ondoren egiten den isolatzea hazkuntza-medio solido eta hautakorrean, eta azkenik, konfirmazioa proba biokimiko eta serologikoen bidez. Dena den, hazkuntzan oinarritutako metodo tradizional horiek neketsuak dira eta emaitzen lorpena gutxienez aste bat luzatzen da.

Mikrobiologia teknika molekularrek izandako aurrerapenez baliatu da patogenoak detektatzeko metodo berrien garapena sustatzeko. Garatutako teknika guztien artean, azido nukleikoen amplifikazioan oinarritzen diren metodoak, hala nola PCRa (polimerasaren kate-erreakzioa), patogenoen detekzioa burutzeko estrategia azkar eta sentikorra bihurtu da. Bestalde, teknikaren hobekuntza izan den denbora errealeko PCRa, emaitzen lorpen-denborak are gehiago murriztu ditu. Denbora errealeko PCRan, PCR tradizionalaren ondoren emaitzak aztertzeko bete behar diren urratsak eliminatzen ditu, eta ondorioz, pausu horietan gerta daitezkeen laginen arteko kutsadurak ekiditen dira.

PCRan oinarritzen diren metodoen diseinurako patogeno bakoitzarentzat itu genetiko aproposena aukeratzea funtsezkoa da, horrek ahalbidetzen baitu

detektatu nahi den bakteriarentzako ahal bezain tekniarik espezifikoenak garatzea.

Ikerketa lan honen helburua emaitzen lorpena erraztu eta denbora murriztuko lukeen PCR teknikan oinarritutako *Salmonella* detektatzeko metodo berriak garatzea zen. Helburu nagusi hori burutzeko hurrengo urratsak bete ziren: i) *Salmonella* bakterioaren espezifikoa den itu genetiko bat aukeratzea, ii) *Salmonellaren* diagnosia burutzeko PCR metodo baten garapena, iii) *Salmonella* detektatzeko denbora errealeko PCR baten garapena, iv) diseinatutako denbora errealeko PCRen konparazioa *Salmonella* detektatzeko metodo tradizionalarekin elikagai desberdinetan (metodoaren baliozkotzea).

*Salmonella* detektatzeko itu genetiko egokiena aukeratzeko, zenbait ikertzaileek proposatutako geneak ikertu ziren. Gene horientzako deskribatuta zeuden hasle bikoteak erabiliz, PCR erreakzio desberdinak egin ziren, eta *invA* genea *Salmonellaren* detekzioa bideratzeko itu genetiko egokiena zela zehaztu zen. Gene hau kodetzen duen proteina jariatze-sistema baten partaide da, heste epitelioko zelulen inbasioa bideratzeko guztiz beharrezkoa den jariatze-sistemaren osagaia hain zuzen ere. *Salmonella* bakterioaren birulentziarekin erlazionatutako genea izateagatik, *invA* genea *Salmonella* andui guztietan egotea espero da, edo gutxienez andui birulento guztietan.

*Salmonellaren* diagnosirako itu genetiko espezifikoa bezala *invA* aukeratu ondoren, PCR bat diseinatu zen. PCR horretan aurretik deskribatutako hasle bikote bat erabili zen (Rahn K *et al.*, 1992), baina PCR erreakzio horri ikerketa lan honetan diseinatutako amplifikazioaren barne-kontrol bat gehitu zitzaion. PCRan oinarritutako metodo guztietan amplifikazioaren barne-kontrola gehitzea ezinbestekoa da, barne-kontrol horien bidez PCR erreakzioetan gerta daitezken inhibizioak detektatu daitezkelako. PCRaren inhibizioak batez ere elikagaietan aurkitzen diren osagaiak eragiten dituzte. Diseinatutako PCRaren bidez 40 *Salmonella* andui desberdin aztertu ziren, eta denetan *invA* genearen amplifikazio positiboa lortu zen. Bakteria horrekin erlazionatutako beste mikroorganismo desberdin batzuk ere aztertu ziren, baina denetan amplifikazioaren emaitza negatibo izan zen.

Emaitzen lorpen-denbora gutxitzeko helburuarekin, PCR hori denbora errealeko PCR batean bihurtzea proposatu zen. Denbora errealeko PCRak egiteko hainbat detekzio sistema deskribatu dira. Lan honetan bi detekzio sistema aukeratu ziren denbora errealeko bi metodo desberdin garatzeko: alde batetik, TaqMan® zundetako oinarritutako metodoa diseinatu zen, eta bestalde, SYBR Green I molekula fluoreszentean oinarritutako. SYBR Green I molekularen oinarritutako denbora errealeko PCRrako, PCR konbentzionalen erabilitako hasle bikote berdina aukeratu zen. Dena den, metodo horrentzako amplifikazioaren barne-kontrol berria diseinatu zen. Zunda bidezko denbora errealeko PCRrako hasle bikote berria eta hauek amplifikatutako zatirekin espezifikoki hibridatzen zuen zunda ere diseinatu ziren. PCR erreakzio horretarako ere amplifikazioaren barne-kontrol berri bat diseinatu zen, fluoroforo desberdin batez markatutako zunda espezifikoki batekin detekta zitekeena. Diseinatutako bi PCR berri horien espezifikitatea teorikoki egiaztatu zen programa informatikoen bidez, eta baita modu esperimentalean laborategian. Lan honetan TaqMan® zunden teknologia SYBR Green I baino sentikorragoa izan zen, baina ordea, *Salmonella* andui batekin zundak izandako erreakzio gabeziaren ondorioz, SYBR Green I teknologia espezifikoa izan zen.

Diseinatutako denbora errealeko PCR metodo biak konparatu egin ziren *Salmonella* detektatzeko metodo tradizionalarekin zenbait elikagai laginetan. Metodoa baliozkotzeko ISO 16140:2003 arauan adierazitako irizpideak jarraitu ziren. Aztertutako metodo guztien inklusibitatea eta eskusibitatea kalkulatu ziren, metodo molekularren eraginkortasun erlatiboa, sentikortasun erlatiboa eta espezifikitate erlatiboa, eta baita metodoen detekzio maila erlatiboak ere. Zunda bidezko denbora errealeko PCR erreakzioetan erabilitako tanpoiek emaitzetan izaten duten eragina aztertzeko helburuarekin bi *master mix* komertzial desberdin erabili ziren (Takara-ren *master mix* bat eta Applied Biosystems-en beste bat). Inklusibitate azterketarako, ISO arauak dioenaren arabera, 50 *Salmonella* andui desberdin aztertu ziren. *Salmonella* andui guztientan *invA* amplifikazioa positiboa izan zen. Eskusibitate azterketarako *Salmonella* bakteriarekin erlaxionatutako 30 mikroorganismo desberdin aztertu ziren. Mikroorganismo guzti horiek emaitza negatiboak eman zituzten amplifikazio erreakzioetan. Eraginkortasun, sentikortasun eta espezifikitate erlatiboak kalkulatzeko 309 elikagai lagin

desberdin aztertu ziren, ISO arauak deskribatutako kategorien barruan sailkatutakoak. Emaizta positiboak zein negatiboak lortu ahal izateko, 309 elikagai horietatik erdiak gutxi gorabehera *Salmonellarekin* artifizialki kutsatu ziren. Eraginkortasun, sentikortasun eta espezifitate balio desberdinak lortu ziren metodo eta elikagaiaren arabera. Lortutako balioak 80%-100% bitartekoak izan ziren. Applied Biosystems-aren *master mix* tanpoia erabiltzean, zunda bidezko denbora errealeko PCR-aren sentikortasuna ez zen balio horietara heldu (62,4%). Detekzio maila erlatiboa, ISO arauak adierazten duen bezala, 5 elikagaitan kalkulatu zen (bakoitza elikagai kategoriatik batetik). Elikagai bakoitzean 5 edo 6 kutsadura maila aztertu ziren. Lortutako emaitzak 0,1-10 zelula/25gr elikagai tartean egon ziren. Ordea, arrain laginak aztertzerakoan zunda bidezko denbora errealeko PCRarekin, balioa 100 zelula/25gr ingurukoa izan zen.

Elikagaien analisiaren prozesu osoan zehar, metodo molekularren erabilpenerako kritikoak kontsideratu daitezken zenbait urrats identifikatu ziren. Arazo nagusietariko bat, ikerketa osoan zehar ikusi zena, elikagaien konposizioaren eragina izan zen. Gantz kopuru altuko elikagaiak arazorik gehien sortu zituzten elikagaiak izan ziren, gantzaren presentziak metodo molekularren detekzio ahalmenean eragin nabaria baitu. Beste urrats kritiko bat DNA-ren erauzketa prozesua izan zen. Erabiltzen den erauzketa metodoak lortzen den DNA-ren kalitatean eta kontzentrazioan eragina izaten du. Hau guztia dela eta, eta PCR aurreko elikagaien prozesaketa protokolo unibertsalik existitzen ez denez, aztertu behar den elikagaia eta detektatu nahi den patogenoa kontutan hartuta, metodoa optimizatzea beharrezkoa da, eta gainera, metodo bakoitza laborategi bakoitzeko egoera espezifikoari egokitu behar da.

## **“Development of polymerase chain reaction based methods for *Salmonella* detection and their validation in food samples”**

### **SUMMARY**

*Salmonella* is one of the most important foodborne pathogens worldwide. These bacteria cause gastroenteric diseases in both humans and animals. The presence of *Salmonella* in food, no matter its amount, is considered dangerous and makes the food not fit for human consumption. Therefore, routine microbiological tests along the food chain are of vital importance to avoid endangering the health of consumers. Checks should be made along the entire food process, starting with the control of the conditions at the farm until the final product quality. Traditional microbiological methods to detect pathogens in food have been culture-based methods. The traditional method for *Salmonella* detection comprises four phases: a non-selective pre-enrichment phase, a second phase of selective enrichment, an additional step of selective isolation on solid media, and a final confirmation stage by biochemical and serological tests. These traditional processes are laborious and extend the obtaining of the results up to a week.

Microbiology has been promoted through advances in molecular techniques, which have been used to develop new methods of pathogen detection. Among these techniques, methods based on nucleic acid amplification, such as PCR (polymerase chain reaction), provide a rapid and sensitive strategy for pathogen detection. Furthermore, the improvement, which has resulted in real-time PCR, allows researchers to obtain results in less time and avoids post-PCR processing that could cause cross contamination from the handling of samples.

In any case, for the development of PCR-based methods, it is essential to choose the best genetic target for each pathogen to ensure bacteria-specific detection techniques.

The main objective of this study was to develop *Salmonella* detection methods based on PCR, in order to make the process easier and to decrease the time required for achieving results. To that end, different steps were completed: i) *Salmonella* specific genetic target selection, ii) development of a PCR for

*Salmonella* diagnosis, iii) development of real-time PCR to detect *Salmonella*, and iv) validation of the real-time PCR methods designed against the traditional *Salmonella* detection method in food samples.

First, various genes proposed by different researchers to be *Salmonella* genetic targets were studied. After performing several PCR reactions with the primer pairs corresponding to each gene, it was established that the most suitable gene to use as a *Salmonella* genetic target in PCR methods was the *invA* gene. The protein encoded by this gene belongs to a secretion system required to cause the bacterial invasion of gut epithelial cells. As a gene involved in *Salmonella* virulence, it will likely be in all *Salmonella* isolates, or at least in all the virulent strains.

Once the *invA* gene was chosen as the *Salmonella* specific genetic target, a PCR was designed using a primer pair described previously (Rahn K *et al.*, 1992), to which an internal amplification control designed specifically for this work was added. The addition of internal amplification controls to PCR methods is completely necessary to detect possible inhibitions in the PCR reactions, mainly caused by food components. The 40 *Salmonella* strains analyzed by this PCR showed a positive result for *invA* gene amplification, while the isolates of the microorganisms associated with *Salmonella* tested negative.

With the intention to further reduce the necessary time to obtain results, we decided to adapt this PCR to a real-time PCR format. There are different detection systems used in real-time PCR. In this research project, we decided to design a real-time PCR using TaqMan® probes as detection system in addition to SYBR Green I. The primers used in the real-time PCR with SYBR Green I were the same as those of the conventional PCR, but a new internal amplification control was designed for the real-time PCR. For the real-time PCR with probes, a set of novel primers and a probe, which specifically hybridize with the fragment amplified by these primers, were designed. A new internal amplification control was also created, which was detected by an additional probe labelled with a different fluorophore. The specificity of both real-time PCR methods was tested theoretically, using computer programs, and also in an experimental way. The TaqMan® probe technology was more sensitive than the SYBR Green I technology

in this study, but on the other hand, the absence of reaction of the probe with one *Salmonella* strain indicated that it was less specific than SYBR Green I.

Real-time PCR methods were compared with the traditional *Salmonella* detection method in different food samples. To perform this validation study, the indications described in ISO 16140:2003 standard were followed. The inclusiveness and exclusiveness of the methods, relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity of the molecular methods, and also the relative detection levels, were calculated. For the real-time PCR with TaqMan® probes, two different commercial master mixes were used (one master mix of Takara and another of Applied Biosystems) in order to also study the influence of the master mix used in the results. In the inclusiveness test, 50 different *Salmonella* strains were analyzed, as indicated in the aforementioned ISO standard. All the *Salmonella* strains tested positive for *invA* gene detection. For the exclusiveness test, 30 strains of microorganisms associated with *Salmonella* were analyzed, which showed a negative result in the amplification reactions. To calculate the relative accuracy, specificity and sensitivity, 309 samples of different foods were used, according to the food categories described in ISO standard. To obtain a wide range of positive and negative results, about half of those 309 food samples were artificially contaminated with *Salmonella*. The values obtained were in a range between 80%-100%, except for the relative sensitivity of the real-time PCR with probes using the Applied Biosystems master mix, which was 62.4%. The relative detection levels were calculated as described in the ISO standard for five different foods (one of each food category). Five or six contamination levels were applied to each food type. The results covered a range of 0.1-10 cells/25gr of food, except for the real-time PCR with probes in which the detection limit in fish samples was around 100 cells/25gr.

Throughout the entire food analysis process, different stages were identified as critical when using molecular methods to detect pathogens in food. One of the main problems encountered was the influence exerted by the composition of the food matrix along the entire process. The major problems were found in foods with a high fat percentage, as fat strongly influences the detection ability of molecular methods. Another critical point was the DNA extraction method, which can influence the recovered DNA concentration and its



quality. Therefore, and because there is no universal protocol for sample processing prior to PCR reactions, each analysis method must be optimized, taking into account the food to be analyzed and the pathogen to be detected and adapt it to the special circumstances of each laboratory.

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. GÉNERO <i>SALMONELLA</i></b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Taxonomía y nomenclatura</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Acción patógena</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. Epidemiología</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Incidencia .....	6
1.3.2. Fuentes de infección y transmisión.....	7
<b>2. DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> EN ALIMENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Método tradicional de detección de <i>Salmonella</i></b> .....	<b>10</b>
<b>2.2. Métodos alternativos para la detección de <i>Salmonella</i></b> .....	<b>11</b>
2.2.1. Modificaciones en el método de cultivo .....	12
2.2.2. Inmunoensayos .....	13
2.2.3. Métodos de detección utilizando bacteriófagos.....	15
2.2.4. Métodos de detección mediante citometría de flujo .....	16
2.2.5. Métodos moleculares.....	16
2.2.5.1. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH, <i>fluorescent in situ hybridization</i> )....	16
2.2.5.2. Técnicas basadas en amplificación .....	17
2.2.5.3. NASBA ( <i>nucleic acid sequence-based amplification</i> ) .....	24
2.2.5.4. Microarrays.....	24
<b>3. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO</b> .....	<b>25</b>
<b>4. CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. Precisión analítica y eficacia diagnóstica</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2. Límite de detección</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3. Robustez</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4. Controles de amplificación</b> .....	<b>30</b>

---

4.5. Contaminación.....	32
4.6. Flexibilidad de las matrices alimentarias.....	32
4.7. Aceptación por el usuario final .....	32
4.8. Otros requisitos .....	32
<b>5. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO .....</b>	<b>33</b>
<b>6. GENÓMICA DE <i>SALMONELLA</i> .....</b>	<b>35</b>
6.1. Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> de tipo 1 (SPI-1) .....	38
6.2. Sistema de secreción de tipo III (T3SS) .....	39
6.3. Gen <i>invA</i> .....	41
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>1. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....</b>	<b>49</b>
<b>2. DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> BASADO EN LA TÉCNICA DE PCR.....</b>	<b>49</b>
2.1. Extracción del ADN bacteriano.....	49
2.2. Selección del gen diana para utilizar en la detección de <i>Salmonella</i> .....	50
2.2.1. Genes ensayados.....	50
2.2.2. Protocolo de amplificación por PCR.....	50
2.2.3. Electroforesis y visualización de los productos amplificados.....	51
2.2.4. Cepas utilizadas .....	51
2.3. Diseño de una PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	52
2.3.1. Diseño de un control interno de amplificación .....	52
2.3.1.1. Límite de detección del control interno .....	54
2.3.2. Optimización de la PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	55
2.3.3. Condiciones optimizadas de la PCR.....	55

---

2.3.4. Ensayo de validación de la PCR para detección de <i>Salmonella</i> .....	55
2.3.5. Límite de detección del método diseñado.....	57
<b>2.4. Diseño de una PCR a tiempo real para la detección de <i>Salmonella</i> mediante una sonda TaqMan®.....</b>	<b>57</b>
2.4.1. PCR a tiempo real con sonda Invavitone.....	57
2.4.1.1. Diseño de los iniciadores.....	57
2.4.1.2. Diseño de la sonda.....	58
2.4.1.3. Reacción de amplificación.....	58
2.4.1.4. Especificidad de los iniciadores y la sonda.....	59
2.4.2. Estudio de las cepas de <i>Salmonella</i> con resultado negativo para la detección del gen <i>invA</i> .....	59
2.4.3. PCR a tiempo real con sonda Invavitwo.....	61
2.4.3.1. Diseño de los iniciadores.....	61
2.4.3.2. Diseño de la sonda.....	61
2.4.3.3. Diseño de un control interno de amplificación y su correspondiente sonda.....	62
2.4.3.4. Condiciones optimizadas de la PCR a tiempo real.....	64
2.4.3.5. Límite de detección del control interno.....	65
2.4.3.6. Límite de detección del ADN del método.....	65
2.4.3.7. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real.....	65
<b>2.5. Diseño de una PCR a tiempo real para la detección de <i>Salmonella</i> mediante SYBR Green I.....</b>	<b>66</b>
2.5.1. Elección de los iniciadores.....	66
2.5.2. Diseño de un control interno.....	67
2.5.3. Condiciones optimizadas de la PCR a tiempo real.....	68
2.5.4. Límite de detección del CI.....	69
2.5.5. Límite de detección del ADN del método.....	69
2.5.6. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I.....	69
<b>3. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL DISEÑADOS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS.....</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Descripción del método de referencia.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2. Descripción de los métodos alternativos.....</b>	<b>75</b>
3.2.1. Protocolo y principio de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitwo como método de detección.....	75

3.2.2. Protocolo y principio de la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I como método de detección .....	77
<b>3.3. Estudio comparativo de los métodos .....</b>	<b>80</b>
3.3.1. Test de Inclusividad .....	80
3.3.1.1. Cepas estudiadas .....	80
3.3.1.2. Preparación de los cultivos bacterianos .....	82
3.3.1.3. Estudio de las cepas con resultado negativo en el test de inclusividad .....	82
3.3.2. Test de Exclusividad .....	83
3.3.3. Estudio de la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de los métodos alternativos .....	84
3.3.3.1. Muestras de alimentos .....	84
3.3.3.2. Análisis inicial de los alimentos.....	85
3.3.3.3. Contaminación artificial de las muestras.....	86
3.3.3.4. Preparación de las muestras para el análisis .....	90
3.3.3.5. Análisis y tratamiento de los datos obtenidos con los diferentes métodos .....	91
3.3.4. Nivel de detección relativa .....	92
3.3.4.1. Definición .....	92
3.3.4.2. Matrices de alimentos utilizadas .....	92
3.3.4.3. Contaminación de los alimentos.....	93
3.3.4.4. Cálculo del nivel de detección relativa .....	94
<b>4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS DISEÑADOS CON DOS KITS COMERCIALES.....</b>	<b>94</b>
4.1. Muestras de alimentos utilizadas.....	94
4.2. Contaminación de los alimentos .....	95
4.3. Protocolo común para todos los métodos.....	96
4.4. Protocolo específico de cada método .....	96
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
<b>1. SELECCIÓN DEL GEN DIANA PARA UTILIZAR EN LA DETECCIÓN DE SALMONELLA.....</b>	<b>99</b>
1.1. Gen <i>dnaK</i> .....	99

---

1.2. Gen 16S rRNA.....	100
1.3. Gen <i>invA</i> .....	100
1.4. Gen <i>ompC</i> .....	101
<b>2. DISEÑO DE UNA PCR PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> ...</b>	<b>103</b>
2.1. Diseño de un control interno de amplificación.....	103
2.1.1. Límite de detección del control interno .....	104
2.2. Optimización de la PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	105
2.3. Ensayo de validación de la PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	106
2.4. Límite de detección del gen <i>invA</i> mediante PCR.....	107
<b>3. DISEÑO DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL GEN <i>INV</i>A CON UNA SONDA TAQMAN®.....</b>	<b>108</b>
3.1. PCR a tiempo real con sonda Invavitone .....	108
3.2. Estudio de las cepas con resultado negativo para la detección del gen <i>invA</i> .....	110
3.2.1. Análisis de las secuencias .....	111
3.3. PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	113
3.3.1. Límite de detección del control interno .....	115
3.3.2. Límite de detección del gen <i>invA</i> .....	116
3.3.3. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real .....	116
<b>4. DISEÑO DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL GEN <i>INV</i>A MEDIANTE SYBR GREEN I .....</b>	<b>120</b>
4.1. Diseño del control interno .....	120
4.2. Límite de detección del control interno .....	122
4.3. Límite de detección del gen <i>invA</i> .....	122
4.4. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real.....	123

<b>5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL MEDIANTE SONDA INVAVITWO Y SYBR GREEN I PARA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i> .....</b>	<b>126</b>
<b>5.1. Test de Inclusividad.....</b>	<b>126</b>
5.1.1. Estudio de las cepa con resultado negativo en el test de inclusividad .....	129
<b>5.2. Test de Exclusividad .....</b>	<b>131</b>
<b>5.3. Estudio de la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de los métodos alternativos.....</b>	<b>133</b>
5.3.1. Análisis inicial de los alimentos .....	133
5.3.2. Contaminación artificial de las muestras .....	133
5.3.2.1. Diseño de un protocolo para estresar las bacterias .....	133
5.3.2.2. Niveles de inóculo de los alimentos contaminados artificialmente .....	135
5.3.2.3. Porcentaje de muestras positivas y negativas .....	135
5.3.3. Análisis de los resultados obtenidos con los diferentes métodos .....	136
<b>5.4. Nivel de detección relativa.....</b>	<b>143</b>
<b>6. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS DISEÑADOS CON DOS KITS COMERCIALES.....</b>	<b>144</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>185</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>207</b>

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	Distribución de los serotipos de <i>Salmonella</i> por especies y subespecies según la última revisión del esquema de White-Kauffman- Le Minor .....	4
Tabla 2.	Genomas de <i>Salmonella</i> secuenciados completamente hasta la fecha según información aportada por el NCBI .....	35
Tabla 3.	Genes elegidos como posibles dianas genéticas para la detección de <i>Salmonella</i> .....	50
Tabla 4.	Mezcla de reactivos empleados en la reacción de PCR utilizada para la elección de la diana genética para la detección de <i>Salmonella</i> .....	51
Tabla 5.	Cepas utilizadas para la elección del gen diana .....	52
Tabla 6.	Iniciadores quiméricos utilizados para la creación del control interno.....	53
Tabla 7.	Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para realizar la síntesis del control interno .....	54
Tabla 8.	Mezcla de reactivos optimizada y programa de amplificación final de la reacción de PCR utilizada para la detección de <i>Salmonella</i> .....	55
Tabla 9.	Cepas utilizadas para el estudio de validación de la PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	56
Tabla 10.	Secuencia de los iniciadores y de la sonda Invavitone diseñados para la PCR a tiempo real.....	58
Tabla 11.	Concentración de reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con sonda Invavitone .....	59
Tabla 12.	Programa de amplificación utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitone.....	59
Tabla 13.	Secuencia de los iniciadores Invasec1 e Invasec2 diseñados para obtener el fragmento de interés para secuenciar .....	60
Tabla 14.	Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para obtener el fragmento para secuenciar .....	60
Tabla 15.	Secuencias de los iniciadores y de la sonda Invavitwo para detección de <i>Salmonella</i> mediante PCR a tiempo real .....	61
Tabla 16.	Secuencia de los iniciadores quiméricos utilizados para la creación del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	62
Tabla 17.	Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para la síntesis del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	63
Tabla 18.	Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	64



## Índice

---

Tabla 19.	Secuencias de los iniciadores 139/141 utilizados en la detección de <i>Salmonella</i> mediante PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	66
Tabla 20.	Secuencia de los iniciadores quiméricos utilizados para la creación del CI de la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	67
Tabla 21.	Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real para determinar el CI más apropiado para su utilización en la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	68
Tabla 22.	Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	69
Tabla 23.	Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real con TaqMan® Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems.....	76
Tabla 24.	Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real con <i>Premix Ex Taq™</i> de Takara Bio Inc.....	77
Tabla 25.	Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real utilizando como método de detección SYBR Green I .....	78
Tabla 26.	Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas en el estudio de inclusividad .....	80
Tabla 27.	Cepas utilizadas en el estudio de exclusividad.....	83
Tabla 28.	Relación de muestras de alimentos empleados.....	85
Tabla 29.	Protocolos iniciales ensayados para lesionar las bacterias .....	86
Tabla 30.	Cepas de <i>Salmonella</i> con las que se realizó la contaminación artificial de los alimentos .....	89
Tabla 31.	Resultado de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitone .....	108
Tabla 32.	Resultado obtenido mediante PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo en las cepas analizadas .....	117
Tabla 33.	Tabla de contingencia para calcular la selectividad de la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	119
Tabla 34.	Resultado de la PCR a tiempo real con SYBR Green I frente a cepas de <i>Salmonella</i> y otros géneros relacionados.....	124
Tabla 35.	Tabla de contingencia para calcular la selectividad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	126
Tabla 36.	Resultados del test de inclusividad .....	127
Tabla 37.	Resultados del test de exclusividad .....	132
Tabla 38.	Resultados obtenidos por todos los métodos para la detección de muestras de alimentos contaminados con <i>Salmonella</i> .....	136

---

Tabla 39.	Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo utilizando la <i>master mix</i> de Takara enfrentados con los resultados del método de referencia.....	137
Tabla 40.	Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo utilizando la <i>master mix</i> de Applied Biosystems enfrentados con los resultados del método de referencia.....	138
Tabla 41.	Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I enfrentados con los resultados del método de referencia.....	138
Tabla 42.	Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la <i>master mix</i> de Takara .....	140
Tabla 43.	Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la <i>master mix</i> de Applied Biosystems .....	140
Tabla 44.	Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I.....	141
Tabla 45.	Valores totales de la eficacia, sensibilidad y especificidad relativas de cada uno de los métodos alternativos.....	142
Tabla 46.	Cálculo de la sensibilidad teniendo en cuenta también los resultados positivos adicionales obtenidos con el método alternativo y no con el de referencia .....	142
Tabla 47.	Niveles de detección relativa para cada método en cada matriz alimentaria .....	143
Tabla 48.	Resultados obtenidos en la comparación entre el método de referencia, los métodos alternativos propuestos en este trabajo y los dos kits comerciales.....	144



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Fases del método tradicional de cultivo para realizar la detección de <i>Salmonella</i> según la norma ISO 6579:2002 .....	11
Figura 2.	Curvas de amplificación (positiva y negativas) en una PCR a tiempo real realizada en nuestro laboratorio .....	19
Figura 3.	Sistemas de detección más utilizados en la PCR a tiempo real .....	20
Figura 4.	Esquema seguido en la síntesis del control interno .....	53
Figura 5.	Fragmento de 150 pb del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	64
Figura 6.	Tabla de contingencia y fórmulas utilizadas en el estudio de validación para el cálculo de la precisión analítica del método .....	66
Figura 7.	Medios selectivos utilizados en la detección e identificación presuntiva de <i>Salmonella</i> .....	72
Figura 8.	Galería API® 20E con un resultado característico de <i>Salmonella</i> spp .....	73
Figura 9.	Diagrama explicativo del procedimiento seguido en el método de referencia .....	74
Figura 10.	Diagrama explicativo del protocolo seguido por los métodos alternativos para la detección de <i>Salmonella</i> .....	79
Figura 11.	Punto del protocolo donde se realiza la división de la muestra para continuar cada análisis con su protocolo correspondiente .....	90
Figura 12.	Procedimiento de contaminación de los alimentos utilizados en el estudio del nivel de detección relativa.....	93
Figura 13.	Resultado de la amplificación del gen <i>dnak</i> .....	99
Figura 14.	Resultado de la amplificación del gen 16SrRNA.....	100
Figura 15.	Resultado de la amplificación del gen <i>invA</i> .....	101
Figura 16.	Reacciones de PCR realizadas con los iniciadores específicos del gen <i>ompC</i> .....	102
Figura 17.	Fragmentos amplificados correspondientes al control interno .....	103
Figura 18.	Límite de detección del control interno.....	104
Figura 19.	Optimización de las condiciones de la PCR para la detección de <i>Salmonella</i> .....	105
Figura 20.	Resultados obtenidos mediante la PCR convencional diseñada para la detección de <i>Salmonella</i> en cepas de <i>Salmonella</i> y otros microorganismos relacionados .....	106

## Índice

---

Figura 21. Resultado del límite de detección del gen <i>invA</i> .....	107
Figura 22. Fragmentos de amplificación obtenidos mediante PCR utilizando los iniciadores Invasec1 e Invasec2.....	111
Figura 23. Alineación de las secuencias obtenidas mediante el programa ClustalW .....	112
Figura 24. Secuencia de la cepa <i>Salmonella</i> IV 6,14:z4,z23:- n°274 (Sec2) alineada junto con el resto de secuencias de <i>Salmonella</i> analizadas.....	113
Figura 25. Zona del gen <i>invA</i> elegida para el diseño de la nueva sonda TaqMan® e iniciadores.....	114
Figura 26. Resultado de la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo para calcular el límite de detección del CI.....	115
Figura 27. Límite de detección del gen <i>invA</i> de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitwo .....	116
Figura 28. Curvas de amplificación del fragmento del gen <i>invA</i> en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo .....	117
Figura 29. Curvas de disociación de los posibles controles internos para la PCR a tiempo real con SYBR Green I.....	121
Figura 30. Cálculo del límite de detección del CI utilizado en la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	122
Figura 31. Límite de detección del gen <i>invA</i> en la PCR a tiempo real con SYBR Green I.....	123
Figura 32. Curvas de disociación de la PCR a tiempo real con SYBR Green I .....	124
Figura 33. Separación electroforética de los fragmentos obtenidos tras la PCR con los iniciadores Invasec1 e Invasec2 .....	130
Figura 34. Alineación de las secuencias mediante el programa ClustalW .....	130
Figura 35. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de tres muestras de la misma cepa de <i>Salmonella</i> .....	134

## ABREVIATURAS

AC: eficacia relativa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADP: adenosín difosfato

AFNOR: *Association Française de Normalisation*

AK: adenylate kinase

APT: agua de peptona tamponada

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ASM: Sociedad Americana para la Microbiología (*American Society for Microbiology*)

ATP: adenosín trifosfato

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

°C: grados Celsius

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CEN: Comité Europeo para la Estandarización

CI: control interno de amplificación

Ct: ciclo umbral (*threshold cycle*)

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

DT: fagotipo en *Salmonella* Typhimurium

ELFA: *Enzyme Linked Fluorescent Assay*

ELISA: enzimoimmunoensayo (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

*et al.*: y colaboradores

FISH: hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescent in situ hybridization*)

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

gr: gramos

IMS: separación inmunomagnética (*immunomagnetic separation*)

ISO: *International Organization for Standardization*

Kb: kilobase

λ: lamda

l: litro

## Abreviaturas

---

LA: aglutinación en latex (*latex agglutination*)

log: logaritmo

m-,  $\mu$ l: mili-, microlitros

m-,  $\mu$ -, n-, pM: mili-, micro-, nano-, picomolar

Mb: megabases

$\mu$ -, n-, p-, fg: micro-, nano-, pico-, femtogramos

MicroVal: *European Validation and Certification Organisation*

min: minutos

MKTTn: Muller-Kauffmann tetracionato novobiocina

NA: concordancia negativa

NASBA: *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ND: desviación negativa

nm: nanómetros

NordVal: Nordic Committee of Food Analysis

NTC: *Non Template Control*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: concordancia positiva

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PD: desviación positiva

PT: fagotipo en *Salmonella* Enteritidis

RFU: unidades de fluorescencia relativa

rpm: revoluciones por minuto

RVS: Rappaport-Vassiliadis con soja

SDS: dodecilsulfato sódico

SE: sensibilidad relativa

SP: especificidad relativa

SPI: isla de patogenicidad de *Salmonella* (*Salmonella pathogenicity island*)

T3SS: sistema de secreción de tipo III

TBE: tris borato EDTA

Tm: temperatura de disociación (*melting temperature*)

TSA: agar de soja tripticaseína

TSB: caldo de soja tripticaseína

U: unidades de enzima

ufc: unidades formadoras de colonias

UV: ultravioleta

XLD: xilosa lisina desoxicolato





# INTRODUCCIÓN

---



## 1. GÉNERO *Salmonella*

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 peritricos, 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 triptófano 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.

Tradicionalmente varios de estos rasgos se han utilizado para la identificación bioquímica de *Salmonella*, sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas de estas pruebas pueden presentar excepciones.

### 1.1. 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. En este estudio se va a utilizar la nomenclatura recomendada por los Centros Colaboradores de la OMS (Brenner FW *et al.*, 2000), utilizada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y por la Sociedad Americana para la Microbiología (ASM).

Según este sistema el género *Salmonella* contiene dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Actualmente está en proceso de incluirse una nueva especie denominada *Salmonella subterranea* (Shelobolina ES *et al.*, 2004), aunque por otro lado, hay opiniones contrarias que dicen que no pertenece al género *Salmonella* (Grimont PAD *et al.*, 2007). *Salmonella enterica* a su vez está

dividida en seis subespecies que se nombran con un número romano y un nombre: I, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; II, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; VI, *S. enterica* subsp. *indica*. Las subespecies se diferencian bioquímicamente y por características genéticas.

Los serotipos de la subespecie I se identifican mediante nombres (por ejemplo Enteritidis, Typhimurium, Agona) y los del resto de subespecies mediante una fórmula antigénica de acuerdo al esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont PAD *et al.*, 2007). Para diferenciar el nombre del serotipo del de la especie, los serotipos se escriben con la primera letra en mayúsculas y sin cursiva. La primera vez que se menciona un serotipo, el nombre del género va seguido de la palabra “serotipo” o de la abreviatura “ser.” y a continuación el nombre del serotipo (por ejemplo, *Salmonella* serotipo o ser. Typhimurium). En las siguientes ocasiones, se puede citar mediante el nombre del género seguido del nombre del serotipo (por ejemplo, *Salmonella* Typhimurium) (Le Minor L y Popoff MY, 1987).

Los nombres designados mediante una fórmula antigénica se componen de: 1) la subespecie (de subespecie I a VI), 2) los antígenos somáticos O, 3) los antígenos flagelares H de fase 1, y 4) los antígenos flagelares H de segunda fase si los hubiera. Los diferentes antígenos se separan mediante dos puntos. Un ejemplo de esto serían: *Salmonella* serotipo IV 48:z<sub>4</sub>:z<sub>32</sub>:- y *Salmonella* serotipo IIIb 47:i:z.

Actualmente existen unos 2610 serotipos de *Salmonella* (Guibourdenche M *et al.*, 2010) que se distribuyen según la siguiente tabla:

Especie	Subespecie	Serotipos
<i>Salmonella enterica</i>		2587
	subsp. <i>enterica</i> (I)	1547
	subsp. <i>salamae</i> (II)	513
	subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	100
	subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	341
	subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
	subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i>		23
Total		2610

**Tabla 1.** Distribución de los serotipos de *Salmonella* por especies y subespecies según la última revisión del esquema de White-Kauffmann-Le Minor (Guibourdenche M *et al.*, 2010).

## 1.2. Acción patógena

*Salmonella* es un patógeno asociado a enfermedades que afectan a un amplio rango de vertebrados. Algunas de ellas son patógenos estrictamente de humanos (*Salmonella* serotipo Typhi, serotipo Paratyphi A, B o C) y otras afectan principalmente a animales (*Salmonella* serotipo Gallinarum a aves, serotipo Abortusovis a ovejas, serotipo Abortusequi a caballos,...). Sin embargo la mayoría de los serotipos no están adaptados a un huésped específico. Generalmente la infección se adquiere por la ingesta de agua o alimentos contaminados, tras lo cual se pueden dar tres posibilidades: la eliminación del microorganismo, la aparición del estado portador asintomático, o el desarrollo de la enfermedad con alguno de los siguientes tipos de manifestaciones clínicas (D'Aoust JY, 1991):

- **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 (D'Aoust JY, 1991).

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 ésta 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.

En el tratamiento de la salmonelosis es fundamental la rehidratación y el control electrolítico. No está recomendado el uso de antibióticos (salvo en casos excepcionales) ya que está demostrado que el uso de antibióticos prolonga la excreción fecal de *Salmonella* (más que limitarla), eleva la incidencia de

portadores y favorece la adquisición de resistencias antibióticas por parte de la bacteria (D'Aoust JY, 1991; Hohmann EL, 2001).

- **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 (D'Aoust JY, 1991).

- **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 JL, 1994).

### **1.3. Epidemiología**

#### **1.3.1. 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 enterica* es responsable de alrededor de 1 millón de casos de enterocolitis y de 400 muertes al año en Estados Unidos (Scallan E *et al.*, 2011). 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. Aún siendo difícil calcular los datos

reales de fiebre tifoidea en países en vías de desarrollo, según la OMS (Organización Mundial de la Salud) 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 JA *et al.*, 2004).

Actualmente en España las infecciones por *Salmonella* son la segunda causa de gastroenteritis bacteriana detrás de *Campylobacter*, pero son la principal causa de brotes de transmisión alimentaria. Según el Informe Anual del Sistema de Información Microbiológica (Centro Nacional de Epidemiología y Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2009), en el año 2009 se notificaron 4302 casos de *Salmonella* no tifoidea. El serotipo que se aisló con más frecuencia fue *Salmonella* Enteritidis (36,8%) seguido de *Salmonella* Typhimurium (21,9%) y *Salmonella* spp. (14,9%). En la Comunidad Autónoma del País Vasco fueron 730 los casos notificados y la distribución de serotipos similar que la distribución a nivel nacional.

En el año 2008, según datos aportados por el Informe Anual de los Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmisibles (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2008), el número de brotes notificados fue de 265. Los brotes que predominaron fueron los de transmisión por alimentos (92,8%), especialmente los transmitidos por alimentos distintos al agua. El alimento implicado con más frecuencia fue el huevo, seguido a gran distancia por la repostería y la carne o productos cárnicos.

La salmonelosis puede afectar a cualquier persona y se presenta con una frecuencia similar en ambos sexos, mientras que varía en los diferentes grupos de edad. Los niños menores de 5 años tienen la mayor incidencia de salmonelosis. En las personas mayores de 65 años y en las personas inmunocomprometidas la incidencia también es alta.

Otra característica de la infección por *Salmonella* es su marcada variación estacional, ya que se manifiesta con mayor incidencia en los meses de verano.

### **1.3.2. Fuentes de infección y transmisión**

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 éstas llegan al suelo, al agua, a los alimentos, a los piensos, y desde estos medios, a otros animales o personas.

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 productos implicados en los casos de salmonelosis en humanos son principalmente las aves de corral, la carne cruda de vacuno o cerdo, y los huevos o productos que contengan huevo.

La contaminación de la carne puede ocurrir durante la vida del animal o después de su sacrificio. El ciclo de infección puede iniciarse en las granjas por la introducción de animales enfermos o portadores, o por el consumo de piensos contaminados.

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 cáscara 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 cáscara se rompe o también penetrando por los poros de la cáscara, y 2) mediante contaminación directa de la yema, de la clara, de las membranas que forman la cáscara o de la cáscara antes de la puesta del huevo, debido a la infección de los órganos reproductores con *Salmonella* (Gantois I *et al.*, 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* como ocurrió en 2008 por la distribución de leche materna en polvo contaminada (Soler P *et al.*, 2008) o el pasado mes de febrero de 2011 por la distribución de unos lotes contaminados con *Salmonella* serotipo Poona (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición).

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

## 2. DETECCIÓN DE *Salmonella* 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. El método de referencia utilizado para la detección de *Salmonella* en alimentos es el descrito en la norma ISO 6579:2002 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp." (Anonymous, 2002).

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 V *et al.*, 2010).

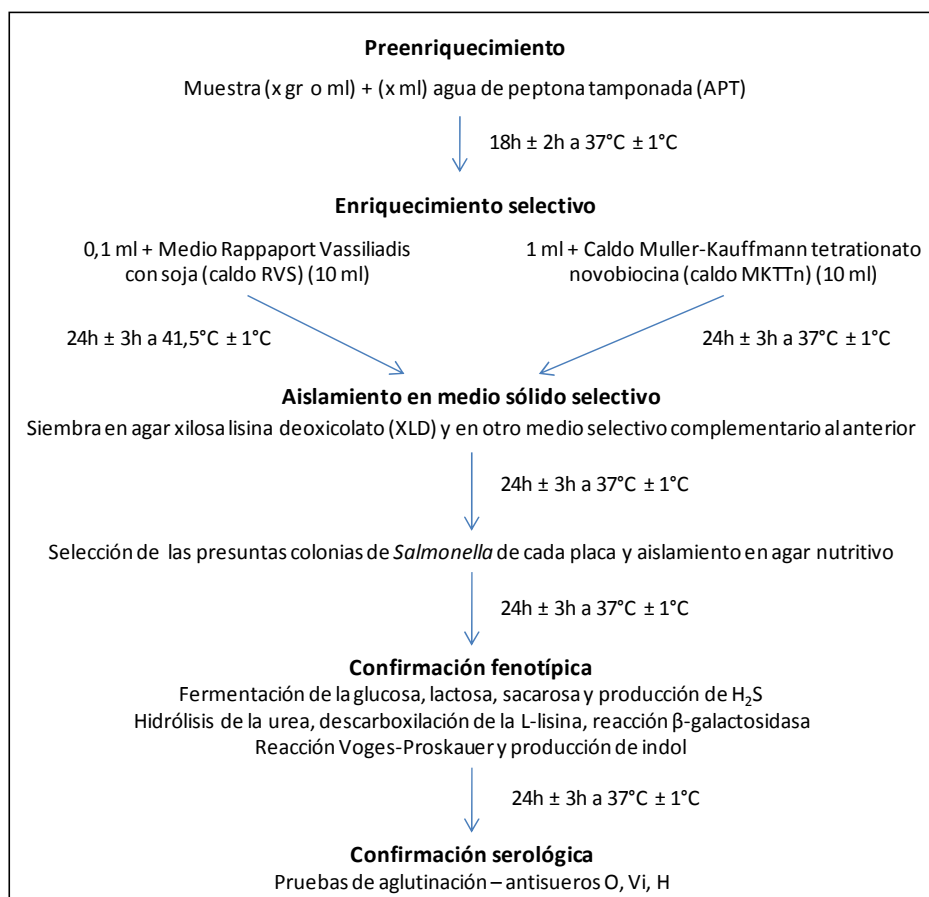
### **2.1. Método tradicional de detección de *Salmonella***

Como ya se ha comentado anteriormente, el método tradicional de detección de *Salmonella* en alimentos está basado en la norma ISO 6579:2002. Este método nos ofrece unos resultados de presencia/ausencia de la bacteria normalmente en 25 gr de alimento.

Las bacterias en los alimentos se encuentran generalmente en una situación de estrés o lesión (Wu VCH, 2008), por lo tanto, este método tradicional se compone 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 *Salmonella* y que favorezca el crecimiento del microorganismo diana para alcanzar un mayor número de células.

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. En la siguiente figura (Figura 1) se muestra de manera esquemática el protocolo del método tradicional de detección de *Salmonella*.



**Figura 1.** Fases del método tradicional de cultivo para realizar la detección de *Salmonella* según la norma ISO 6579:2002. Esquema modificado de Jasson V y colaboradores (2010).

## 2.2. Métodos alternativos para la detección de *Salmonella*

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 (Feng P, 2001; Jasson V *et al.*, 2010). La distribución o clasificación que se realiza a

continuación de los métodos alternativos se basa en lo descrito por Jasson V y colaboradores (2010).

### **2.2.1. 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.

Los medios cromogénicos también han sido un gran avance: son medios de cultivo en los que se han incluido sustratos cromogénicos que permiten detectar actividades enzimáticas. Esto permite realizar una identificación inmediata de los principales microorganismos que estén presentes en la muestra, ya que cada especie dará colonias de un color característico.

Ejemplo de estos avances es el SESAME *Salmonella* Test de Biokar (Biokar Diagnostics, France) que incluye un medio que disminuye el tiempo de enriquecimiento, un segundo paso de detección en agar semisólido que permite diferenciar los microorganismos móviles de los no móviles y un paso de confirmación en agar cromogénico. Otro ejemplo es el RAPID *Salmonella* Short Protocol de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), que al igual que en el test anterior, gracias a la adición de un suplemento de enriquecimiento que se añade al agua de peptona tamponada la fase de enriquecimiento se reduce a un solo paso, y posteriormente se siembra en agar cromogénico que permite detectar presuntas colonias de *Salmonella*.

Además de las modificaciones en los medios de cultivo, también se han diseñado nuevos kits para utilizar en la confirmación o identificación de las presuntas colonias, que pueden ser una alternativa a los métodos clásicos de confirmación más largos. Normalmente estas pruebas se basan en galerías con test miniaturizados de medios o reactivos deshidratados que se inoculan fácilmente con una suspensión bacteriana de la colonia sospechosa. Estos test existen en diferentes formatos. Por ejemplo, en las Galerías API 20E de BioMerieux (Marcy l'Etoile, France) las pruebas bioquímicas se realizan en distintos pocillos observando los resultados de una manera visual mediante el

cambio de color. Similar a estas galerías es el Enterotube™ II (Becton Dickinson, NJ, USA). También se pueden realizar estas pruebas de manera automática, en las que un lector va registrando los cambios bioquímicos que se van generando en cada reacción, como por ejemplo con el equipo VITEK de BioMerieux.

### **2.2.2. 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  $10^4$ - $10^5$  ufc/ml. Existen diferentes métodos inmunológicos aplicables al diagnóstico alimentario.

- **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. Para *Salmonella* existen por ejemplo el test VIP for *Salmonella* de BioControl (WA, USA) o el Reveal® de Neogen (MI, USA) entre otros.

- **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 catalizará una reacción colorimétrica. Las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación son el soporte sólido más utilizado en este tipo de ensayos. Existen gran variedad de kits en formato ELISA para la detección de *Salmonella*. Hoy en día muchos de estos test se proporcionan como

sistemas automatizados y robotizados que ahorran tiempo gracias a la disminución del trabajo manual, pero además, aumentan la reproducibilidad y la estandarización de cada paso. Ejemplos de estos sistemas para *Salmonella* son el RayAL *Salmonella* (RayAL, Nottinghamshire, UK), los sistemas 3M™ Tecra™ (3M, St. Paul, Minnesota, USA) o el TRANSIA® PLATE *Salmonella* Gold (BioControl).

Los métodos anteriormente mencionados se basan en la utilización de sustratos cromogénicos para realizar la detección, pero la enzima puede también catalizar una reacción fluorescente. Son métodos basados en la tecnología ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). El sistema VIDAS® y su versión compacta miniVIDAS de BioMerieux son sistemas multiparamétricos que utilizan esta metodología ELFA y que además están completamente automatizados.

- **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. En los métodos de detección de *Salmonella* la IMS se utiliza normalmente para reemplazar el paso de enriquecimiento selectivo, ganando de este modo 24 h. Como ejemplos de sistemas comerciales de separación inmunomagnética tenemos Dynabeads® anti-*Salmonella* (Invitrogen, California, USA) o el sistema Pathatrix (Matrix MicroScience, Newmarket, UK).

- **Sistemas de aglutinación en porta**

Son uno de los métodos inmunológicos más sencillos. El más utilizado es la aglutinación en látex (LA), en el que las partículas de látex son unidas a los anticuerpos específicos que en contacto con los antígenos específicos del microorganismo diana produce una reacción de aglutinación que es detectada visualmente. Para *Salmonella* existen varios test de aglutinación, como por

ejemplo *Salmonella* Latex Test (Oxoid, Basingstoke, UK) o Microgen® *Salmonella* Rapid Test (Microgen Bioproducts, Surrey, UK). Normalmente estos test son utilizados en la última fase del método tradicional de detección de *Salmonella*, es decir, en la confirmación serológica.

- **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 ésta, se formarán complejos antígeno-anticuerpo generando una línea de precipitación. Para *Salmonella* existe el 1-2 Test de BioControl, en el cual el anticuerpo utilizado es específico para el antígeno flagelar de *Salmonella*, por lo que no se detectarán salmonelas no móviles.

### **2.2.3. Métodos de detección utilizando bacteriófagos**

La alta especificidad de los bacteriófagos para interactuar con su bacteria hospedadora ha sido utilizada para crear métodos de detección de patógenos en alimentos. Esa alta especificidad de los fagos se debe a las proteínas asociadas con la cola del fago que reconocen específicamente moléculas de la superficie de la bacteria. El kit RapidCheck® SELECT™ for *Salmonella* (Strategic Diagnostics, DE, USA) utiliza esta tecnología basada en bacteriófagos. Se utilizan los fagos como agentes selectivos durante el paso de enriquecimiento, ya que al caldo de enriquecimiento se le añade un suplemento que contiene esos fagos. Los fagos atacan y reducen la concentración de la flora competidora permitiendo un crecimiento óptimo de *Salmonella*, es decir, producen una disminución de las bacterias competidoras. La empresa Alaska Food Diagnostics (Salisbury, UK) también ha desarrollado un método para la detección de *Salmonella* que incluye la utilización de bacteriófagos, pero en este caso, en vez de utilizar bacteriófagos específicos de las bacterias competidoras, los bacteriófagos son específicos de *Salmonella*. El sistema se basa en la tecnología patentada Adenylate Kinase (AK) Phage™ con la cual han desarrollado un método altamente sensible, específico y rápido. Este sistema comprende dos fases: por un lado se realiza una separación inmunomagnética para capturar el microorganismo diana en el caldo de



preenriquecimiento, y por otro lado, los bacteriófagos específicos inducen la lisis celular (en este caso de las células de *Salmonella*) liberando la AK intracelular. La AK liberada media la conversión de ADP en ATP, el cual es detectado como luz visible ya que forma parte de una reacción enzima-sustrato entre luciferasa-luciferina (reacción de bioluminiscencia). La cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de ATP, por lo tanto proporcional a la actividad AK, y finalmente, proporcional a la cantidad de células de *Salmonella* en la muestra.

#### **2.2.4. Métodos de detección mediante citometría de flujo**

La citometría de flujo puede detectar cada una de las células de una suspensión de manera individual por lo que podría ser un método utilizado en la detección de patógenos. Aun así no es un método muy empleado ya que no es una técnica lo suficientemente sensible. Mediante citometría de flujo no se pueden detectar cantidades menores a  $10^3$ - $10^4$  células/ml. Una fase previa de enriquecimiento es esencial antes de utilizar la citometría de flujo para aumentar la cantidad de bacterias en la muestra hasta niveles detectables por esta técnica.

En vez de utilizar citometría de flujo, también se pueden visualizar y detectar células teñidas mediante un microscopio de epifluorescencia.

#### **2.2.5. Métodos moleculares**

En los métodos moleculares son esenciales tanto la selección de una secuencia de ADN que sea específica, así como unas adecuadas condiciones de amplificación. Estos son los factores determinantes de la especificidad de los métodos moleculares.

##### **2.2.5.1. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescent in situ hybridization*)**

Dentro de las técnicas moleculares no basadas en PCR, esta técnica es la más frecuente. Generalmente se utilizan sondas oligonucleotídicas que reconocen el ARN ribosómico (ARNr). Las células bacterianas son tratadas con diversos fijadores y después, se realiza la hibridación con los oligonucleótidos en condiciones muy restrictivas, bien en superficie de cristal o bien en solución. Las

sondas suelen tener un tamaño de entre 15 y 25 nucleótidos y están marcadas covalentemente en el extremo 5' con una molécula fluorescente. Después de unos lavados para retirar las sondas que no se hayan unido, las células que estén marcadas gracias a la unión con las sondas, serán detectadas mediante un microscopio de epifluorescencia. El límite de detección de esta técnica suele estar en torno a  $10^4$  ufc/ml, por lo que se necesita un paso previo de enriquecimiento para alcanzar esos valores.

En el mercado existe el kit VIT-*Salmonella* comercializado por Vermicon (Munich, Germany) que se basa en la técnica FISH.

### 2.2.5.2. Técnicas basadas en amplificación

- 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 (Mullis KB y Faloona FA, 1987). Mediante esta técnica un fragmento específico de ADN se amplifica debido a la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), 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 (iniciadores) 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 aumentará de forma exponencial (Olsen JE *et al.*, 1995). 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 SE *et al.*, 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, como GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA).

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 (Hanna SE *et al.*, 2005).

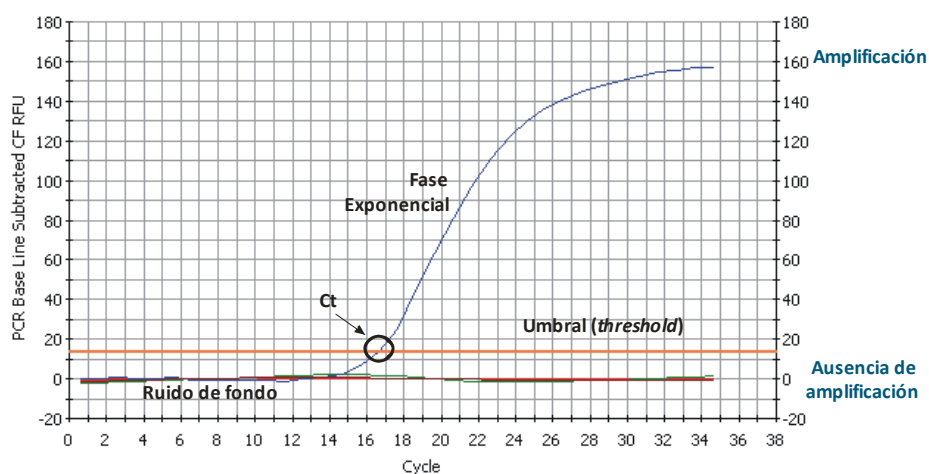
Aunque mediante PCR se pueden detectar los ácidos nucleicos de un único organismo, el volumen de 1-10 µl de muestra que normalmente se utiliza en la reacción restringe el límite de detección a 10<sup>3</sup> células/ml (Olsen JE *et al.*, 1995). Normalmente los patógenos alimentarios están presentes 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.

- **PCR a tiempo real**

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.

Los resultados de la PCR a tiempo real se visualizan mediante curvas de amplificación (Figura 2). 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  $C_t$  (*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 él.



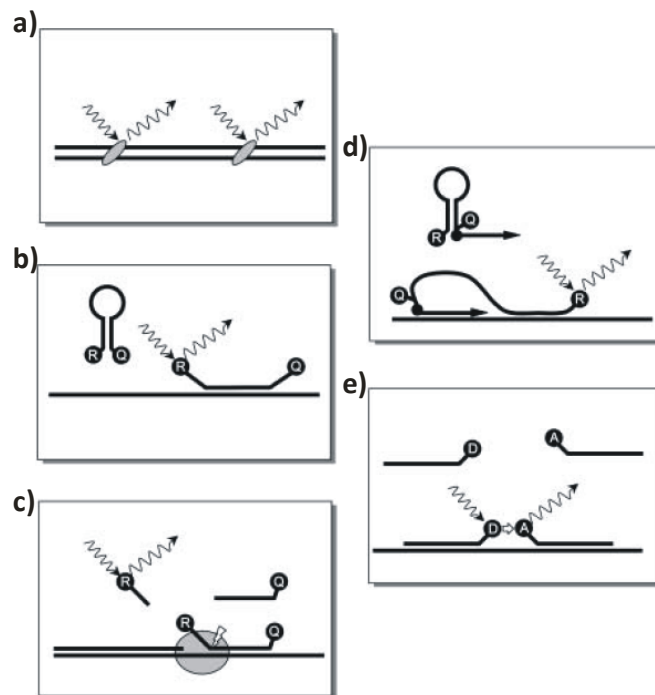
**Figura 2.** Curvas de amplificación (positiva y negativa) en una PCR a tiempo real realizada en nuestro laboratorio. La gráfica muestra la fluorescencia con respecto al número de ciclos. La cantidad de fluorescencia está dada en RFU, unidades de fluorescencia relativa.

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 J y Pingoud A, 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 alcanzará 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.

Existen diferentes sistemas de detección de la amplificación en una PCR a tiempo real (Figura 3):



**Figura 3.** 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:** fluoróforo, **Q:** *quencher*, **D:** fluoróforo donador, **A:** fluoróforo receptor.

### SYBR Green I

El SYBR Green I es una molécula que se une al ADN de doble cadena (Figura 3a), 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 (Hanna SE *et al.*, 2005). 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 amplicón deseado y los productos inespecíficos. También se pueden diferenciar distintos amplicones por ejemplo en reacciones de PCR múltiple. 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 (Wilhelm J y Pingoud A, 2003).

#### 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 amplicón. 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 amplicón, la estructura en horquilla desaparece y se puede detectar la emisión de fluorescencia (Hanna SE *et al.*, 2005) (Figura 3b).

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 amplicón 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 (Tyagi S y Kramer FR, 1996).

#### Sondas TaqMan®

Son oligonucleótidos que se unen de forma específica al amplicón. 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 amplicón, 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 (Livak KJ *et al.*, 1995) (Figura 3c).

Las sondas TaqMan® son más específicas que el SYBR Green I porque solo se unen a la secuencia que se desea dentro del amplicón. 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 SE *et al.*, 2005).

#### 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* (Figura 3d). Como el fluoróforo y el *quencher* están próximos no habrá emisión de fluorescencia.

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 amplicón, el fluoróforo queda separado del *quencher*, y por lo tanto habrá emisión de fluorescencia (Hanna SE *et al.*, 2005).

#### Tecnología FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)

En este caso se utilizan dos sondas marcadas o una sonda y un iniciador marcados para realizar la detección. Estas sondas hibridan en secuencias adyacentes (una detrás de la otra) en el producto amplificado. Una de las sondas está marcada en el extremo 3' con un fluoróforo y la otra en el extremo 5' con otro fluoróforo diferente. El primero de los fluoróforos transmite la energía al segundo fluoróforo, el cual es el encargado de emitir la fluorescencia (Figura 3e) (Mozola MA, 2006).

#### **Tendencia actual del uso de la PCR a 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 B *et al.*, 2003).

Los métodos basados en PCR son muy útiles para realizar *screening* de muestras, pero en caso de obtener algún resultado positivo siempre se debe confirmar con el método tradicional de cultivo.

Hoy en día existen una gran variedad de kits comerciales validados para realizar la detección de *Salmonella* en alimentos mediante PCR a tiempo real, entre ellos:

**Kit Comercial**

iQ-Check™ *Salmonella* II  
LightCycler® foodproof *Salmonella* Detection kit  
Salmofast  
BAX® System PCR Assay for *Salmonella*  
ADIAFOOD *Salmonella* kit  
TaqMan® *Salmonella enterica* Detection kit  
MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection kit  
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system  
Assurance GDS™ *Salmonella*  
Autentigen® *Salmonella*

**Casa Comercial**

Bio-Rad (Hercules, CA)  
Roche (Indianapolis, USA)  
Microbial (Girona, España)  
Du Pont (Delaware, USA)  
AES Chemunex (Bruz, France)  
Applied Biosystems (Foster City, USA)  
Applied Biosystems (Foster City, USA)  
Idaho Technology (Utah, USA)  
BioControl (WA, USA)  
Sistemas Genómicos (Valencia, España)

• **PCR múltiple**

Mediante PCR múltiple se pueden amplificar de forma simultánea y en un solo tubo más de una secuencia diana. Para ello se combinan varias parejas de iniciadores en una única reacción (Jasson V *et al.*, 2010). El que haya varios iniciadores a la vez en la reacción puede causar algunas complicaciones, por eso es recomendable: diseñar o elegir iniciadores que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros; que las temperaturas de anillamiento de los iniciadores sean similares; y que cada pareja amplifique una única secuencia (Méndez-Álvarez S y Pérez-Roth E, 2004). En el caso de detectar la amplificación mediante electroforesis, los fragmentos generados deben ser de tamaños lo suficientemente diferentes para poder diferenciarlos visualmente. Si la detección



se realiza a tiempo real, los fragmentos deben tener diferentes temperaturas de disociación para poder diferenciarlos, o se pueden diferenciar mediante sondas marcadas con distintos fluoróforos (Wittwer CT *et al.*, 2001).

Un kit comercial con este formato de PCR múltiple y detección mediante sondas es el GeneDisc® Rapid Microbiology System (PALL, NY, USA) con el que se pueden detectar *Salmonella* y *E. coli* simultáneamente.

#### **2.2.5.3. NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*)**

El método NASBA ha sido también utilizado en el análisis de alimentos. Es un método molecular pero no está basado en la amplificación mediante PCR. Está diseñado específicamente para detectar moléculas de ARN en vez de ADN. Se utilizan una transcriptasa inversa y una RNasa H para producir ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir de ARN. Este ADNc es transcrito mediante la T7 ARN polimerasa produciendo múltiples transcritos de ARN durante toda la reacción. No son necesarios los termocicladores ya que toda la reacción se produce a 41°C. El producto de ARN generado normalmente se suele detectar mediante sondas (Mozola MA, 2006).

#### **2.2.5.4. Microarrays**

Los *microarrays* son un sistema miniaturizado mediante los cuales se puede realizar el análisis de hibridación de múltiples determinantes genéticos marcados con fluorescencia a la vez, mediante sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en un soporte que normalmente es de cristal. La hibridación es detectada mediante un laser en un escáner. La aplicación más común de esta tecnología es el análisis de expresión de genes. Sus aplicaciones en el área de detección de patógenos alimentarios están más limitadas, aunque los *microarrays* de ADN podrían ser muy útiles en la detección simultánea de diferentes bacterias en un único *microarray*.

### 3. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

La validación de un método es el estudio comparativo entre el método alternativo que se quiere proponer y el método de referencia. Se busca el grado de correspondencia que hay entre el resultado obtenido con el método de referencia y la respuesta obtenida con el método alternativo en muestras idénticas. El método alternativo debe demostrar que ofrece resultados comparables, si no mejores, que los obtenidos con el método de referencia. El método alternativo se podrá usar si ofrece resultados equivalentes al de referencia.

La validación de un método consiste en dos partes: un **estudio comparativo** en el que el método que se quiere validar es comparado con el método de referencia, y un **estudio interlaboratorio**. Para dirigir este tipo de validaciones la *International Organization for Standardization (ISO)* ha creado la norma ISO 16140:2003 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos" (Anonymous, 2003), que describe el principio general y protocolo técnico para la validación de métodos alternativos en el campo del análisis microbiológico de alimentos para consumo humano y animal, y muestras ambientales y veterinarias. Se pueden validar tanto métodos cualitativos (presencia/ausencia) como métodos cuantitativos.

Según la norma ISO 16140:2003, el estudio comparativo de un método cualitativo (estudio que se ha realizado en este trabajo de tesis doctoral) consta de distintas partes. Por un lado hay que calcular la **eficacia relativa**, la **especificidad relativa** y la **sensibilidad relativa** del método que se va a validar. Para ello se eligen 5 categorías de alimentos representativos del microorganismo que se vaya a detectar y se analizan 60 muestras por cada categoría con cada uno de los métodos, tanto el alternativo como el de referencia. Para que haya variedad en los resultados se utilizan tanto muestras contaminadas con el microorganismo diana, ya sean contaminadas artificialmente como de manera natural, así como muestras no contaminadas. Lo deseable es obtener un 50% de resultados positivos y un 50% de negativos. Las bacterias en los alimentos están en unas condiciones de mayor o menor grado de estrés dependiendo del alimento en el que estén, del tratamiento que haya recibido ese alimento, etc.; por lo

tanto, si se han de preparar muestras contaminadas artificialmente, esos alimentos se han de contaminar con células estresadas o lesionadas para poder simular dentro de lo posible esa situación de estrés en la que se encuentran las bacterias.

También se ha de calcular el **nivel de detección relativa** o límite de detección. Se elige un producto alimentario por cada una de las categorías y se contamina con el microorganismo diana con diferentes niveles de contaminación. En todos los casos el primer nivel de contaminación será el control negativo, es decir, la muestra sin contaminar. Para cada nivel de contaminación se realizan seis réplicas. A cada muestra se le aplica tanto el método de referencia como el alternativo para así poder calcular el límite de detección de cada método.

Por último, el estudio comparativo comprende las pruebas de **inclusividad** y de **exclusividad**. En el test de inclusividad se analiza una amplia batería de cepas del microorganismo diana para determinar la capacidad del método alternativo para detectarlas. En el test de exclusividad se analizan diferentes microorganismos relacionados con la bacteria diana para determinar la capacidad del método alternativo para no detectarlas.

La Unión Europea, permite el uso de métodos alternativos si están validados mediante el protocolo establecido por la norma ISO 16140:2003. Existen diferentes instituciones que conceden los certificados de validación de métodos alternativos, como por ejemplo: AFNOR (*Association Française de Normalisation*, France), NordVal (*Nordic Committee on Food Analysis*, Norway) y MicroVal (*European Validation and Certification Organisation*, Europa).

Aunque un método esté previamente validado externamente, cuando se quiere introducir su uso en un laboratorio, es recomendable validarlo o verificarlo en ese laboratorio para demostrar que en ese lugar funciona correctamente con los tipos de alimentos allí analizados.

## 4. CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS

Un método de PCR estandarizado que sirva para la detección de patógenos alimentarios tiene que cumplir con los siguientes criterios descritos por Malorny B y colaboradores (2003a):

- Buena precisión analítica y diagnóstica.
- Buen límite de detección.
- Robustez.
- Controles de amplificación.
- Bajo riesgo de contaminación.
- Flexibilidad de matrices de muestras.
- Aceptación por el usuario final.
- Rapidez.
- Bajo coste.
- Simplicidad.

### 4.1. Precisión analítica y eficacia diagnóstica

Un método alternativo basado en PCR debe presentar una alta precisión analítica y eficacia diagnóstica. La **precisión analítica** se refiere a la selectividad y al límite de detección. La **selectividad** se define como la medición del grado de respuesta del microorganismo diana y de los microorganismos no-diana. La selectividad incluye los términos **inclusividad** (capacidad de detección del microorganismo diana entre un amplio grupo de cepas) y **exclusividad** (capacidad de no generar respuesta dentro de un grupo de microorganismo no-diana pero altamente relacionados con el microorganismo diana). Por lo tanto, un método selectivo tendrá una alta inclusividad y exclusividad. El **límite de detección** es el

menor número de microorganismos cultivables que pueden detectarse en la muestra (Malorny B *et al.*, 2003a).

La **eficacia diagnóstica** tiene en cuenta los microorganismos diana y los no-diana en presencia de una matriz biológica e incluye los términos especificidad y sensibilidad. La **especificidad** diagnóstica se define como el grado en el que el método se ve afectado por la presencia de componentes en la matriz biológica diferentes al organismo diana que pueden generar falsos positivos. En la norma ISO 16140:2003 se define **especificidad relativa** como la capacidad del método alternativo para no detectar el analito (microorganismo medido por el método de análisis) cuando no es detectado por el método de referencia. La **sensibilidad** diagnóstica se define como el grado de detección del microorganismo diana en la matriz biológica, que puede generar un falso negativo. La norma ISO 16140:2003 define **sensibilidad relativa** como la capacidad del método alternativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia. Por lo tanto, una alta eficacia diagnóstica significa la capacidad de detectar de manera precisa el microorganismo diana en la matriz biológica sin que existan interferencias con componentes no-diana.

La norma ISO 16140:2003 define **eficacia relativa** como el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo en muestras idénticas. El método alternativo presenta una **desviación positiva** si da un resultado positivo cuando el método de referencia da un resultado negativo, y presenta una **desviación negativa** si da un resultado negativo cuando el método de referencia da un resultado positivo. Una desviación positiva se convierte en un resultado **falso positivo** cuando se demuestra que el resultado negativo es el verdadero, y una desviación positiva se considera como un **verdadero positivo** cuando se demuestra que el resultado verdadero es el positivo. Una desviación negativa se convierte en un resultado **falso negativo** cuando se demuestra que el resultado positivo es el verdadero.

## **4.2. Límite de detección**

Como se ha comentado anteriormente, el límite de detección es el menor número de microorganismos cultivables que pueden detectarse en la muestra. En la norma ISO 16140:2003 se establece que el límite (nivel) de detección relativo está situado entre los dos niveles de contaminación que muestran respectivamente menos y más del 50% del límite de detección, es decir, entre el nivel en el que más del 50% de las réplicas de la muestra dan un resultado positivo y el nivel en el que menos del 50% de las réplicas de la muestra dan un resultado positivo. Por lo tanto, el límite de detección relativo se expresa como un intervalo.

El límite de detección de un método basado en PCR debe ser bajo. Los métodos tradicionales de referencia requieren un umbral de detección de una célula en 25 gr. de muestra. Para un método de PCR este límite teórico de una sola célula en la práctica suele establecerse en  $10^3$ - $10^4$  células por ml de muestra preenriquecida, teniendo en cuenta que solo se utiliza un pequeño volumen de la matriz inicial en la reacción de PCR. Por lo tanto, un ensayo de PCR que vaya precedido de un paso de enriquecimiento para favorecer la multiplicación de las células bacterianas, debería detectar un número muy bajo (10-100) de copias de ADN de la bacteria diana en la reacción.

## **4.3. Robustez**

El método debe ser tolerante frente a distintos parámetros físicos y químicos. Los parámetros más críticos suelen ser: la calidad del ADN molde (integridad del cromosoma y presencia o ausencia de inhibidores de PCR), diferencias de pureza entre los lotes de reactivos, errores de pipeteo, precisión de las temperaturas alcanzadas durante la PCR, tiempos adecuados en la duración de cada paso de PCR, y velocidad en los cambios de temperaturas durante la amplificación. Los instrumentos utilizados (termocicladores, pipetas,...) deben revisarse rutinariamente para asegurar su buen funcionamiento, y los reactivos (tubos, enzimas, agua,...) deben ser adecuados para uso molecular.

Una gran robustez del método es un buen indicador de una alta reproducibilidad interlaboratorio.

#### 4.4. Controles de amplificación

En cualquier prueba diagnóstica es fundamental el uso de controles positivos y negativos. Es necesaria la utilización en cada experimento de un control negativo que incluya todos los reactivos necesarios en la reacción excepto el ADN problema (NTC, *non template control*), de este modo se pueden detectar los falsos positivos por contaminación. También es necesaria la inclusión de un control positivo que contenga la secuencia diana, para poder confirmar que la amplificación se ha realizado correctamente.

La presencia de inhibidores de la PCR puede ser detectada si se utiliza un control interno de amplificación. Un control interno de amplificación es un fragmento de ADN diferente del de la secuencia diana que se incluye en el mismo tubo de reacción y se amplifica simultáneamente con la secuencia diana. Deben diferenciarse uno del otro o bien visualmente en una PCR convencional, o en una PCR a tiempo real bien porque son detectados con sondas específicas marcadas con fluoróforos diferentes o porque tienen distinta temperatura de disociación.

Existen muchos tipos de controles internos y diferentes estrategias para diseñarlos. Los CI se pueden clasificar en controles endógenos y exógenos (Espy MJ *et al.*, 2006). Los controles endógenos son aquellos que están presentes de manera natural en la muestra original, como por ejemplo un gen *housekeeping*. Los controles exógenos son los que no están presentes de manera natural y son añadidos a la muestra. Otra forma de clasificar los controles internos es en controles competitivos y no competitivos (Hoorfar J *et al.*, 2004). Los CI competitivos son aquellos que amplifican a la vez que la secuencia diana porque ambos se amplifican con la misma pareja de iniciadores bajo las mismas condiciones y en el mismo tubo de PCR. Por lo tanto, existirá una competición entre ambos fragmentos por los iniciadores. Cuando un CI es no competitivo, la secuencia diana y el CI utilizan distintos iniciadores para amplificar. En este caso se producen dos reacciones simultáneas con cinéticas diferentes en una misma PCR, que no se verá influenciada por una competición por los iniciadores. La utilización de este tipo de controles internos es un poco más compleja ya que hay que optimizar dos reacciones de amplificación. Hay que tener muy en cuenta la concentración de los iniciadores que amplifican el CI, teniendo que utilizar la

mínima concentración de ellos para no favorecer la amplificación del CI. Normalmente estos controles internos suelen ser ADN creados sintéticamente pero también pueden ser algún gen como un *housekeeping* que esté siempre presente en la bacteria (Kellogg DE *et al.*, 1990; Noonan KE *et al.*, 1990; Niesters HG, 2002).

Hay diferentes maneras para crear controles internos competitivos. Una de las formas más sencillas es mediante la técnica de iniciadores compuestos o quiméricos (como se les ha denominado en este trabajo), utilizando los mismos iniciadores que se utilizan para amplificar el ADN diana (Siebert PD y Larrick JW, 1992). Suelen ser fragmentos de ADN sin relevancia que se añaden a la mezcla de PCR y que poseen en sus extremos las secuencias de unión de los iniciadores (los mismos iniciadores que se utilizan para amplificar la secuencia diana), y una secuencia interna diferente a la secuencia diana. Este tipo de controles internos pueden sintetizarse de manera sencilla mediante PCR con los iniciadores quiméricos y tras su purificación ser usados directamente (Hoorfar J *et al.*, 2000), o también pueden sintetizarse mediante PCR y luego ser clonados en un plásmido (Lübeck PS *et al.*, 2003). Otra manera de sintetizar un CI es modificando la secuencia interna que amplifican los iniciadores mediante delección, inserción o modificando la secuencia mediante variación nucleotídica (Sachadyn P y Kur J, 1998; Abdulmawjood A *et al.*, 2002). Este método es muy laborioso y largo. Además el modificar algunos nucleótidos para que la secuencia del CI difiera del de la secuencia diana requiere una metodología de mutagénesis por PCR bastante complicada que no todo el personal de los laboratorios puede realizar. Una contraindicación de esta técnica es que pueden darse hibridaciones entre el CI y el fragmento diana debido a la similitud entre ambas secuencias (Sachadyn P y Kur J, 1998). La técnica de solapamiento por extensión (*overlap extension technique*) (Horton RM *et al.*, 1989) es otra metodología que también se puede utilizar para construir controles internos. La secuencia sintetizada puede posteriormente ser insertada en un plásmido (Betsou F *et al.*, 2003). Otro método es mediante el solapamiento de oligonucleótidos que contienen la secuencia completa del CI mediante el fragmento Klenow (Rosenstraus M *et al.*, 1998; Malorny B *et al.*, 2003b).



#### **4.5. Contaminación**

Un método alternativo basado en PCR debe tener un riesgo de contaminación cruzada mínimo. Para ello se deben utilizar áreas de trabajo separadas, se deben disminuir los pasos de pipeteo y se deben utilizar puntas de pipeta con filtro. La PCR a tiempo real también puede ser una buena alternativa para disminuir el riesgo de contaminación cruzada, ya que la amplificación es monitorizada mediante fluorescencia en los mismos tubos donde tiene lugar la reacción y no hace falta abrirlos para detectar los amplicones (Foy CA y Parkes HC, 2001).

#### **4.6. Flexibilidad de las matrices alimentarias**

El mayor obstáculo que surge en los métodos basados en PCR es el procesado pre-PCR de la muestra y la falta de flexibilidad en lo que respecta a la aplicabilidad en diferentes matrices alimentarias. Por lo tanto, un método de PCR bien estandarizado debe incluir un método de preparación de la muestra dirigido, por ejemplo, a concentrar los microorganismos diana y/o a eliminar los efectos de las sustancias inhibidoras de la PCR.

#### **4.7. Aceptación por el usuario final**

El mayor beneficio de un método validado o estandarizado vendrá con su expansión, aceptación y adopción por el usuario. Además de la importancia de que un método esté validado, es importante también que ninguno de los métodos o reactivos necesarios estén restringidos o que no estén al alcance de los posibles usuarios. Otro aspecto importante es que el método debe ser presentado en un modelo sencillo acompañado de protocolos fácilmente accesibles tanto para la aplicación como para la interpretación.

#### **4.8. Otros requisitos**

Otros criterios a tener en cuenta en el diseño de métodos de PCR para la detección de patógenos es que deben ser métodos rápidos, simples en el manejo y de bajo coste.

## **5. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO**

Hoy en día existen numerosos y muy diversos métodos alternativos diseñados para realizar el análisis de alimentos. Existen en diferentes formatos y de distintas marcas comerciales, y la mayoría de ellos ofrecen resultados equivalentes a los obtenidos con los métodos de referencia. Por eso mismo, a la hora de elegir el método que más se adecua al propósito en un determinado contexto, saltan las dudas y las dificultades en la elección. Los criterios de selección pueden ayudar en la elección del método más apropiado para cada situación específica. Según Jasson V y colaboradores (2010), los criterios de selección se basan tanto en un punto de vista técnico como también gerencial, siendo esos criterios los que se describen a continuación:

### 1) Objetivo del análisis microbiológico:

El objetivo por el cual se realiza el análisis microbiológico dependerá del tipo de participante, inversor o industria que lo llevará a cabo.

Hay que tener en cuenta el propósito que tendrá ese análisis microbiológico. Normalmente suele ser la monitorización de las muestras, las actividades de control o las alertas microbiológicas.

Es importante saber el tipo de muestra que se va a analizar ya que puede afectar al desempeño del método. El tipo de materia prima (carne, pescado, productos diarios,...) y el procesado del alimento (crudo, seco, con tratamiento térmico,...) tienen mucha influencia en el tipo y cantidad de flora competidora y del microorganismo diana. Algunas matrices alimentarias pueden contener componentes capaces de inhibir la reacción de PCR, otras pueden tener una alta presencia de flora endógena con características similares a las del microorganismo diana, y que pueden producir resultados inespecíficos.

### 2) Criterios de selección gerenciales:

Los factores que se tienen en cuenta por la vía administrativa o de gerencia son principalmente el tiempo total de obtención de los resultados y

el coste del método. Tanto el tiempo como el coste tienen que ser el menor posible. No solo hay que tener en cuenta el coste por muestra, sino que también es importante el coste de mantenimiento de los equipos y el del personal cualificado.

3) Criterios de selección técnicos:

Hay que tener en cuenta las características del método, como la especificidad, la sensibilidad, la precisión analítica o el límite de detección. Una situación ideal sería un método con una especificidad y una sensibilidad del 100%, pero realmente en todos los métodos no se suele dar esta situación, o por lo menos no para todos los tipos de matrices alimentarias. Generalmente, valores de sensibilidad por encima del 95% se consideran aceptables para un método (Qvist S, 2007).

En los análisis de rutina, en los que hay un número alto de muestras, es interesante que los análisis se hagan en equipos específicos, que el proceso esté automatizado y que el personal esté entrenado y cualificado.

Las infraestructuras requeridas en cada caso están muy relacionadas con el nivel de bioseguridad requerido en el laboratorio y el tipo de trabajo que se realice. Para realizar la detección de patógenos se necesita por lo menos un laboratorio de nivel 2, y dependiendo del trabajo que se realice es conveniente separar las áreas de trabajo en el laboratorio.

4) Sustentabilidad del método:

Puede ocurrir que al aplicar los anteriores criterios para la selección de un método aun se deba elegir entre varios métodos que puedan ser de interés, por lo tanto es conveniente fijarse en criterios como la logística o la credibilidad del suministrador (control de calidad de los consumibles, acceso al soporte técnico y administrativo, accesibilidad en comunicación,...).

## 6. GENÓMICA DE *Salmonella*

En los últimos años se ha realizado la secuenciación completa o están en proceso de secuenciación una gran cantidad de genomas de *Salmonella*. Esto hace posible que se puedan estudiar mejor los genes que forman parte de esos genomas, y lo que es muy importante, sus funciones. Hoy en día hay 21 cepas de *Salmonella* totalmente secuenciadas (Tabla 2) según datos aportados por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), pero además existen otros 125 proyectos de secuenciación en marcha, en algunos de esos genomas la secuenciación ya ha sido terminada y está en proceso de anotación y/o publicación. De todas formas, generalmente se suelen ir poniendo a disposición del público los datos que se van obteniendo, incluso antes de que los datos sean anotados y publicados.

Cepa de <i>Salmonella</i> secuenciada	Nº de acceso	Referencia
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> serotipo 62:z4,z23:- cepa RSK2980	NC_010067	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Agona cepa SL483	NC_011149	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Choleraesuis cepa SC-B67	NC_006905	Chiu CH <i>et al.</i> , 2005
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Dublin cepa CT_02021853	NC_011205	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Enteritidis cepa P125109	NC_011294	Thomson NR <i>et al.</i> , 2008
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Gallinarum cepa 287/91	NC_011274	Thomson NR <i>et al.</i> , 2008
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Heidelberg cepa SL476	NC_011083	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Newport cepa SL254	NC_011080	Welch TJ <i>et al.</i> , 2007
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi A cepa AKU_12601	NC_011147	Holt KE <i>et al.</i> , 2009
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi A cepa ATCC 9150	NC_006511	McClelland M <i>et al.</i> , 2004
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi B cepa SPB7	NC_010102	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi C cepa RKS4594	NC_012125	Liu WQ <i>et al.</i> , 2009

**Tabla 2.** Genomas de *Salmonella* secuenciados completamente hasta la fecha según información aportada por el NCBI.

Cepa de <i>Salmonella</i> secuenciada	Nº de acceso	Referencia
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Schwarzengrund cepa CVM19633	NC_011094	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhi cepa CT18	NC_003198	Parkhill J <i>et al.</i> , 2001
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhi cepa Ty2	NC_004631	Deng W <i>et al.</i> 2003
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa LT2	NC_003197	McClelland M <i>et al.</i> , 2001
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa D23580	FN424405	Kingsley RA <i>et al.</i> , 2009
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa 14028S	CP001363	Jarvik T <i>et al.</i> , 2010
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa 4/74	CP002487	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa SL1344	FQ312003	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium cepa UK-1	CP002614	-

**Tabla 2 (continuación).** Genomas de *Salmonella* secuenciados completamente hasta la fecha según información aportada por el NCBI.

El género *Salmonella* incluye serotipos estrechamente relacionados que causan enfermedades tanto en humanos como en animales. Mucho antes de los estudios de secuenciación de genomas completos, los estudios de hibridación ya indicaban que los más de 2500 serotipos de *Salmonella* compartían más del 90% del contenido total de ADN. Estos estudios también indicaban que la mayoría de los genes presentes en *Salmonella* también estaban presentes en *Escherichia coli*. La secuenciación de los genomas ha demostrado que estas dos bacterias tienen una homología media del 80% (Edwards RA *et al.*, 2002).

Aunque los serotipos de *Salmonella* están estrechamente relacionados genéticamente, existen diferencias importantes entre ellos, sobre todo con respecto a su virulencia y epidemiología. La mayoría de los serotipos solo causan gastroenteritis, mientras que los serotipos tifoideos como *Salmonella* Typhi o *Salmonella* Paratyphi A, B o C causan fiebre entérica. Otros serotipos no-tifoideos son más propensos a causar bacteriemia en vez de gastroenteritis (*Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Dublin). Algunas salmonelas son específicas de un solo hospedador, como por ejemplo *Salmonella* Typhi que solo infecta a humanos o *Salmonella* Pullorum que solo infecta a pollos. Pero también hay salmonelas

adaptadas a un amplio rango de hospedadores (más generalistas) que pueden infectar a una gran variedad de animales y además causar diferentes síntomas en ellos (Fierer J y Guiney DG, 2001; Edwards RA *et al.*, 2002). Por eso, aunque los serotipos de *Salmonella* estén estrechamente relacionados genéticamente y compartan algunos factores de virulencia (por ejemplo, factores involucrados en la infección intestinal), los diferentes serotipos presentan factores de virulencia únicos que son los que les conceden la especificidad de hospedador y de sintomatología. Se estima que aproximadamente entre 500-600 kb de ADN cromosómico es único de cada serotipo, lo cual representa entre el 10-12% de sus genomas de aproximadamente 5 Mb. Estas regiones únicas están distribuidas en diferentes lugares a lo largo del cromosoma y varían su tamaño entre 1 y 50 kb (Edwards RA *et al.*, 2002).

Probablemente estas regiones únicas que generan la diversidad entre los serotipos se hayan adquirido por transferencia horizontal de genes (traspaso de material genético foráneo a una célula receptora), seguramente después de la divergencia entre *Salmonella* y *Escherichia coli*. En las bacterias la transferencia horizontal de genes ocurre por tres mecanismos: conjugación, transformación y transducción (Porwollik S y McClelland M, 2003). En la conjugación el ADN se transfiere mediante contacto directo célula a célula entre la célula donante y la receptora. Normalmente el ADN es transferido mediante plásmidos o transposones conjugativos. La transformación es la captación directa de ADN desnudo del medio por la célula receptora. La transducción es la transferencia de material genético de una célula a otra mediada por bacteriófagos.

En este grupo de genes adquiridos por transferencia horizontal se incluyen entre otros los elementos genéticos móviles denominados islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, *Salmonella pathogenicity island*). Estas islas de patogenicidad tienen un papel muy importante durante el proceso de infección ya que codifican, entre otros elementos, componentes estructurales del sistema de secreción de tipo III (T3SS) y también proteínas efectoras transportadas por el sistema de secreción; por lo tanto, ayudan a la bacteria en la colonización e invasión de la mucosa. Hasta la fecha se han identificado 12 SPI en diferentes serotipos, pero solamente las 5 islas de patogenicidad descritas en *S. enterica* serotipo Typhimurium LT2 están bien caracterizadas (Sánchez-Jiménez MM *et al.*, 2010),

cuyas características se describen a continuación (Porwollik S y McClelland M, 2003; van Asten AJ y van Dijk JE, 2006):

- SPI-1: se encuentra en la región STM2861-STM2908 y codifica un sistema de secreción de tipo III que es activo en contacto con la célula del huésped.
- SPI-2: está localizada en STM1379-STM1421 y también codifica un sistema de secreción de tipo III. Esta isla está muy relacionada con la habilidad de causar infecciones sistémicas y con la proliferación dentro de los órganos del huésped. También está relacionada con la habilidad para sobrevivir en las células fagocíticas y con la capacidad de replicarse dentro de las vesículas que envuelven las células de *Salmonella* dentro de las células eucariotas.
- SPI-3: esta isla está localizada en STM3752-STM3764. Algunos de sus genes están involucrados en el transporte de magnesio y son necesarios para conseguir la virulencia completa y la supervivencia en macrófagos.
- SPI-4: la participación de los genes de esta isla de patogenicidad (STM4257-STM4262) en la virulencia parece ser de menor relevancia. Aunque se sospecha que la SPI-4 comprende un sistema de secreción de tipo I relacionado con la supervivencia en macrófagos, la función exacta de sus genes no se conoce todavía.
- SPI-5: la participación de los genes de esta isla (STM1087-STM1097) en la virulencia también parece ser de menor relevancia. La SPI-5 alberga la proteína efectora SopB que es exportada por el sistema de secreción de tipo III codificado por la SPI-1. Esta proteína tiene un efecto sobre la respuesta celular, estimulando la llegada de neutrófilos al epitelio intestinal e induciendo la secreción de fluidos (Wood MW *et al.*, 1998).

### **6.1. Isla de patogenicidad de *Salmonella* de tipo 1 (SPI-1)**

La SPI-1 es una región de 40 kb de ADN necesaria para la invasión de las células epiteliales del intestino, un rasgo importante en la virulencia de *Salmonella enterica*. Tiene una composición del 47% de G+C, que es menor al contenido total de G+C del genoma de *Salmonella* (52%). La diferencia del

contenido G+C es característica de los elementos adquiridos por transferencia lateral. La SPI-1 codifica un sistema de secreción de tipo III (T3SS) que transporta las proteínas efectoras bacterianas al citosol de la célula hospedadora. Estas proteínas modifican las vías de transducción de señales que provocan la reorganización temporal del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora. Seguido de estas modificaciones localizadas del citoesqueleto, se producen cambios en la superficie de la célula hospedadora que provocan alteraciones en la membrana generando una especie de ampollas. Como consecuencia de esto, las células no fagocíticas (en este caso las células epiteliales) internalizan partículas grandes como bacterias (en este caso a *Salmonella*) mediante un proceso llamado macropinocitosis (Fierer J y Guiney DG, 2001; Schmidt H y Hensel M, 2004).

Por lo tanto, se postula que el papel más importante de la SPI-1 durante el proceso de infección de *Salmonella* es mediar la invasión de las células epiteliales del intestino. Además, se ha visto que mutaciones en el sistema de secreción codificado por la SPI-1 reducen la virulencia en modelos de infección oral, pero que siguen manteniendo la virulencia si se administran sistémicamente (Fierer J y Guiney DG, 2001). Aunque la principal función de la SPI-1 sea mediar la invasión de las células epiteliales se ha demostrado que su función también está relacionada con los síntomas diarreicos (Schmidt H y Hensel M, 2004).

Aunque la mayoría de los genes de la SPI-1 están relacionados con funciones del sistema de secreción tipo III, se codifican también algunos genes que no tiene que ver con este sistema.

## **6.2. Sistema de secreción de tipo III (T3SS)**

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es un sistema macromolecular complejo compuesto por más de 20 proteínas. La función principal del T3SS es la translocación de proteínas efectoras de la bacteria a través de tres membranas (las bacterianas y la de la célula eucariota) al citoplasma de la célula hospedadora. Este proceso requiere el contacto entre las células patógenas y las células diana. Esta maquinaria de secreción parece estar muy conservada en diferentes bacterias (Schmidt H y Hensel M, 2004; Lilic M *et al.*, 2010).



El componente central del T3SS es el *needle complex* (de un mega-dalton de tamaño), una estructura multiproteica compuesta tanto por proteínas solubles como por proteínas de membrana que media el paso de las proteínas efectoras a través de la envoltura bacteriana. Es de forma cilíndrica y está compuesto por una base formada por dos pares de anillos anclados a las membranas exterior e interior de la envoltura bacteriana, y por una extensión en forma de aguja denominada *needle* que sobresale de la superficie bacteriana y tiene forma de tubo hueco y recto. La base y la estructura en aguja o *needle* se unen entre sí mediante otra subestructura denominada *inner rod*, que es como una especie de gatillo o varilla (Kubori T *et al.*, 2000; Schraidt O *et al.*, 2010). Si la base no se ensambla correctamente con el *needle* y el *inner rod*, el sistema de secreción estará incompleto y no funcionará como tal.

El ensamblaje del *needle complex* ocurre de forma secuencial. Primero se ensambla la subestructura de la base, que empieza a funcionar como una máquina de secreción aunque solo de proteínas necesarias para el ensamblaje del *inner rod* y del *needle*. A continuación, se ensamblan el *inner rod* y el *needle* a la subestructura de la base. Una vez ensamblado todo el sistema, cambia la especificidad de los sustratos y se vuelve competente para realizar la secreción de las proteínas efectoras (Schraidt O *et al.*, 2010).

En *Salmonella Typhimurium* LT2 hay al menos dos T3SS, uno está codificado por SPI-1 y media la interacción inicial de la bacteria con el epitelio intestinal, permitiendo la invasión de esas células por las bacterias.; y el otro está codificado por SPI-2 y es necesario para producir una infección sistémica (Kubori T *et al.*, 2000).

Estudios genéticos y bioquímicos han establecido que el *needle complex* que codifica la SPI-1 está compuesto por las proteínas PrgH, PrgK y InvG que forman la base, y por PrgI y PrgJ que constituyen el *needle* y el *inner rod* respectivamente (Kubori T *et al.*, 2000).

### 6.3. Gen *invA*

La proteína InvA pertenece al conjunto de proteínas de membrana interna que componen el *needle complex*, que es a su vez el componente central del T3SS. El papel de InvA, su importancia y como funciona exactamente en el T3SS todavía no es del todo conocido (Lilic M *et al.*, 2010).

Se sabe que el locus *inv* es esencial en *Salmonella* para la invasión de las células epiteliales (Galán JE y Curtiss III R, 1989). El gen *invA* es uno de los 15 genes identificados en ese locus y el primero del operon *invABC*. Codifica un componente altamente conservado del sistema de secreción de tipo III. Se cree que de algún modo la proteína InvA participa en el ensamblaje de la base del *needle complex* con el *needle* y el *inner rod*, formando de este modo la estructura del sistema de secreción de tipo III necesaria para la invasión de *Salmonella* de las células epiteliales del intestino.

Las mutaciones en el gen *invA* reducen significativamente la habilidad de *Salmonella* para entrar en las células epiteliales, pero sin afectar los niveles de unión a esas células. Esto se debe a que las cepas mutantes *invA* son completamente defectuosas en el sistema de secreción de tipo III. Las cepas mutantes tienen en la envoltura bacteriana la estructura de la base del *needle complex* aparentemente intacta, pero tienen una carencia total del *needle*. Como consecuencia, estas cepas no son capaces de formar el *needle complex* y por lo tanto, de invadir las células epiteliales (Kubori T *et al.*, 2000). En estudios realizados por Galán JE y colaboradores (1992) se observó que las cepas mutantes *invA* eran capaces de unirse a las células epiteliales pero que no desencadenaban los cambios morfológicos en la superficie de las células epiteliales, no producían los cambios en la distribución de la actina del citoesqueleto y que tampoco inducían el incremento de calcio, todos ellos cambios necesarios para entrar en las células.

También se ha sugerido que la proteína InvA podría participar directamente en el desencadenamiento de las vías de transducción de señales que conducen a la endocitosis del microorganismo (Galan JE *et al.*, 1992).

El gen *invA* siempre ha sido uno de los genes más utilizados en la identificación y diagnóstico de *Salmonella*. Muchos investigadores lo han elegido para desarrollar técnicas moleculares de detección basadas en PCR y PCR a tiempo real entre otras. Esto se debe principalmente a que es un gen altamente conservado, la diversidad de su secuencia nucleotídica es similar a la de los genes *housekeeping* (Boyd EF *et al.*, 1997), y que está presente y es funcional en la mayoría de los serotipos de *Salmonella*, o por lo menos en todos los serotipos patógenos. Además, contiene secuencias únicas de *Salmonella* por lo que es un gen muy útil como diana genética en técnicas de PCR (Rahn K *et al.*, 1992).

# OBJETIVOS

---



Basándonos en lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta la necesidad de crear métodos que faciliten y disminuyan el tiempo de obtención de los resultados en la detección de patógenos alimentarios, los objetivos principales del presente trabajo de Tesis Doctoral han sido:

1. Desarrollar un método rápido de detección de *Salmonella* basado en la técnica de PCR.
  - 1.1. Elegir una diana genética específica del género *Salmonella* para su utilización como marcador específico de la detección de esa bacteria mediante técnicas de PCR.
  - 1.2. Desarrollar un sistema de PCR convencional para el diagnóstico de *Salmonella*.
  - 1.3. Desarrollar un sistema de PCR a tiempo real basado en sondas TaqMan® para detectar *Salmonella*.
  - 1.4. Desarrollar un sistema de PCR a tiempo real mediante SYBR Green I para detectar *Salmonella*.
2. Realizar una validación de los métodos de PCR a tiempo real diseñados frente al método tradicional de detección de *Salmonella* en muestras alimentarias.
3. Comparar la capacidad de detectar *Salmonella* en muestras de alimentos de los métodos de PCR a tiempo real diseñados en este trabajo con diferentes kits comerciales para detección de *Salmonella* que también están basados en la técnica de PCR a tiempo real.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

---





## **1. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS**

Los microorganismos utilizados a lo largo del estudio pertenecían en su gran mayoría a la colección propia del equipo de investigación, procedentes de donaciones aportadas por las áreas de microbiología de hospitales y otros centros de investigación. Estas cepas son de diversos orígenes, tanto de aguas, como de alimentos, así como también de muestras clínicas. Otros microorganismos adicionales fueron proporcionados por la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT).

Los microorganismos fueron mantenidos y conservados tanto a temperatura ambiente como en congelación. Para la conservación a temperatura ambiente se utilizó medio TSA (Pronadisa, Alcobendas, España) al 50% en tubos con tapón de rosca y protección con Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, Illinois, USA) para evitar la evaporación. Para la conservación en congelación, 1 ml de crecimiento bacteriano de 24 horas en caldo TSB se mezcló con un 250 µl de glicerol. Estos viales se almacenaron a -80°C.

## **2. DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DE *Salmonella* BASADO EN LA TÉCNICA DE PCR**

### **2.1. Extracción del ADN bacteriano**

Las extracciones de ADN se realizaron mediante Chelex®100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) al 6%. El método consistió en centrifugar 1 ml del crecimiento bacteriano, realizado en TSB (Pronadisa) durante aproximadamente 24 horas, durante 5 minutos a 13.000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en 300 µl de Chelex®100 al 6% y se incubó a 56°C durante 20 minutos. Tras esta incubación, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se transfirieron seguidamente a hielo. Tras una nueva centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos, 200 µl del sobrenadante se transfirieron a otro tubo estéril. Estas extracciones se guardaron a -20°C hasta su utilización.

## 2.2. Selección del gen diana para utilizar en la detección de *Salmonella*

### 2.2.1. Genes ensayados

Para el estudio se eligieron una serie de genes, descritos en la bibliografía, como posibles dianas para el desarrollo de técnicas capaces de detectar *Salmonella* mediante PCR. Los iniciadores utilizados para la amplificación de cada gen, así como el tamaño del producto amplificado, se muestran en la Tabla 3.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Diana	Amplificación (pb)	Referencia
SDnaK1	GGCAGTCGGTTCGTTGATGATA	<i>dnaK</i>	236	Simpkins SA <i>et al.</i> , 2000
SDnaK2	CTTGATGTGAAAGGTCAGA			
MINf	ACGGTAACAGGAAGMAG	16S rRNA	402	Trkov M <i>et al.</i> , 2003
MINr	TATTAACCACAACACCT			
139	GTGAAATTATCGCCACGTTGGGCAA	<i>invA</i>	284	Rahn K <i>et al.</i> , 1992
141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC			
S18	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT	<i>ompC</i>	159	Kwang J <i>et al.</i> , 1996
S19	AGACGTGGACGGGTTGCTGCTGCCGTT			

**Tabla 3.** Genes elegidos como posibles dianas genéticas para la detección de *Salmonella*. En la tabla se muestran los nombres de los genes y la pareja de iniciadores que se utilizaron para amplificarlos. También se muestra el tamaño del producto de amplificación esperado y la referencia correspondiente.

### 2.2.2. Protocolo de amplificación por PCR

Las condiciones de la PCR fueron similares para las pareja de iniciadores del apartado anterior, variando únicamente la temperatura de anillamiento en función de la T<sub>m</sub> (temperatura de disociación) de los iniciadores.

La mezcla de reactivos utilizados en la reacción fue la indicada en la Tabla 4. El volumen final de reacción fue de 25 µl en los que se añadió 2 µl de ADN.

Reactivos	Concentración final
Tampón de PCR	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	200 μM
Iniciadores	400 pM (de cada uno)
<i>Taq</i> polimerasa	0,75U
ADN	2 μl
Agua ultrapura	Hasta 25 μl

**Tabla 4.** Mezcla de reactivos empleados en la reacción de PCR utilizada para la elección de la diana genética para detección de *Salmonella*.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). El protocolo de PCR utilizado consistió en 1 ciclo de 95°C durante 1 minuto, 38 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 30 segundos a la temperatura específica para cada pareja de iniciadores y 72°C durante 30 segundos, y por último un paso a 72°C durante 4 minutos. Para los iniciadores del gen *dnaK* se utilizó una temperatura de anillamiento de 50°C, para el gen 16S rRNA fue de 60°C y para el gen *invA* de 64°C. Para el gen *ompC* la temperatura de anillamiento fue inicialmente de 58°C, pero posteriormente se disminuyó la temperatura de anillamiento hasta 56°C para mejorar los resultados. En este caso, también se probó el programa de PCR con 35 y con 30 ciclos.

### 2.2.3. Electroforesis y visualización de los productos amplificados

La visualización de los productos de amplificación se llevó a cabo en geles de agarosa (Pronadisa) al 2% en tampón de electroforesis TBE 1X (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). El volumen de carga utilizado fue de 10 μl, previamente mezclados con 2 μl de tampón de carga (Sigma-Aldrich Co.). El marcador de peso molecular utilizado fue el 100 Base-Pair Ladder de GE Healthcare (United Kingdom). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 voltios durante 75 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2 μg/ml) durante 20 minutos y su visualización se realizó en un transiluminador de luz UV (Ultralum, Claremont, CA, USA).

### 2.2.4. Cepas utilizadas

Para realizar la elección del gen diana para la detección de *Salmonella* se utilizaron 5 cepas diferentes de *Salmonella enterica*, además de una *Escherichia*

*coli* como control negativo de amplificación (Tabla 5). Las cepas utilizadas fueron las mismas en todas las reacciones de amplificación.

Código Cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Fagotipo
128	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	104
165	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	1
199	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	1
250	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	48:r:z	
268	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	
CECT 679	<i>Escherichia coli</i>			

Tabla 5. Cepas utilizadas para la elección del gen diana.

El ADN bacteriano utilizado en estas amplificaciones fue obtenido mediante el método descrito en el apartado 2.1.

### 2.3. Diseño de una PCR para la detección de *Salmonella*

La PCR para la detección de *Salmonella* se creó utilizando la pareja de iniciadores anteriormente descrita por Rahn K y colaboradores (1992). Estos iniciadores amplifican una zona del gen *invA* de 285 pb.

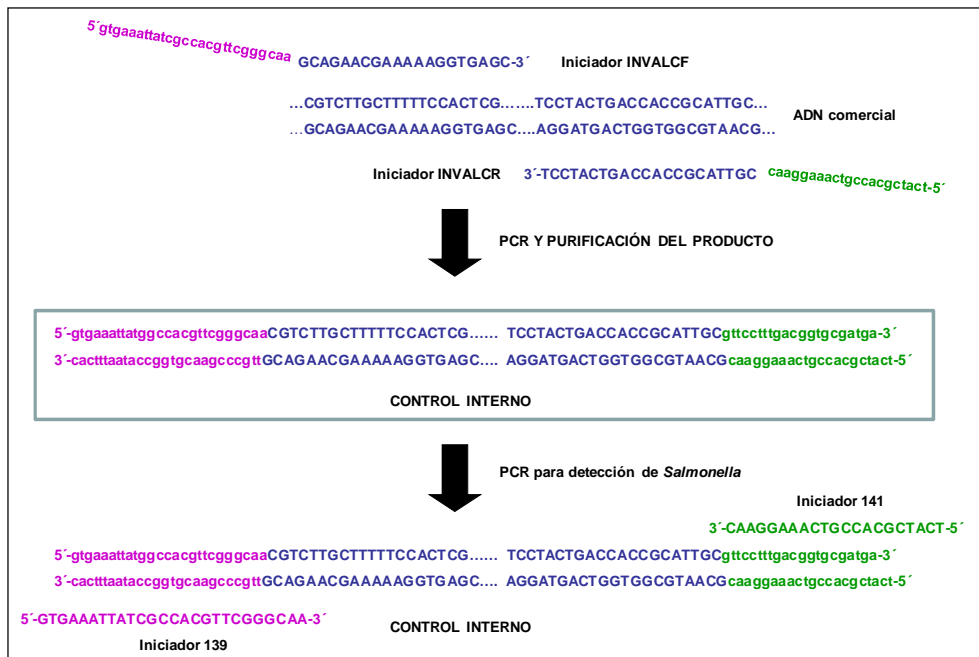
#### 2.3.1. Diseño de un control interno de amplificación

Se diseñó un control interno de amplificación (CI) siguiendo una estrategia análoga a la seguida por Hoorfar J y colaboradores (2000). Al igual que estos autores, se diseñó una pareja de iniciadores quiméricos. La mitad interna de esos iniciadores (específicos de una secuencia de 20 pb que corresponde al fragmento 13551-13570 de fago  $\lambda$  y otra secuencia de 20 pb que corresponde al fragmento 14556-14575) estaba dirigida a amplificar un fragmento de 985 pb de una muestra comercial de fago  $\lambda$  (Sigma-Aldrich Co.), mientras que la mitad más externa de la secuencia de los iniciadores quiméricos se correspondía con los iniciadores utilizados en la amplificación por PCR del gen *invA* (iniciador 139 y 141, Tabla 3). La secuencia de estos iniciadores quiméricos se muestra en la Tabla 6.

Iniciadores	Secuencia (5'→3')
INVALCF	gtgaaattatcgccacgttctcgggcaaGCAGAACGAAAAAGGTGAGC
INVALCR	tcatcgaccgtcaaggaacCGTTACGCCACCAGTCATCCT

**Tabla 6.** Iniciadores quiméricos utilizados para la creación del control interno. En mayúsculas aparecen las secuencias que pertenecen al fago λ (que fue utilizado como ADN molde para la síntesis del CI), y en minúsculas, en color morado y verde, las secuencias pertenecientes a los iniciadores 139 y 141 respectivamente (usados para la amplificación del gen *invA*).

En la Figura 4 se muestra un esquema del método seguido para diseñar y crear este tipo de controles internos.



**Figura 4.** Esquema seguido en la síntesis del control interno. A partir de una pareja de iniciadores quiméricos (INVALCF e INVALCR) y ADN de fago λ se sintetizó un fragmento denominado control interno. Tras su purificación, el control interno se pudo utilizar en las posteriores reacciones de amplificación para la detección de *Salmonella*.

Para la síntesis del CI se realizó una PCR en la que se utilizó la mezcla de reactivos detallada en la Tabla 7. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, donde como ADN molde se utilizó 1 µl de ADN de fago λ digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (Sigma-Aldrich Co.). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene) en las condiciones que se presentan en la Tabla 7.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Tampón de PCR	1X	95°C	01:00	1
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	95°C	00:30	35
dNTPs	200 µM	60°C	00:30	
Iniciadores	0,4 µM (de cada uno)	72°C	01:00	
<i>Taq</i> polimerasa	0,75U	72°C	10:00	1
ADN λ	1 µl			
Agua ultrapura	Hasta 25 µl			

**Tabla 7.** Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para realizar la síntesis del control interno.

La electroforesis y la visualización del gel se realizaron del modo descrito en el apartado 2.2.3. La banda obtenida se purificó con el kit QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A este producto purificado de 1025 pb se le llamó control interno y se guardó a -20°C hasta su utilización.

### 2.3.1.1. Límite de detección del control interno

Se ensayaron diferentes diluciones del control interno para determinar la más apropiada para su utilización en la PCR para la detección de *Salmonella*. Se realizaron diluciones decimales hasta llegar a la dilución 10<sup>-7</sup>.

El programa y condiciones de PCR empleados fueron los mismos que los descritos en el apartado 2.2.2 para la amplificación del gen *invA*, pero en este caso añadiendo a la mezcla de reactivos 1 µl del control interno.

### 2.3.2. Optimización de la PCR para la detección de *Salmonella*

Las condiciones de PCR del apartado anterior fueron utilizadas como base para seleccionar las condiciones óptimas de la PCR. Estos ajustes se realizaron con el ADN de 3 cepas diferentes: *Salmonella* Typhimurium DT104, *Salmonella* Enteritidis PT1 y *Escherichia coli*.

Los parámetros que se optimizaron fueron tanto el número de ciclos (reduciéndolo) como la temperatura de anillamiento (aumentándola).

### 2.3.3. Condiciones optimizadas de la PCR

Las condiciones optimizadas para la amplificación por PCR y el programa de amplificación final se muestran en la Tabla 8. Estas condiciones fueron las que se utilizaron posteriormente en el ensayo de validación de la técnica.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Tampón de PCR	1X	95°C	01:00	1
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	95°C	00:30	30
dNTPs	200 µM	66°C	00:30	
Iniciadores	400 pM (de cada uno)	72°C	00:30	
Control interno	1 µl (dilución 10 <sup>-4</sup> )	72°C	04:00	1
<i>Taq</i> polimerasa	0,75U			
ADN	1 µl			
Agua ultrapura	Hasta 25 µl			

**Tabla 8.** Mezcla de reactivos optimizada y programa de amplificación final de la reacción de PCR utilizada para la detección de *Salmonella*.

### 2.3.4. Ensayo de validación de la PCR para detección de *Salmonella*

Se procedió a valorar la técnica desarrollada con una batería de 50 cepas diferentes pertenecientes tanto a cepas de *Salmonella* como a otros microorganismos relacionados (Tabla 9). Todas las muestras se analizaron a la vez en la misma tanda de amplificación y en las condiciones descritas en el apartado anterior. Se incluyó también un control negativo de amplificación sin ADN.

Todas las muestras de ADN utilizadas se obtuvieron mediante extracción con Chelex®, método descrito anteriormente en el apartado 2.1.



Nº PCR	CÓDIGO CEPA	ESPECIE	SUBESPECIE	SEROTIPO	FAGOTIPO
1	ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>			
2	CECT 158T	<i>Hafnia alvei</i>			
3	CECT 481T	<i>Enterococcus</i>			
4	CECT 484	<i>Proteus</i>			
5	CECT 583	<i>Shigella boydii</i>			
6	CECT 679	<i>Escherichia coli</i>			
7	C1	<i>Citrobacter</i>			
8	E1	<i>Enterobacter</i>			
9	K1	<i>Klebsiella</i>			
10	P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
11	7	<i>Salmonella</i>	I	Virchow	
12	8	<i>Salmonella</i>	I	Miami	
13	11	<i>Salmonella</i>	I	Virchow	
14	238	<i>Salmonella</i>	I	Cubana	
15	241	<i>Salmonella</i>	I	Braenderup	
16	252	<i>Salmonella</i>	I	Infantis	
17	262	<i>Salmonella</i>	I	Bredeney	
18	263	<i>Salmonella</i>	I	Agona	
19	271	<i>Salmonella</i>	I	Anatum	
20	10	<i>Salmonella</i>	I	Abony	
21	59	<i>Salmonella</i>	I	Dublin	
22	2	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	4
23	85	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	1
24	158	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	6
25	165	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	1
26	187	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	25
27	199	<i>Salmonella</i>	I	Enteritidis	4
28	69	<i>Salmonella</i>	I	Typhimurium	96
29	74	<i>Salmonella</i>	I	Typhimurium	12
30	128	<i>Salmonella</i>	I	Typhimurium	104
31	134	<i>Salmonella</i>	I	Typhimurium	104
32	235	<i>Salmonella</i>	I	Lindenburg	
33	6	<i>Salmonella</i>	I	Litchfield	
34	237	<i>Salmonella</i>	I	Glostrup	
35	247	<i>Salmonella</i>	I	Blockley	
36	249	<i>Salmonella</i>	I	Goldcoast	
37	268	<i>Salmonella</i>	I	Hadar	
38	269	<i>Salmonella</i>	I	Manhattan	
39	270	<i>Salmonella</i>	I	Muenchen	
40	273	<i>Salmonella</i>	I	Litchfield	

**Tabla 9.** Cepas utilizadas para el estudio de validación de la PCR para detección de *Salmonella*.

Nº PCR	CÓDIGO CEPA	ESPECIE	SUBESPECIE	SEROTIPO	FAGOTIPO
41	275	<i>Salmonella</i>	I	Hadar	
42	276	<i>Salmonella</i>	I	Fayed	
43	232	<i>Salmonella</i>	I	Cremieu	
44	246	<i>Salmonella</i>	I	Duesseldorf	
45	258	<i>Salmonella</i>	I	Kottbus	
46	260	<i>Salmonella</i>	I	Chailey	
47	272	<i>Salmonella</i>	I	Hadar	
48	17	<i>Salmonella</i>	I	California	
49	10B-	<i>Salmonella</i>	I	4,5,12:i-	U302
50	14B-	<i>Salmonella</i>	I	4,5,12:i-	U302

**Tabla 9 (continuación).** Cepas utilizadas para el estudio de validación de la PCR para detección de *Salmonella*.

### 2.3.5. Límite de detección del método diseñado

Para establecer el límite de detección de la técnica, se ensayaron diferentes concentraciones de ADN mediante PCR, desde 644 ng/ $\mu$ l hasta 8 pg/ $\mu$ l.

La cepa con la que se realizó este estudio fue *Salmonella* Enteritidis nº165. Se cuantificó la cantidad de ADN (extracción realizada con anterioridad) mediante espectrofotometría y se realizaron diluciones 1/5 a partir de ese extracto.

Las condiciones utilizadas en la PCR no variaron de las descritas en el apartado 2.3.3.

## 2.4. Diseño de una PCR a tiempo real para la detección de *Salmonella* mediante una sonda TaqMan®

### 2.4.1. PCR a tiempo real con sonda Invavitone

#### 2.4.1.1. Diseño de los iniciadores

Los iniciadores, cuyas secuencias se recogen en la Tabla 10, fueron diseñados para este trabajo mediante el programa Primer Express de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) utilizando como referencia la secuencia del gen *invA* de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium cepa LT2. Este programa proporciona diferentes parejas de iniciadores a partir de la secuencia introducida.

La selección de los iniciadores se realizó mediante hibridaciones *in silico* utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul SF *et al.*, 1990) de la página web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se seleccionó una pareja de iniciadores específica de *Salmonella* spp. Estos iniciadores amplificaban un fragmento de 58 pb.

Iniciadores	Secuencia (5' -> 3')
Invavitone-F	TTAAATTCCTGAAGCAAACGTA
Invavitone-R	TGCTCGCCTTGCTGGTT
Sonda Invavitone	VIC-CGCCCAAACC-MGB

**Tabla 10.** Secuencia de los iniciadores y de la sonda Invavitone diseñados para la PCR a tiempo real.

#### 2.4.1.2. Diseño de la sonda

De manera análoga la sonda fue diseñada para este trabajo mediante el programa Primer Express de Applied Biosystems, utilizando como referencia la secuencia del fragmento del gen *invA* de *Salmonella* Typhimurium LT2 comprendida entre los iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R. Mediante la herramienta BLAST se realizaron hibridaciones *in silico* con el fin de seleccionar una sonda específica. Se seleccionó una secuencia de 12 nucleótidos (Tabla 10) que específicamente detecta una zona interna de la secuencia comprendida entre los dos iniciadores.

La sonda se marcó en su extremo 5' con el fluoróforo VIC, mientras que el extremo 3' poseía un *quencher* o extinguidor no fluorescente (NFQ) seguido de una cola terminal MGB (*minor groove-binder*) que incrementa la  $T_m$  permitiendo el uso de sondas más cortas.

A esta sonda se le denominó Sonda Invavitone y fue sintetizada por Applied Biosystems.

#### 2.4.1.3. Reacción de amplificación

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Se optimizaron las concentraciones de la sonda e iniciadores para una correcta amplificación,

utilizándose 5  $\mu$ l de ADN molde y TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 25  $\mu$ l (Tabla 11).

Reactivos	Concentración final
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1X
Iniciadores (Invavitone-F, Invavitone-R)	400 nM (de cada uno)
Sonda Invavitone	100 nM
ADN	5 $\mu$ l
Agua ultrapura	Hasta 25 $\mu$ l

**Tabla 11.** Concentración de reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con sonda Invavitone.

También se optimizó el programa de amplificación (temperaturas, ciclos, etc.). En la Tabla 12 se muestra el programa de amplificación seleccionado.

Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
50°C	02:00	1
95°C	10:00	1
95°C	00:15	40
60°C	01:00	

**Tabla 12.** Programa de amplificación utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitone.

#### 2.4.1.4. Especificidad de los iniciadores y la sonda

Con el fin de determinar la especificidad de los iniciadores y de la sonda diseñados, éstos fueron ensayados frente a diferentes serotipos de *Salmonella*, además de otra serie de microorganismos relacionados (utilizados como controles negativos). Las condiciones de amplificación empleadas en las reacciones de PCR fueron las descritas en el apartado anterior. El ADN de los microorganismos analizados fue obtenido mediante el método de extracción con Chelex® descrito con anterioridad en el apartado 2.1.

#### 2.4.2. Estudio de las cepas de *Salmonella* con resultado negativo para la detección del gen *invA*

Algunas de las cepas de *Salmonella* analizadas mediante PCR a tiempo real dieron lugar a un resultado negativo en la amplificación con la sonda Invavitone.

Con la intención de estudiar el por qué de estos resultados, se procedió a estudiar las secuencias de las cepas problemáticas.

Utilizando como referencia la secuencia del gen *invA* de *Salmonella* Typhimurium LT2, se diseñaron unos iniciadores que generaban un fragmento que incluía la zona amplificada por los iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R en la PCR a tiempo real. A estos iniciadores se les nombró como Invasec1 e Invasec2 (Tabla 13) y amplificaban un fragmento de aproximadamente 300 pb.

Iniciadores	Secuencia (5'→3')
Invasec1	CCACTGCCGGTTTTGTTAT
Invasec2	CTGCGCAAGTTGAGCTTTT

**Tabla 13.** Secuencia de los iniciadores Invasec1 e Invasec2 diseñados para obtener el fragmento de interés para secuenciar.

Se realizó una PCR con esos iniciadores en las condiciones detalladas en la Tabla 14. El volumen final de reacción fue de 50 µl en los que se añadió 5 µl de ADN.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Tampón de PCR con MgCl <sub>2</sub>	1X	95°C	01:00	1
dNTPs	200 µM	95°C	00:30	30
Iniciadores	0,4 µM (de cada uno)	58°C	00:30	
Taq polimerasa	2,5U	72°C	00:30	
ADN	5 µl	72°C	04:00	1
Agua ultrapura	Hasta 50 µl			

**Tabla 14.** Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para obtener el fragmento para secuenciar.

La electroforesis y visualización de los productos de amplificación se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.2.3.

Una vez comprobada la obtención de las bandas de ADN de los tamaños esperados, se purificó el producto amplificado con el kit QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos

purificados fueron enviados para su secuenciación a la empresa Sistemas Genómicos (Valencia, España).

Las secuencias genéticas obtenidas fueron analizadas mediante el programa de alineamiento ClustalW (Larkin MA *et al.*, 2007), con el objetivo de determinar los motivos de la ausencia de amplificación e hibridación con la sonda Invavitone.

### 2.4.3. PCR a tiempo real con sonda Invavitwo

Se diseñaron unos nuevos iniciadores y una nueva sonda específica de *Salmonella* en base a los resultados obtenidos en la secuenciación. Se buscó una zona más estable dentro del mismo gen que tuviese menor variación a nivel de nucleótido.

#### 2.4.3.1. Diseño de los iniciadores

La secuencia de los iniciadores diseñados para este trabajo se muestra en la Tabla 15. Se diseñaron mediante el programa Primer Express de Applied Biosystems utilizando como referencia la secuencia del gen *invA* de *Salmonella* Typhimurium LT2. Tras una comparación *in silico* mediante la herramienta BLAST, se seleccionó una pareja de iniciadores específica de *Salmonella* spp. que amplificaba un fragmento de 68 pb.

Iniciadores	Secuencia (5' -> 3')
Invavitwo-F	AAAGGAAGGGACGTCGTTAGG
Invavitwo-R	CAGTGGTACGGTCTCTGTAGAACTT
Sonda Invavitwo	6-FAM-CTGATTGGCGATCTC-MGB

**Tabla 15.** Secuencias de los iniciadores y de la sonda Invavitwo para detección de *Salmonella* mediante PCR a tiempo real.

#### 2.4.3.2. Diseño de la sonda

La sonda fue diseñada para este trabajo mediante el programa Primer Express de Applied Biosystems, utilizando como referencia la secuencia del fragmento del gen *invA* de *Salmonella* Typhimurium LT2 comprendida entre los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R. Tras realizar comparaciones *in silico* mediante la herramienta BLAST, se seleccionó una secuencia de 15 nucleótidos

que específicamente detectaba una zona interna de la secuencia amplificada por los iniciadores (Tabla 15).

La sonda se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo FAM y en el extremo 3' poseía un *quencher* o extinguidor no fluorescente (NFQ) seguido de una cola terminal MGB (*minor groove-binder*) que incrementa la  $T_m$  permitiendo el uso de sondas más cortas.

A esta sonda se le denominó Sonda Invavitwo y fue suministrada por Applied Biosystems.

#### 2.4.3.3. Diseño de un control interno de amplificación y su correspondiente sonda

- **Diseño del control interno**

Se diseñó un control interno de amplificación siguiendo la misma estrategia descrita anteriormente en el apartado 2.3.1. En este caso, la mitad más externa de los iniciadores quiméricos correspondía a las secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR a tiempo real (Invavitwo-F e Invavitwo-R). La secuencia de estos iniciadores quiméricos se muestra en la Tabla 16.

Iniciadores	Secuencia (5' -> 3')
CI Invavitwo F	aaaggaagggacgtcgttaggGTGCGGTTATAGCGGTC
CI Invavitwo R	tcagtggtacggtctctgtagaaacttCGGAACTTACAACC

**Tabla 16.** Secuencia de los iniciadores quiméricos utilizados para la creación del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo. En mayúsculas aparecen las secuencias que pertenecen al fago  $\lambda$  y en minúsculas (morado y verde) las secuencias pertenecientes a los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R respectivamente.

Para sintetizar el control interno se llevó a cabo una PCR en la que se utilizó la mezcla de reactivos y el programa de amplificación detallados en la Tabla 17. La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l donde como ADN molde se utilizó 1  $\mu$ l de ADN de fago  $\lambda$  digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (Sigma-Aldrich Co.).

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Tampón de PCR	1X	95°C	01:00	1
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	95°C	00:30	35
dNTPs	250 µM	60°C	00:30	
Iniciadores	0,4 µM (de cada uno)	72°C	00:30	
Taq polimerasa	1U	72°C	10:00	1
ADN λ	1 µl			
Agua ultrapura	Hasta 25 µl			

**Tabla 17.** Mezcla de reactivos y programa de amplificación utilizados en la reacción de PCR para la síntesis del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo.

La visualización de los productos amplificados se realizó como se describe en el apartado 2.2.3 pero con alguna pequeña modificación. En este caso, el volumen de carga en el gel de agarosa fue de 5 µl y el marcador de peso molecular utilizado fue HyperLadder™ IV (Bioline, London, UK).

Una vez comprobada la correcta amplificación del producto deseado, se purificó dicho producto mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. A este producto purificado de 150 pb (Figura 5) se le llamó control interno (CI) y se guardó a -20°C hasta su utilización.

- **Diseño de la sonda del control interno**

Para poder detectar el control interno en la PCR a tiempo real es necesaria la síntesis de una sonda específica de este producto. Esta sonda fue diseñada mediante el programa Primer Express de Applied Biosystems y tras realizar diferentes hibridaciones *in silico* mediante la herramienta BLAST, se seleccionó una secuencia de 22 nucleótidos, **5'-TGCGGTTATAGCGGTCCGGCTG-3'**, que específicamente detectaba una zona interna del fragmento del CI. La sonda se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo TAMRA y en el extremo 3' con el *quencher* DDQI (*Deep Dark Quencher I*) y fue suministrada por Eurogentec (Liège, Belgium).

En la Figura 5 se puede ver con detalle la secuencia del control interno. La zona donde hibrida la sonda está marcada en azul y las secuencias complementarias a los iniciadores utilizados en la PCR a tiempo real están marcadas en verde. De este modo, en la PCR a la vez que se amplifica el fragmento de *Salmonella* también se coamplificará el del control interno (ya que



los iniciadores para amplificar ambos fragmentos son los mismos). Estos fragmentos se distinguirán debido a que las sondas que los detectan están marcadas con diferentes fluoróforos.

#### FRAGMENTO DEL CONTROL INTERNO



**Figura 5.** Fragmento de 150 pb del control interno utilizado en la PCR a tiempo real con sonda Invaitwo. En color verde se señalan las zonas de unión de los iniciadores Invaitwo-F e Invaitwo-R. En azul está señalada la zona de hibridación de la sonda específica del CI.

#### 2.4.3.4. Condiciones optimizadas de la PCR a tiempo real

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando la mezcla de reactivos detallada en la Tabla 18. La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, utilizando 5 µl de ADN molde y TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Reactivos	Concentración final
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1X
Iniciadores (Invaitwo-F, Invaitwo-R)	400 nM (de cada uno)
Sonda Invaitwo	100 nM
Control interno (dil.10 <sup>-5</sup> )	1 µl
Sonda del CI	100 nM
ADN	5 µl
Agua ultrapura	Hasta 25 µl

**Tabla 18.** Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con sonda Invaitwo.

El programa de amplificación consistió en un primer momento en un primer paso a 50°C durante 2 minutos, un paso a 95°C durante 10 minutos, continuando con 30 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Este programa

inicial se tuvo que optimizar variando el número de ciclos. Después de utilizar 30 ciclos, se probó con 38 y posteriormente con 36, siendo este último número de ciclos el seleccionado para los experimentos posteriores.

#### **2.4.3.5. Límite de detección del control interno**

Se realizaron diluciones decimales de la solución madre del control interno. Las diluciones se realizaron en un rango comprendido entre  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . El programa y las condiciones de PCR empleadas fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior, pero en este caso sin añadir los 5  $\mu$ l de ADN molde.

#### **2.4.3.6. Límite de detección del ADN del método**

Para calcular el límite de detección del método diseñado se utilizó ADN de la cepa *Salmonella* Braenderup nº241 de una extracción realizada previamente mediante Chelex®. La concentración de ADN de esa extracción se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se prepararon diluciones de dicho ADN a las siguientes concentraciones: 20 ng/ $\mu$ l, 2 ng/ $\mu$ l, 200 pg/ $\mu$ l, 20 pg/ $\mu$ l, 2 pg/ $\mu$ l y 0,2 pg/ $\mu$ l. Se utilizaron 5  $\mu$ l de cada una de estas diluciones como ADN molde en la PCR a tiempo real según las condiciones descritas en el apartado 2.4.3.4.

#### **2.4.3.7. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real**

Para realizar el estudio de especificidad de la técnica se utilizaron 47 cepas de *Salmonella* y 8 aislamientos de microorganismos relacionados.

La extracción del ADN de las diferentes cepas se realizó mediante Chelex® siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1. Las extracciones fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

Se utilizaron las mismas condiciones de PCR que las descritas en el apartado de condiciones optimizadas de la PCR a tiempo real (Apartado 2.4.3.4).

Para determinar la utilidad de la técnica para la detección de *Salmonella* se calculó la inclusividad, la exclusividad y la precisión analítica mediante las fórmulas indicadas en la Figura 6. Los resultados se consideraron positivos cuando la curva de amplificación específica de *Salmonella* sobrepasaba la línea de corte

establecida, y los resultados se consideraron negativos cuando la curva no alcanzaba esa línea de corte.

		PCR		Σ
		positivo	negativo	
METODO REFERENCIA	positivo	a Verdadero positivo	b Falso negativo	a+b
	negativo	c Falso positivo	d Verdadero negativo	c+d
Σ		a+c	b+d	

$$\text{Inclusividad (\%)} = \frac{a}{(a + b)} \cdot 100$$

$$\text{Exclusividad (\%)} = \frac{d}{(c + d)} \cdot 100$$

$$\text{Precisión analítica (\%)} = \frac{a + d}{(a + b + c + d)} \cdot 100$$

**Figura 6.** Tabla de contingencia y fórmulas utilizadas en el estudio de validación para el cálculo de la precisión analítica del método. Modificado de Malorny B y colaboradores (2003b).

## 2.5. DISEÑO DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* MEDIANTE SYBR Green I

### 2.5.1. Elección de los iniciadores

Se eligió la pareja de iniciadores 139/141 (Tabla 19) que tienen como diana genética el gen *invA*. Estos iniciadores, descritos previamente en la literatura por Rahn K y colaboradores (1992), amplifican un fragmento de 285 pb.

Iniciador	Secuencia 5' -> 3'
139	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA
141	TCATCGCACCGTCAAAGGAAC

**Tabla 19.** Secuencias de los iniciadores 139/141 utilizados en la detección de *Salmonella* mediante PCR a tiempo real con SYBR Green I.

### 2.5.2. Diseño de un control interno

Se diseñó un control interno siguiendo la misma estrategia que la descrita en el apartado 2.3.1. Se diseñaron distintas parejas de iniciadores quiméricos para seleccionar el CI más adecuado: el iniciador *forward* fue el mismo para todos los casos, siendo el iniciador *reverse* el que se modificaba para poder amplificar distintos tamaños de una muestra comercial de fago  $\lambda$ , consiguiendo de este modo fragmentos de diferentes tamaños. La mitad más externa de estas quimeras corresponde a los iniciadores 139 y 141. La secuencia de los iniciadores quiméricos y el tamaño de los fragmentos que se generan al amplificar el iniciador *forward* con los distintos *reverse* se muestran en la Tabla 20. En negrita se señalan las secuencias que pertenecen al fago  $\lambda$  utilizadas como ADN molde para la creación del CI, y en color morado y verde las secuencias pertenecientes a los iniciadores 139 y 141 respectivamente.

INICIADOR	SECUENCIA (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)
Inva ICF	<b>GTGAAATTATCGCCACGTT</b> <b>CGGGCA</b> GCAGAACGAAAAAGGTGAGC	
Inva ICR-1	<b>TCATCGCACCGTCAAAGGAACC</b> GTGCAGGTGTTGGCCAGCAT	447
Inva ICR-2	<b>TCATCGCACCGTCAAAGGAACC</b> CTGCACTGCTCAATGCGCCA	348
Inva ICR-3	<b>TCATCGCACCGTCAAAGGAACC</b> CCGTTGACGAAGTTCACCGC	288

**Tabla 20.** Secuencia de los iniciadores quiméricos utilizados para la creación del CI de la PCR a tiempo real con SYBR Green I.

Para la síntesis del control interno se utilizó la mezcla de reactivos y el programa de amplificación detallados anteriormente en la Tabla 17. El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu$ l, utilizándose 1  $\mu$ l de ADN de fago  $\lambda$  digerido con *HindIII* y *EcoRI* (Sigma-Aldrich Co.) como ADN molde. La visualización de los amplificados se realizó según se ha descrito en el apartado 2.2.3.

La purificación de los productos amplificados se realizó mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A partir de esos productos purificados (de 447 pb, 348 pb y 288 pb), se realizaron diluciones seriadas en agua ultrapura estéril para determinar cuál de los tres fragmentos era el más adecuado para utilizar como control interno y en

qué dilución. Se realizó una PCR a tiempo real en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando como método de detección SYBR Green I.

Las condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real fueron las descritas en la Tabla 21. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, utilizando como ADN molde 1 µl de cada dilución del control interno y SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan). Se añadió ROX™ *Reference Dye* a la reacción como referencia pasiva.

Reactivos	Concentración final
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™	1X
Iniciadores (139, 141)	400 nM (de cada uno)
ROX™ <i>Reference Dye</i>	1X
ADN molde (ADN del control interno)	1 µl
Agua ultrapura	Hasta 20 µl

**Tabla 21.** Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real para determinar el CI más apropiado para su utilización en la PCR a tiempo real con SYBR Green I.

El programa de amplificación utilizado fue de 95°C durante 1 minuto, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. A continuación se aplicó el protocolo de disociación que consistía en dos rampas de temperatura, una descendente y otra ascendente, para poder calcular las curvas de disociación: la muestra se calentó a 95°C durante un minuto y a continuación se disminuyó la temperatura hasta 55°C donde permaneció otro minuto. A partir de esta temperatura se volvió a subir hasta los 95°C, aumentando cada 10 segundos la temperatura en 0,5°C.

### 2.5.3. Condiciones optimizadas de la PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). En la Tabla 22 se detalla la mezcla de reactivos utilizados en la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I como método de detección. El volumen final utilizado fue de 20 µl, utilizando el tampón de reacción SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Takara Bio Inc.) y 3 µl de ADN molde. Como referencia pasiva se utilizó ROX™ *Reference Dye*. En la reacción se usó la

dilución  $10^{-5}$  del CI, ya que tras ensayos realizados previamente se determinó que era la más idónea.

Reactivos	Concentración final
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™	1X
Iniciadores (139, 141)	400 nM (de cada uno)
Control interno (dil. $10^{-5}$ )	1 $\mu$ l
ROX™ <i>Reference Dye</i>	1X
ADN molde (ADN del control interno)	3 $\mu$ l
Agua ultrapura	Hasta 20 $\mu$ l

**Tabla 22.** Reactivos utilizados en la PCR a tiempo real con SYBR Green I.

El programa de amplificación fue el mismo que el descrito en el apartado anterior.

#### 2.5.4. Límite de detección del CI

Se realizaron diluciones decimales de la solución madre del control interno. Las diluciones se realizaron en un rango comprendido entre  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . El programa y las condiciones de PCR empleadas fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior, pero en este caso se añadió agua ultrapura en lugar de los 3  $\mu$ l de ADN molde.

#### 2.5.5. Límite de detección del ADN del método

Para calcular el límite de detección de ADN del método diseñado, se utilizó ADN de la cepa *Salmonella* Braenderup nº241. Se prepararon diluciones de este ADN a diferentes concentraciones: 20 ng/ $\mu$ l, 2 ng/ $\mu$ l, 200 pg/ $\mu$ l, 20 pg/ $\mu$ l, 2 pg/ $\mu$ l y 0,2 pg/ $\mu$ l. La PCR se realizó según las condiciones descritas en el apartado 2.5.3, pero añadiendo en este caso 5  $\mu$ l de cada una de esas diluciones como ADN molde.

#### 2.5.6. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I

Se realizó un estudio en 47 cepas de *Salmonella* y en 8 cepas de otros microorganismos relacionados. La extracción de ADN de estas cepas se realizó

mediante Chelex® según el protocolo descrito en el apartado 2.1. Las extracciones se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Se utilizaron las mismas condiciones de PCR que las descritas en el apartado 2.5.3.

Se calculó la inclusividad, exclusividad y precisión analítica siguiendo lo descrito en el apartado 2.4.3.7.

### **3. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL DISEÑADOS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS**

La validación de los métodos diseñados, tanto de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitwo como de la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I, se realizó de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 16140:2003 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos” (Anonymous, 2003).

Se llevó a cabo un estudio comparativo de los métodos alternativos frente al método de referencia. Como método de referencia se utilizó la norma ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.” (Anonymous, 2002).

#### **3.1. Descripción del método de referencia**

Se usó el método de referencia descrito en la norma ISO 6579:2002. Este método incluye 4 etapas sucesivas para la detección de *Salmonella*: preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, siembra en placa e identificación presuntiva, y por último, confirmación de la identidad.

##### **- Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo:**

Se prepara una suspensión inicial con la muestra a analizar en agua de peptona tamponada (APT) (Oxoid, Basingstoke, UK). Si la muestra es líquida se

diluyen 25 ml de la muestra en 225 ml de APT, y si es sólida 25 gr en 225 ml de APT. En el caso de que la porción de muestra para análisis no llegue a 25 gr, se emplea la cantidad necesaria de medio de preenriquecimiento para obtener una dilución 1/10. Esta suspensión inicial debe homogeneizarse adecuadamente. En nuestro estudio las muestras se homogeneizaron durante aproximadamente 1 minuto en un Masticator Basic (Iul, Barcelona, España). Posteriormente, esta suspensión se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18\text{h} \pm 2\text{h}$ .

**- Enriquecimiento selectivo:**

Se transfieren 0,1 ml del cultivo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS) (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) y 1 ml del mismo cultivo a 10 ml de caldo Muller-Kauffmann tetracionato novobiocina (MKTTn) (BioMerieux). El caldo RVS se incubó a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$  y el caldo MKTTn a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

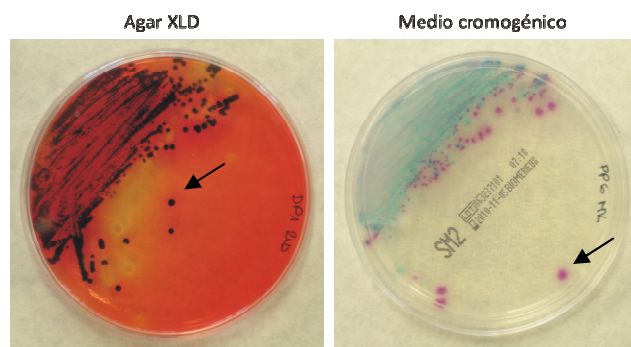
**- Siembra en placa e identificación:**

A partir del cultivo obtenido en el caldo RVS, se siembran dos medios selectivos en placa: por un lado, agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD) (Oxoid) y por otro, un segundo agar selectivo que debe ser elegido por el laboratorio donde se realizan los ensayos. Este medio debe ser complementario al XLD. En nuestro caso, el medio selectivo que se utilizó fue el medio cromogénico chromID™ *Salmonella* de BioMerieux, que es un medio capaz de detectar también salmonelas lactosa positivas. Las placas se siembran en superficie para conseguir el aislamiento de las colonias.

Se repite lo descrito anteriormente con el cultivo obtenido a partir del caldo MKTTn.

Tanto las placas de XLD como las del medio cromogénico se incuban a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . Después de la incubación se examinan las placas en busca de colonias típicas de *Salmonella*. En el caso del agar XLD, las colonias típicas de *Salmonella* tienen el centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo alrededor (Figura 7). En el caso del medio cromogénico chromID™ *Salmonella*, las colonias típicas de *Salmonella* son de color malva con bordes irregulares (Figura 7).





**Figura 7.** Medios selectivos utilizados en la detección e identificación presuntiva de *Salmonella*. A la izquierda una placa de agar XLD y a la derecha del medio cromogénico chromID™ *Salmonella* (BioMerieux).

#### - Confirmación:

Para la confirmación, según la norma ISO 6579:2002, se debe estudiar al menos una colonia sospechosa de cada medio selectivo. Si esta fuera negativa, se estudiarían otras cuatro colonias identificadas como sospechosas. Las colonias seleccionadas se reaislan en placas de agar nutritivo. En nuestro estudio se utilizaron placas de TSA. Las placas se incuban a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 1\text{h}$ . Para la confirmación bioquímica y serológica se emplean cultivos puros.

En la identificación bioquímica se realizan distintas pruebas que luego deben ser interpretadas. Pueden utilizarse sistemas de identificación comerciales para la confirmación bioquímica de las colonias. En nuestro estudio, en primer lugar se realizó la prueba de la oxidasa a cada colonia, utilizándose para ello tiras para la prueba de la oxidasa Bactident® Oxidasa (Merck, Darmstadt, Germany). En los casos de reacción negativa, se continuó con la identificación utilizando Galerías API® 20E (BioMerieux), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. En la Figura 8 se puede observar una de esas galerías con los resultados característicos de *Salmonella* spp.



**Figura 8.** Galería API® 20E con un resultado característico de *Salmonella* spp.

La confirmación serológica se realiza a partir de colonias puras mediante pruebas de aglutinación que detecten la presencia de los antígenos de *Salmonella*. Para esta prueba se utilizó el kit comercial Oxoid *Salmonella* Latex Test (Oxoid) siguiendo las instrucciones del fabricante.

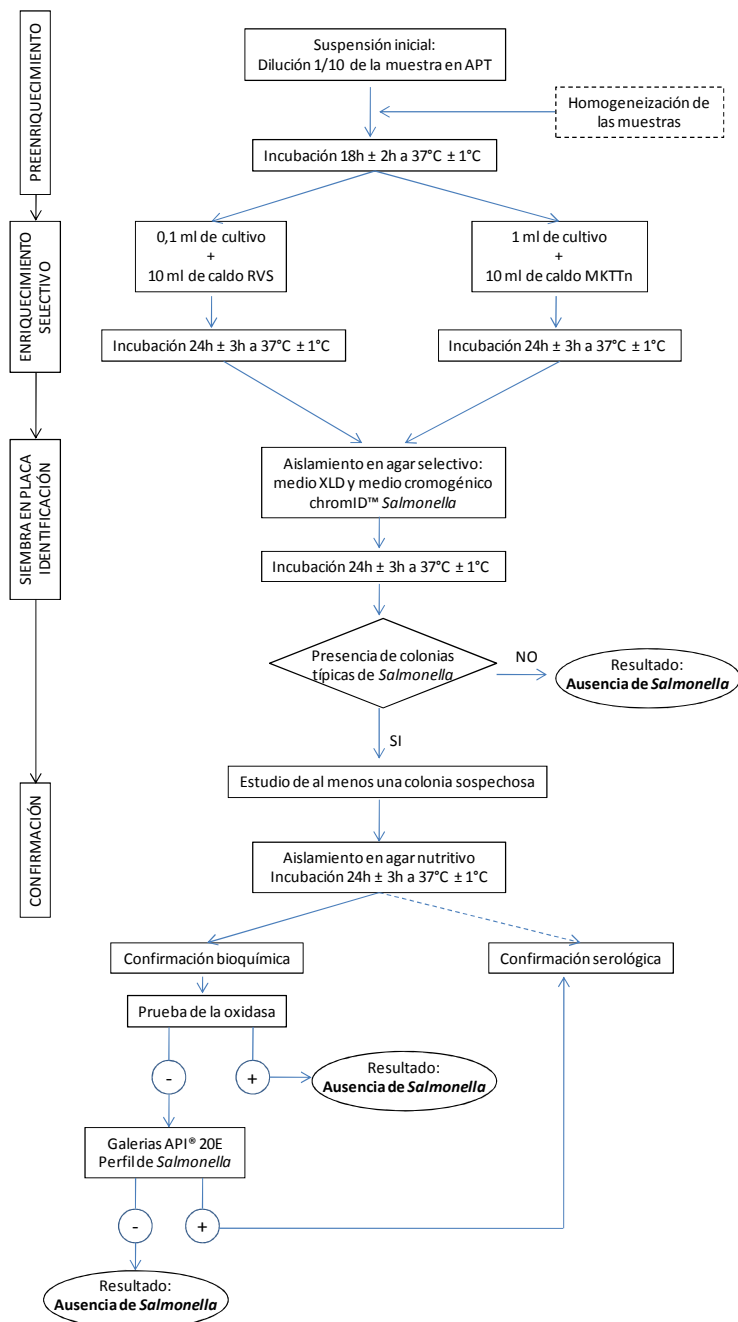


Figura 9. Diagrama explicativo del procedimiento seguido por el método de referencia para la detección de *Salmonella*.

## 3.2. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

### 3.2.1. Protocolo y principio de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitwo como método de detección

Este método se basa en la amplificación de un fragmento del gen *invA* de *Salmonella* mediante PCR a tiempo real. La detección se hace posible mediante una sonda TaqMan® específica marcada con el fluoróforo FAM (Apartados 2.4.3.1 y 2.4.3.2).

En cada reacción se añade un control interno, que amplifica al mismo tiempo que el fragmento de *Salmonella*, pero que es detectado mediante otra sonda específica marcada con un fluoróforo diferente, en este caso TAMRA (Apartado 2.4.3.3).

Las amplificaciones se realizaron en el equipo de PCR a tiempo real iCycler iQ™ de Bio-Rad.

En todas las amplificaciones realizadas se incluyeron dos controles, un control positivo que se correspondía con la cepa *Salmonella enterica* serotipo Cubana nº238, y un control negativo (NTC) al que no se le incluía ADN molde.

El protocolo que se siguió fue el descrito a continuación.

#### - Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo:

El procedimiento de preenriquecimiento que se siguió fue el descrito anteriormente en el método de referencia (Apartado 3.1). Por lo tanto, se preparó una suspensión inicial de la muestra en APT a una dilución 1/10 que se incubó a 37°C ± 1°C durante 18h ± 2h.

#### - Extracción del ADN bacteriano:

Se utilizó el kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante pero con alguna leve modificación en el protocolo: se recogieron 2 ml de la muestra preenriquecida, y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos. Tras este paso, las células se lisaron mediante una solución de proteinasa K/SDS. Para impedir que partículas insolubles colmatasen o taponasen las columnas de filtrado, se añadió un paso de

centrifugación durante 5 minutos a 11.500 rpm. Tras la adición de sales caotrópicas y etanol al lisado, el ADN se unió a la membrana de sílice de las columnas, debido a que dichos componentes proporcionan las condiciones adecuadas para permitir esa unión. Los restos celulares se eliminaron mediante dos pasos de lavado con tampones con una alta concentración en sales. Finalmente, el ADN se eluyó en 100 µl del tampón de elución que contenía una baja concentración en sales.

**- Amplificación / Detección:**

La amplificación se realizó con dos *master mix* comerciales diferentes, con la intención de comparar la eficacia de amplificación de ambas. En ambos casos, el método de detección fue el mismo, la sonda Invavitwo:

a) Utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, utilizando 3 µl de ADN molde y TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La mezcla de los reactivos empleados y el protocolo de amplificación utilizado están detallados en la Tabla 23.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
TaqMan® Universal PCR Master Mix	1X	50°C	02:00	1
Iniciadores (Invavitwo-F, Invavitwo-R)	400 nM (de cada uno)	95°C	10:00	1
Sonda Invavitwo	100 nM	95°C	0:15	36
Control interno (dil.10 <sup>-5</sup> )	1 µl	60°C	01:00	
Sonda del CI	100 nM			
ADN	3 µl			
Agua ultrapura	Hasta 25 µl			

**Tabla 23.** Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real con TaqMan® Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems.

b) Utilizando *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Takara Bio Inc.)

La reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l, utilizando 3  $\mu$ l de ADN molde y *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Takara Bio Inc.). La mezcla de reactivos empleados y el protocolo de amplificación utilizado se detallan en la Tabla 24.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
<i>Premix Ex Taq</i> <sup>™</sup>	1X	95°C	00:30	1
Iniciadores (Invavitwo-F, Invavitwo-R)	400 nM (de cada uno)	95°C	00:15	36
Sonda Invavitwo	100 nM	60°C	01:00	
Control interno (dil.10 <sup>-5</sup> )	0,8 $\mu$ l			
Sonda del CI	100 nM			
ADN	3 $\mu$ l			
Agua ultrapura	Hasta 20 $\mu$ l			

**Tabla 24.** Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real con *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> de Takara Bio Inc.

### 3.2.2. Protocolo y principio de la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I como método de detección

Este método se basa en la amplificación de un fragmento del gen *invA* de *Salmonella* mediante PCR a tiempo real. La detección se hace posible mediante el fluoróforo SYBR Green I, que se une de manera específica al ADN de doble cadena que se forma durante la PCR emitiendo fluorescencia.

En cada reacción se añade un control interno (Apartado 2.5.2) que amplifica al mismo tiempo que el fragmento de *Salmonella*. Se diferencian entre ellos debido a que los picos de disociación de cada fragmento presentan diferentes temperaturas de disociación.

Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo de PCR a tiempo real iCycler iQ<sup>™</sup> de Bio-Rad.

En todas las amplificaciones realizadas se incluyeron dos controles, un control positivo que se correspondía con la cepa *Salmonella enterica* serotipo Cubana nº238, y un control negativo (NTC) que no llevaba ADN molde.

El protocolo que se siguió fue el descrito a continuación:

**- Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo:**

El procedimiento de preenriquecimiento que se siguió fue el descrito anteriormente en el método de referencia (Apartado 3.1).

**- Extracción del ADN bacteriano:**

Se utilizó el kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) del mismo modo que en el apartado anterior para la sonda Invavitwo (Apartado 3.2.1).

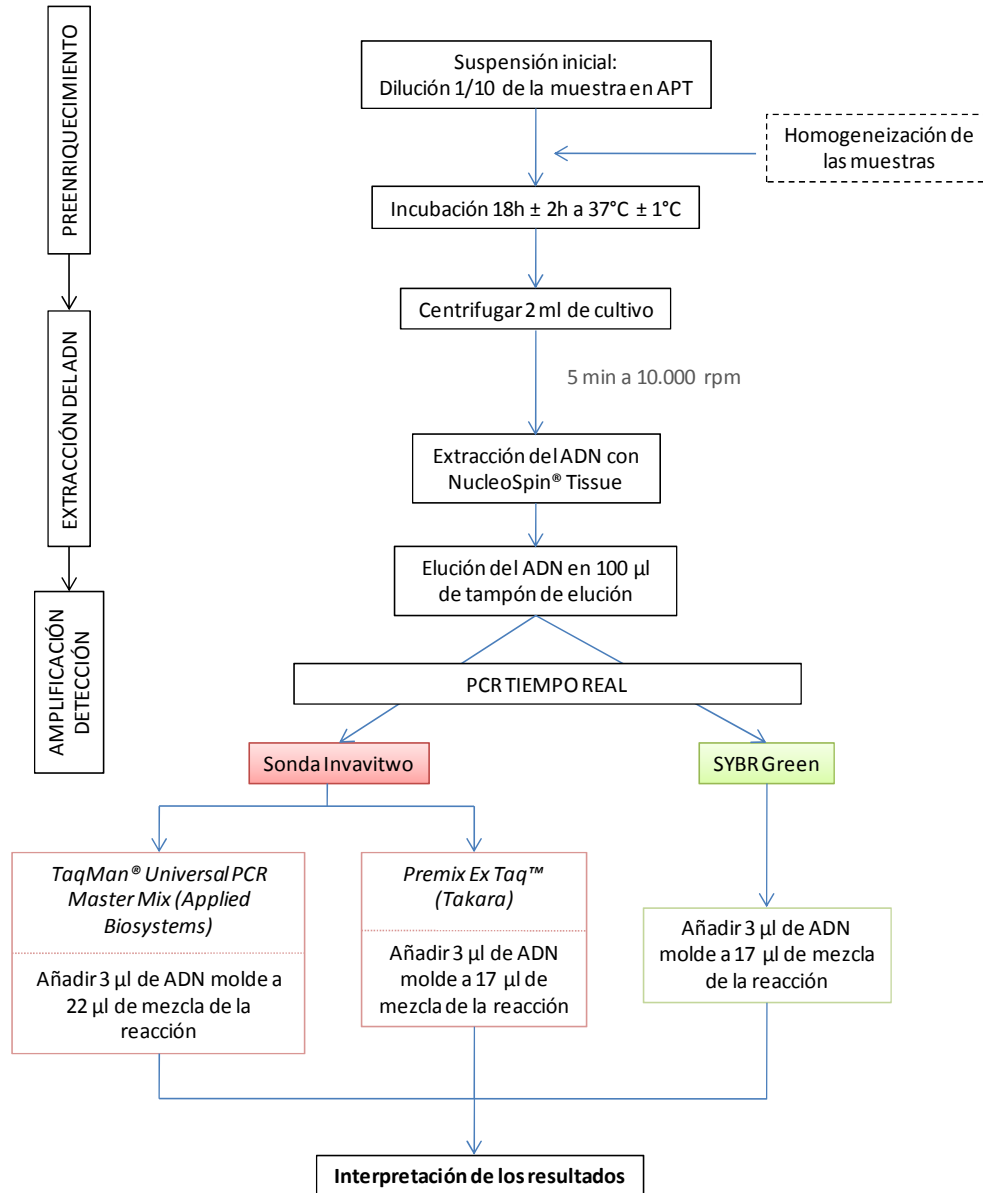
**- Amplificación / Detección:**

En la Tabla 25 se detallan la mezcla de reactivos y el programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I como método de detección. El volumen final fue de 20 µl, utilizando el tampón SYBR® *Premix Ex Taq™* (Takara Bio Inc.) y 3 µl de ADN molde.

Reactivos	Concentración final	Temperatura	Tiempo (min)	Nº de ciclos
SYBR® <i>Premix Ex Taq™</i>	1X	95°C	01:00	1
Iniciadores (139, 141)	400 nM (de cada uno)	95°C	00:15	40
		60°C	01:00	
Control interno (dil. 10 <sup>-5</sup> )	1 µl			
ADN molde	3 µl			
Agua ultrapura	Hasta 20 µl			

**Tabla 25.** Reactivos y programa de amplificación utilizados en la PCR a tiempo real utilizando como método de detección SYBR Green I.

Tras la amplificación se realizó el protocolo de disociación que consistía en dos rampas de temperatura, una descendente y otra ascendente, para poder calcular las curvas de disociación. La muestra se calentó a 95°C durante un minuto y a continuación se disminuyó la temperatura hasta 55°C donde permaneció otro minuto. A partir de esta temperatura se volvió a subir hasta los 95°C, aumentando cada 10 segundos la temperatura en 0,5°C.



**Figura 10.** Diagrama explicativo del protocolo seguido por los métodos alternativos para la detección de *Salmonella*.



### 3.3. Estudio comparativo de los métodos

Se estudiaron los siguientes parámetros:

- Inclusividad y exclusividad
- Eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa
- Nivel de detección relativo

#### 3.3.1. Test de Inclusividad

##### 3.3.1.1. Cepas estudiadas

Se utilizaron un total de 54 cepas de *Salmonella* en el ensayo de inclusividad. Las cepas pertenecían a la colección de nuestro grupo de investigación. Se analizó un amplio rango de serotipos de *Salmonella*, intentando que la procedencia de los aislamientos fuese mayoritariamente de origen alimentario o de aguas. En la Tabla 26 se muestra una relación de las cepas utilizadas en este ensayo ordenadas por el código de cepa correspondiente a la colección propia de nuestro grupo de investigación.

Código cepa	Especie	Serotipo	Origen
6	<i>Salmonella enterica</i>	Litchfield	Agua río Ereño
7	<i>Salmonella enterica</i>	Virchow	Agua
8	<i>Salmonella enterica</i>	Miami	Agua
9	<i>Salmonella enterica</i>	11:lv	Agua
10	<i>Salmonella enterica</i>	Abony	Agua
19	<i>Salmonella enterica</i>	Litchfield	-
20	<i>Salmonella enterica</i>	Arizonae	Agua río Butrón
36	<i>Salmonella enterica</i>	Enteritidis	Tortilla de patatas
57	<i>Salmonella enterica</i>	Enteritidis PT4	Pastel de nata
59	<i>Salmonella enterica</i>	Dublin	-
83	<i>Salmonella enterica</i>	Arizonae	Semilla de algodón
99	<i>Salmonella enterica</i>	Enteritidis PT4	Derivado de aves
121	<i>Salmonella enterica</i>	Schwarzengrund	Heces varón
134	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium DT104	Carne picada

Tabla 26. Cepas de *Salmonella* utilizadas en el estudio de inclusividad.

Código cepa	Especie	Serotipo	Origen
136	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium DT104	Costilla adobada
151	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium DT104	Salchicha de cerdo
231	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium DT96	Salchicha de pollo
232	<i>Salmonella enterica</i>	Cremieu	Playa Ereaga
235	<i>Salmonella enterica</i>	Lindenburg	Red de agua
237	<i>Salmonella enterica</i>	Glostrup	Pimienta negra
238	<i>Salmonella enterica</i>	Cubana	Leche en polvo
241	<i>Salmonella enterica</i>	Braenderup	Playa Ereaga
246	<i>Salmonella enterica</i>	Duesseldorf	Playa Arrigunaga
247	<i>Salmonella enterica</i>	Blockley	Hamburguesa
249	<i>Salmonella enterica</i>	Goldcoast	Playa Ereaga
252	<i>Salmonella enterica</i>	Infantis	Huevo líquido
256	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium DT22	Salchicha de pollo
258	<i>Salmonella enterica</i>	Kottbus	Playa Arrigunaga
260	<i>Salmonella enterica</i>	Chailey	Playa Bakio
263	<i>Salmonella enterica</i>	Agona	Playa La Arena
267	<i>Salmonella enterica</i>	4,12:b:-	Hamburguesa de pollo
268	<i>Salmonella enterica</i>	Hadar	Hamburguesa de ave
269	<i>Salmonella enterica</i>	Manhattan	Playa La Arena
312	<i>Salmonella enterica</i>	Heidelberg	Muslito de pollo
328	<i>Salmonella enterica</i>	Montevideo	Soja para piensos
331	<i>Salmonella enterica</i>	Anatum	Magro de cerdo
332	<i>Salmonella enterica</i>	Rissen	Harina de soja
333	<i>Salmonella enterica</i>	California	Soja para piensos
342	<i>Salmonella enterica</i>	Anatum	Chorizo
343	<i>Salmonella enterica</i>	Derby	Chorizo
344	<i>Salmonella enterica</i>	Derby	Chorizo
346	<i>Salmonella enterica</i>	Bredeney	Chorizo
347	<i>Salmonella enterica</i>	Anatum	Magro de cerdo
357	<i>Salmonella enterica</i>	Ohio	Carne
379	<i>Salmonella enterica</i>	Give	Carne de cerdo
414	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium	Carne picada
464	<i>Salmonella enterica</i>	Enteritidis	Bollo de mantequilla
580	<i>Salmonella enterica</i>	Tennessee	Lechuga
620	<i>Salmonella enterica</i>	4,5,12:i:-	Porcino
628	<i>Salmonella enterica</i>	4,5,12:i:-	Porcino
641	<i>Salmonella enterica</i>	Anatum	Carne fresca
665	<i>Salmonella enterica</i>	4,5,12:i:-	Porcino
683	<i>Salmonella enterica</i>	Infantis	Cáscara de huevo
685	<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium U302	Chichiquis

Tabla 26 (continuación). Cepas de *Salmonella* utilizadas en el estudio de inclusividad.

### 3.3.1.2. Preparación de los cultivos bacterianos

El test de inclusividad se debe realizar con cultivos puros de bacterias. Según la norma ISO 16140:2003, el nivel de inóculo debe ser de 10 a 100 veces mayor que el nivel de detección relativo mínimo, que es 1 célula. Por lo tanto, se deben de inocular 10-100 células en 225 ml de agua de peptona tamponada (APT). En este trabajo se inocularon 9 ml de APT con 4 células, proporción acorde con la norma y que permite reducir los volúmenes de trabajo.

A partir de un cultivo bacteriano de 18h a 37°C se realizaron diluciones en APT para obtener concentraciones de 4 células/ml con las que se inocularon 9 ml de APT. Esta suspensión se incubó 18h a 37°C. En paralelo, mediante siembra por duplicado en placas de TSA se comprobaron las concentraciones de los inóculos realizados. Las placas se incubaron 24h a 37°C y se realizó el recuento de las ufc/ml (unidades formadoras de colonias/ml).

Tras las 18h de incubación de los inóculos, por un lado se midieron las absorbancias de los crecimientos bacterianos para calcular la concentración de células frente a una recta patrón, y por otro lado, se aplicó el protocolo de los métodos alternativos a partir del paso de preenriquecimiento (procediendo a la extracción del ADN y posterior amplificación mediante PCR a tiempo real).

### 3.3.1.3. Estudio de las cepas con resultado negativo en el test de inclusividad

- **Secuenciación de las cepas con resultado negativo en el test de inclusividad**

Las cepas de *Salmonella* que mostraron un resultado negativo en el test de inclusividad se estudiaron mediante secuenciación.

Se realizó una amplificación por PCR de las 5 cepas problemáticas utilizando los iniciadores Invasec1 e Invasec2 previamente descritos en este estudio (Apartado 2.4.2). Estos iniciadores amplifican un fragmento de aproximadamente 300 pb que incluye la zona amplificada por los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R en la PCR a tiempo real. Las condiciones de PCR y el programa de amplificación utilizados fueron los mismos que los descritos en el apartado 2.4.2.

La electroforesis y la visualización de los productos amplificados se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.2.3. En este caso, el volumen de carga fue de 5  $\mu$ l y el marcador de peso molecular utilizado fue HyperLadder™ IV (Bioline).

Las bandas de PCR del tamaño esperado fueron purificadas con el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Estos productos purificados se enviaron a la empresa Sistemas Genómicos (Valencia, España) para su secuenciación.

Las secuencias genéticas obtenidas tras el análisis de secuenciación, se alinearon con el programa ClustalW para su estudio.

- **PCR a tiempo real disminuyendo la temperatura de anillamiento**

Se realizó una PCR a tiempo real con las cepas problemáticas en la que se disminuyó la temperatura de anillamiento en 4°C. La PCR se realizó tanto con la *master mix* de Applied Biosystems como con la *master mix* de Takara manteniendo las mismas condiciones en ambas, salvo la temperatura de anillamiento que se disminuyó de 60°C a 56°C.

### 3.3.2. Test de Exclusividad

Se utilizaron un total de 31 cepas de microorganismos relacionados con *Salmonella*. Estas cepas procedían de la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT). En la Tabla 27 se muestra una relación de las cepas utilizadas en el estudio de exclusividad ordenadas según el número de referencia de la CECT.

Nº CECT	Especie	Nº CECT	Especie
110	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	166	<i>Providencia alcalifaciens</i>
143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	232	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
148	<i>Bacillus cereus</i>	239	<i>Staphylococcus aureus</i>
157	<i>Hafnia alvei</i>	240	<i>Staphylococcus aureus</i>
158	<i>Hafnia alvei</i>	356	<i>Bacillus subtilis</i>

**Tabla 27.** Cepas utilizadas en el estudio de exclusividad.

Nº CECT	Especie	Nº CECT	Especie
378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4031	<i>Listeria monocytogenes</i>
401	<i>Citrobacter freundii</i>	4039	<i>Enterococcus faecalis</i>
410	<i>Enterococcus faecium</i>	4102	<i>Enterococcus faecium</i>
411	<i>Enterococcus durans</i>	4168	<i>Proteus mirabilis</i>
583	<i>Shigella boydii</i>	4315	<i>Yersinia enterocolitica</i>
679	<i>Escherichia coli</i>	4502	<i>Enterobacter cloacae</i>
684	<i>Enterobacter aerogenes</i>	4783	<i>Escherichia coli</i>
846	<i>Serratia marcescens</i>	4887	<i>Shigella sonnei</i>
858	<i>Cronobacter sakazakii</i>	4932	<i>Enterococcus faecium</i>
910	<i>Listeria innocua</i>	5725	<i>Listeria monocytogenes</i>
935	<i>Listeria monocytogenes</i>		

Tabla 27 (continuación). Cepas utilizadas en el estudio de exclusividad.

Se utilizaron cultivos puros de esas cepas a partir de los cuales se prepararon concentraciones de  $10^5$  células/ml de cada una de ellas en APT. Estas suspensiones bacterianas se incubaron durante 18h a 37°C. Tras este periodo de incubación se continuó con el protocolo de los métodos alternativos a partir del paso de preenriquecimiento (procediendo a la extracción del ADN y posterior amplificación mediante PCR a tiempo real).

### 3.3.3. Estudio de la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de los métodos alternativos

#### 3.3.3.1. Muestras de alimentos

Se estudiaron un total de 309 muestras de alimentos diferentes. Estas muestras estaban divididas en 5 categorías de alimentos, siguiendo la clasificación de tipos de muestra aportada por la norma ISO 16140:2003. Por cada categoría se estudiaron alrededor de 60 muestras de alimentos y dentro de cada categoría se seleccionaron varios tipos de alimentos representativos. La Tabla 28 incluye una relación detallada de los productos alimentarios utilizados.

Categoría	Tipo de alimento
PRODUCTOS CÁRNICOS	Salchichas de pollo y cerdo Piel de pollo Despiece de pollo Chichiquis* de cerdo Carne picada de cerdo
PRODUCTOS LÁCTEOS	Helados Quesos Leche cruda de vaca
PESCADOS Y MARISCOS	Pescados blancos Pescados azules Almejas
PIENSOS	Pienso para vacuno Pienso para mascotas Pienso para avicultura
PRODUCTOS VARIOS	Bollos de nata y crema Comidas precocinadas Huevos

**Tabla 28.** Relación de muestras de alimentos empleados. \* Chichiquis= término alavés para nombrar al picadillo de carne de cerdo con pimentón, también utilizado para rellenar los chorizos.

Las muestras de alimentos utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en supermercados o comercios de la ciudad, salvo las muestras de leche y las muestras de piel de pollo que se obtuvieron de diferentes ganaderos de la zona. Las muestras de pienso fueron suministradas por una empresa productora de piensos de la zona.

### 3.3.3.2. Análisis inicial de los alimentos

Todos los productos alimentarios utilizados en el estudio de validación fueron procesados inmediatamente tras su adquisición mediante el método de referencia para detección de *Salmonella* (Apartado 3.1). Este análisis inicial pretendía conocer si las muestras estaban contaminadas con *Salmonella*. Además se pretendía encontrar, para poder utilizarlas como muestras positivas en el ensayo de validación, el mayor número de muestras posibles con contaminación natural por *Salmonella*.

### 3.3.3.3. Contaminación artificial de las muestras

La norma ISO 16140:2003 que establece las pautas para la validación de métodos alternativos, aconseja que se utilice en el estudio el mayor número posible de alimentos contaminados naturalmente para cada una de las categorías alimentarias. En el caso de no conseguir un número suficiente, se permite recurrir a la contaminación artificial de las muestras de alimentos.

En nuestro caso, de las 309 muestras analizadas solamente una estaba contaminada naturalmente. Por lo tanto, se tuvo que recurrir a la contaminación artificial de los alimentos.

La norma ISO 16140:2003 indica que para conseguir que los microorganismos se encuentren en unas condiciones lo más parecidas a como se encontrarían en el alimento, la contaminación artificial debe realizarse con microorganismos estresados o dañados. Además, esa lesión o estrés celular debe ser verificada. Por lo tanto, se diseñó un protocolo para lesionar las células con las que se iban a contaminar los alimentos.

- **Diseño de un protocolo para estresar las bacterias**

- Tratamientos térmicos ensayados inicialmente

Se combinaron diferentes tratamientos térmicos con diferentes tiempos de exposición para estresar las células. En la Tabla 29 se muestran los primeros ensayos realizados para establecer un protocolo de estrés.

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2
Crecimiento a 37°C 24h, seguido de: <ul style="list-style-type: none"><li>• 15 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 30 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 45 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 60 min a 55°C + enfriamiento rápido</li></ul>	Crecimiento a 37°C 24h. Inoculación de 500 µl del cultivo en 5 ml de TSB. Incubación 2h a 37°C, seguido de: <ul style="list-style-type: none"><li>• 15 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 30 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 45 min a 55°C + enfriamiento rápido</li><li>• 60 min a 55°C + enfriamiento rápido</li></ul>

**Tabla 29.** Protocolos iniciales ensayados para lesionar las bacterias.

Se estimó que en la fase exponencial el tratamiento de estrés tendría mejores resultados sobre la bacteria que en la fase estacionaria (Dodd CER *et al.*, 2007). Para poder determinar a qué tiempo la bacteria se encontraba en fase exponencial, se decidió realizar curvas de crecimiento de *Salmonella*.

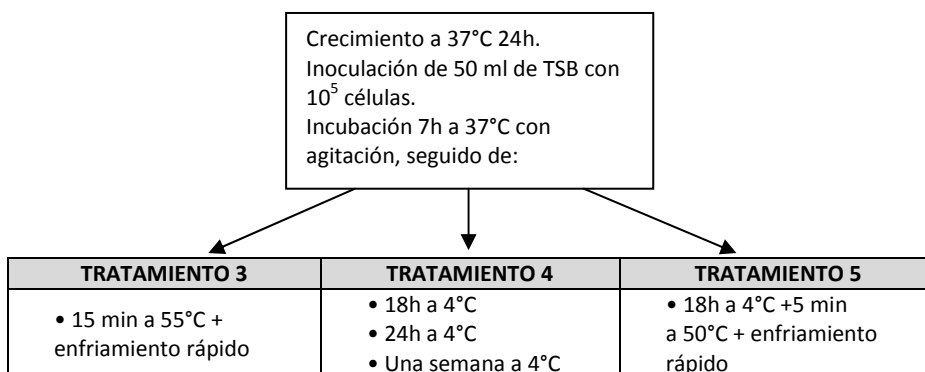
- Realización de curvas de crecimiento de *Salmonella*

Se realizaron tres ensayos para calcular la curva de crecimiento de *Salmonella*. En los tres casos la cepa utilizada fue la misma (*Salmonella* Enteritidis nº2) y el protocolo seguido fue el descrito a continuación: se inocularon 10 ml de caldo TSB con una única colonia de *Salmonella* y se incubaron durante toda la noche en agitación a 37°C. A partir de ese cultivo bacteriano, se inocularon 10<sup>5</sup> células en 50 ml de caldo TSB. Esta suspensión se incubó a 37°C en agitación (250 rpm) en un matraz de 100 ml y se tomaron muestras cada 1h 30 min.

En cada muestra se midió la absorbancia (OD600) y se prepararon diluciones decimales seriadas para realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) en placas de TSA. Por cada dilución se realizaron tres réplicas del recuento. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h.

- Tratamientos térmicos ensayados tras la determinación de la fase exponencial

A partir de suspensiones de microorganismos en fase exponencial, se diseñaron otros tres protocolos para estresar las células bacterianas mediante la combinación de tiempos y temperaturas, los cuales se muestran a continuación:





- **Protocolo definitivo para estresar las células bacterianas**

El método utilizado para estresar las células bacterianas con las que luego se realizaría la contaminación artificial de los alimentos fue el descrito a continuación:

- Se inocularon 10 ml de caldo TSB con una única colonia de *Salmonella*.
- Esta suspensión se incubó durante toda la noche en agitación a 37°C.
- A partir de este cultivo celular, se inocularon 10<sup>5</sup> células en 50 ml de caldo TSB.
- Esta suspensión se incubó durante 7h a 37°C para que alcanzase la fase exponencial.
- El cultivo se mantuvo durante 18h a 4°C, para que todas las células se estabilizasen y se encontrasen en las mismas condiciones.
- Las células se sometieron a un tratamiento de estrés que consistió en 5 minutos a 50°C seguido de un enfriamiento rápido en hielo.

Para comprobar el crecimiento bacteriano a las 7h de incubación (en la fase exponencial) se tomó una muestra del cultivo y se prepararon diluciones decimales seriadas para realizar el recuento de ufc/ml en placas de TSA. Por cada dilución se realizaron tres réplicas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h.

- **Estudio del nivel de estrés celular**

Una vez estresadas las células hay que verificar la lesión de las bacterias, para lo cual se siguió el procedimiento descrito en el trabajo “AFNOR Validation following ISO 16140 of the iQ-Check *Salmonella* method” (Anonymous, 2004). Se cogieron muestras de las células estresadas y se realizaron diluciones decimales seriadas para realizar el recuento de ufc/ml en dos medios de cultivo diferentes. Por un lado, se sembraron placas de un medio apto para la recuperación de células bacterianas dañadas y por otro, se sembraron placas de un medio restrictivo.

En este estudio se utilizaron TSAYE, que está formado por TSA (Pronadisa) suplementado con 6gr/l de extracto de levadura (Oxoid), para recuperar las células dañadas, y XLD como medio restrictivo. Por cada dilución se realizaron tres

réplicas en cada medio. Las placas se incubaron 24h a 37°C. Se realizó el recuento de las colonias para calcular las ufc/ml y se obtuvo el valor logarítmico (log) de la concentración. Según la validación AFNOR del iQ-Check *Salmonella* (Anonymous, 2004) la diferencia de estos valores entre ambos medios debe ser al menos de 0,5 log para poder afirmar que las células están estresadas.

- **Cepas de *Salmonella* utilizadas en la contaminación artificial**

Para la contaminación artificial de los alimentos se seleccionaron cepas de *Salmonella* de origen alimentario aisladas del mismo tipo de alimento que iba a contaminarse en el ensayo, o en su caso, de otro alimento lo más parecido posible. Estas cepas pertenecían a la colección propia del equipo de investigación. En la Tabla 30 se muestran las cepas de *Salmonella* utilizadas para la contaminación artificial de los alimentos.

Cepa	Origen	Alimento contaminado con la cepa
<i>Salmonella</i> Typhimurium nº256	Salchicha de pollo	Salchichas de pollo
<i>Salmonella</i> Heidelberg nº312	Muslo de pollo	Piel de pollo
		Despiece de pollo
<i>Salmonella</i> Typhimurium nº685	Chichiquis	Chichiquis
<i>Salmonella</i> Typhimurium nº151	Salchicha de cerdo	Salchichas de cerdo
<i>Salmonella</i> Typhimurium nº134	Carne picada	Carne picada de cerdo
<i>Salmonella</i> Cubana nº238	Leche en polvo	Helados
		Queso
		Leche cruda de vaca
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº676	Almeja	Pescado
		Almejas
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº174	Pienso	Piensos
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº57	Pastel de nata	Bollos de nata
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº598	Buñuelos de crema	Bollos de crema
<i>Salmonella</i> Typhimurium nº678	Albóndiga	Comidas precocinadas
<i>Salmonella</i> Tennessee nº580	Lechuga	Ensaladas preparadas
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº36	Tortilla de patata	Tortilla de patata envasada
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº54	Huevo	Huevo

**Tabla 30.** Cepas de *Salmonella* con las que se realizó la contaminación artificial de los alimentos.

- **Niveles de inóculo de los alimentos contaminados artificialmente**

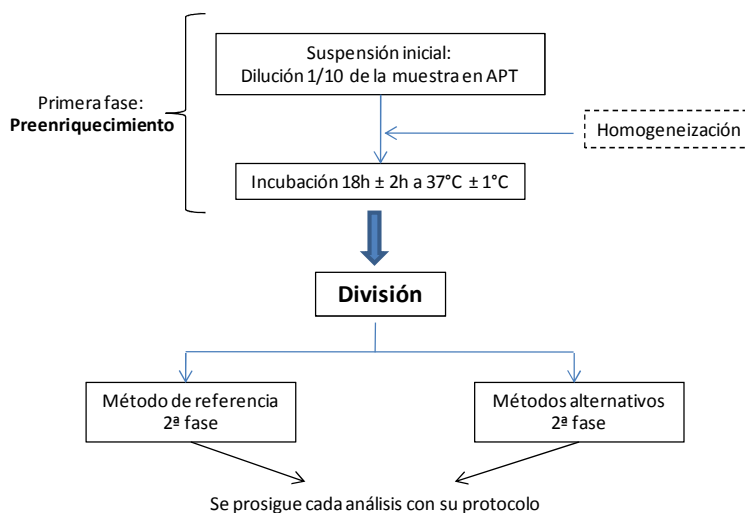
Las muestras de alimentos se contaminaron en todos los casos con células de *Salmonella* estresadas. El nivel de inóculo se calculó para cada muestra contaminada. En paralelo a la contaminación del alimento, se realizaron siembras del inóculo en placas de TSA para el recuento de ufc y estimar la cantidad de células con las que se había contaminado el alimento. Las siembras se realizaron por duplicado y las placas se incubaron durante 24h a 37°C.

- **Porcentaje de muestras positivas y negativas**

Siguiendo la recomendación descrita en la norma ISO 16140:2003, las muestras de alimentos se prepararon con la intención de obtener alrededor de un 50% de muestras contaminadas con *Salmonella* y un 50% sin contaminación.

### 3.3.3.4. Preparación de las muestras para el análisis

El análisis de las muestras mediante el método de referencia y mediante los métodos alternativos se realizó siempre a partir de las mismas muestras. Al ser la fase de preenriquecimiento idéntica para todos los métodos, la división de la muestra se realizó después del preenriquecimiento (Figura 11).



**Figura 11.** Punto del protocolo donde se realiza la división de la muestra para continuar cada análisis con su protocolo correspondiente.

### 3.3.3.5. Análisis y tratamiento de los datos obtenidos con los diferentes métodos

Se enfrentaron los resultados obtenidos mediante el método de referencia y mediante los métodos alternativos y se calcularon la concordancia positiva (PA), la concordancia negativa (NA), la desviación positiva (PD) y la desviación negativa (ND) según lo indicado en la norma ISO 16140:2003 de la manera que se indica a continuación:

	Método de referencia positivo (R+)	Método de referencia negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	Concordancia positiva (PA) (A+/R+)	Desviación positiva (PD) (R-/A+)
Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (ND) (A-/R+)	Concordancia negativa (NA) (A-/R-)

Se estudiaron tanto los resultados globales obtenidos con cada método, así como los resultados obtenidos en cada método por cada categoría de alimento.

La eficacia relativa, la especificidad relativa y la sensibilidad relativa se calcularon como indica en la norma ISO 16140:2003 según las siguientes fórmulas:

$$\text{Eficacia relativa: } AC = \frac{(PA+NA)}{N} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad relativa: } SE = \frac{PA}{PA+ND} \times 100$$

$$\text{Especificidad relativa: } SP = \frac{NA}{NA+PD} \times 100$$

donde,

$N$  es el número total de muestras (NA+PA+PD+ND)

La sensibilidad también se calculó tanto para los métodos alternativos como para el método de referencia teniendo en cuenta todos los resultados positivos confirmados como tal, es decir, incluyendo los resultados positivos adicionales que se hubieran obtenido con un método alternativo y no con el de referencia. El cálculo de esa sensibilidad relativa se realizó como indica la norma ISO 16140:2003 según las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad para el método alternativo} = \frac{PA+PD}{PA+PD+ND}$$

$$\text{Sensibilidad para el método de referencia} = \frac{PA+ND}{PA+PD+ND}$$

### 3.3.4. Nivel de detección relativa

#### 3.3.4.1. Definición

El límite de detección relativa es el menor número de microorganismos diana que pueden detectarse en la muestra en un 50% de las veces mediante los métodos alternativos y de referencia.

#### 3.3.4.2. Matrices de alimentos utilizadas

Para calcular el nivel de detección relativa se eligió un producto alimentario por cada una de las categorías de alimentos descritos en el apartado 3.3.3.1. Cada alimento se contaminó con una cepa de *Salmonella* diferente, aislada del mismo tipo de alimento o en su caso, de un alimento lo más similar posible. Estas combinaciones “matriz alimentaria/cepa de *Salmonella*” se analizaron tanto por el método de referencia como por los métodos alternativos. Las combinaciones utilizadas fueron:

- Huevos contaminados con *Salmonella* Enteritidis nº54 (origen de la cepa utilizada: interior de huevo).
- Helado contaminado con *Salmonella* Cubana nº238 (origen de la cepa utilizada: leche en polvo).

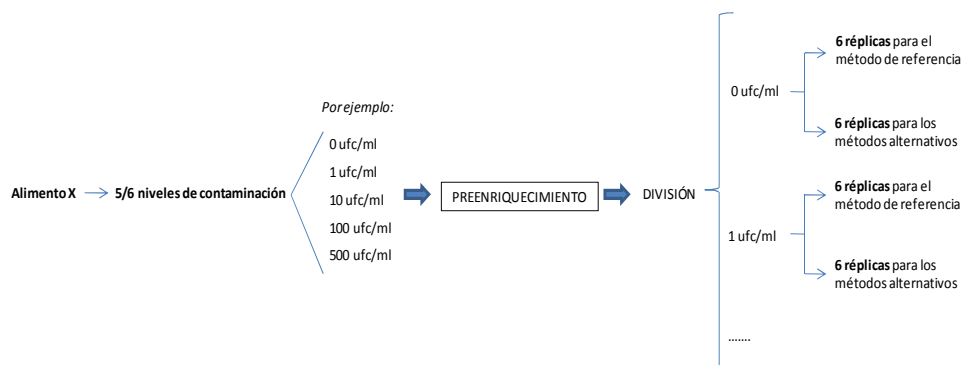
- Pienso animal contaminado con *Salmonella* Enteritidis nº174 (origen de la cepa utilizada: pienso).
- Pescado contaminado con *Salmonella* Enteritidis nº676 (origen de la cepa utilizada: almeja).
- Salchichas de pollo contaminadas con *Salmonella* Typhimurium nº256 (origen de la cepa utilizada: salchicha de pollo).

### 3.3.4.3. Contaminación de los alimentos

Se estudiaron 6 niveles de contaminación con el microorganismo diana por cada tipo de alimento, menos en el caso de las salchichas de pollo en los que solamente se estudiaron 5 niveles de contaminación. En todos los casos el primer nivel constituía el control negativo, es decir, las muestras sin contaminar.

Tanto para el método de referencia como para los alternativos, se realizaron 6 réplicas de cada combinación “matriz alimentaria/nivel de contaminación”.

Como la fase de preenriquecimiento es la misma en todos los métodos, la división se realizó en el segundo paso en el que los métodos difieren, continuando a partir de este punto cada método con su protocolo correspondiente.



**Figura 12.** Procedimiento de contaminación de los alimentos utilizados en el estudio del nivel de detección relativa.

#### 3.3.4.4. Cálculo del nivel de detección relativa

Se utilizó el procedimiento  $LOD_{50}$  (*50% endpoint Limit of Detection*) para calcular el nivel de detección relativa. Se determinó el punto o nivel en el que más del 50% de las réplicas de la muestra ofrecía un resultado positivo, y el nivel en el que menos del 50% de las réplicas de la muestra tenían un resultado positivo. Ese punto o valor es el nivel de detección relativa. El nivel de detección relativa se expresa como un intervalo.

Los valores del nivel de detección se calcularon para cada combinación “matriz/cepa” mediante el método *Spearman-Kärber* con un intervalo de confianza del 95% (U.S. Food and Drug Administration, 2006).

## 4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS DISEÑADOS CON DOS KITS COMERCIALES

Los métodos alternativos propuestos en este estudio se compararon con dos kits comerciales para detección de *Salmonella* en alimentos mediante PCR a tiempo real. Los kits que se probaron fueron el “iQ-Check™ *Salmonella* II Kit” de Bio-Rad y el “Salmofast® COMPLET” de Microbial (Girona, España). Ambos kits contienen tanto los reactivos necesarios para realizar la extracción de ADN a partir de la muestra de alimento, como los reactivos necesarios para realizar, una vez obtenido el ADN, la reacción de PCR a tiempo real. En los dos kits el principio de la PCR se basa en sondas marcadas con fluorescencia: una sonda para detectar el fragmento de *Salmonella* y la otra para detectar el control interno de amplificación (incluido en los reactivos de la PCR).

### 4.1. Muestras de alimentos utilizadas

Se seleccionaron diferentes tipos de alimentos y se analizaron 10 muestras de cada uno de ellos:

- Despiece de pollo y piel de pollo
- Helado

- Pescado
- Pienso para vacuno
- Bollos de nata y de crema
- Huevo
- Salchichas de pollo

#### **4.2. Contaminación de los alimentos**

Se contaminaron aproximadamente el 50% de las muestras analizadas. Cada tipo de alimento se contaminó con una cepa de *Salmonella* diferente:

- Despiece de pollo y piel de pollo: *Salmonella* Heidelberg nº312
- Helados: *Salmonella* Cubana nº238
- Pescado: *Salmonella* Enteritidis nº676
- Pienso para vacuno: *Salmonella* Enteritidis nº174
- Bollos de nata: *Salmonella* Enteritidis nº57
- Bollos de crema: *Salmonella* Enteritidis nº598.
- Huevo: *Salmonella* Enteritidis nº54
- Salchichas de pollo: *Salmonella* Typhimurium nº256

Los microorganismos se incubaron en placas de TSA durante 24h a 37°C. A partir de esas placas se preparó una suspensión celular en solución salina a una concentración de 0,5 McFarland (equivale aproximadamente a  $10^8$  células/ml) de cada una de las cepas. Se realizaron diluciones decimales seriadas de las suspensiones y se contaminaron las muestras con 1 ml de la dilución  $10^{-7}$ . Para comprobar la cantidad de células que se habían inoculado en el alimento, se realizaron en paralelo siembras de esa dilución por duplicado en placas de TSA. Las placas se incubaron 24h a 37°C y se calcularon las ufc/ml.



### **4.3. Protocolo común para todos los métodos**

La primera fase del protocolo fue la misma para todos los métodos. Se realizó la fase de preenriquecimiento descrita en el método de referencia (Apartado 3.1): 25 gr de muestra se homogeneizaron con 225 ml de agua de peptona tamponada. Las suspensiones seleccionadas (alrededor del 50%) fueron contaminadas con los microorganismos indicados en el apartado 4.2. Las suspensiones se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18\text{h} \pm 2\text{h}$ .

### **4.4. Protocolo específico de cada método**

A partir de la fase de preenriquecimiento, se continuó con el protocolo descrito para cada método. Los protocolos del método de referencia y de los métodos alternativos son los detallados en los apartados 3.1 y 3.2. Para los kits comerciales se continuó con las indicaciones proporcionadas por los fabricantes. En ambos métodos comerciales en primer lugar se realizó la extracción del ADN con los reactivos proporcionados en cada uno de ellos, y posteriormente se realizó la PCR a tiempo real siguiendo lo indicado en el protocolo de cada kit.

# RESULTADOS

---

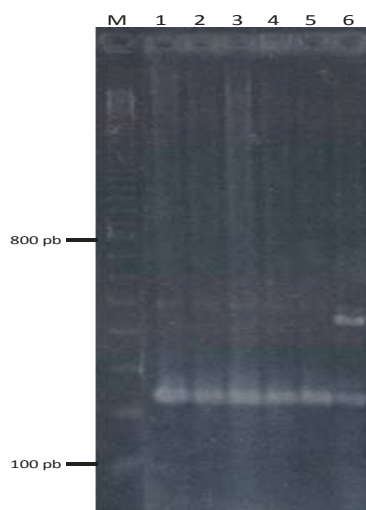


## 1. SELECCIÓN DEL GEN DIANA PARA UTILIZAR EN LA DETECCIÓN DE *Salmonella*

Para determinar cuál sería el gen diana más idóneo para detectar *Salmonella* se analizaron cuatro genes diferentes, descritos en la bibliografía con anterioridad al comienzo de este trabajo. Para ello, se realizaron diferentes reacciones de amplificación con los iniciadores descritos por diversos autores para cada uno de los genes (Tabla 3 de Materiales y Métodos).

### 1.1. Gen *dnaK*

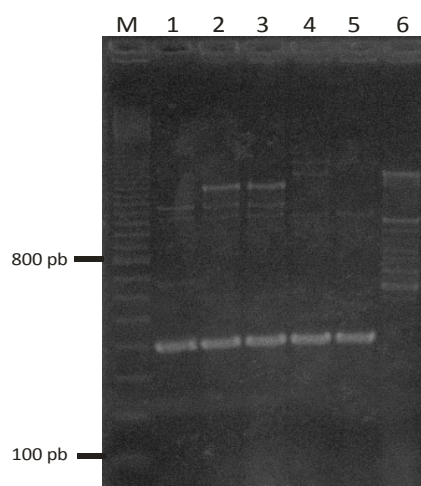
Mediante los iniciadores descritos para amplificar el gen *dnaK* de *Salmonella* por Simpkins SA y colaboradores (2000) se obtuvo un producto de amplificación de 236 pb en los 5 aislamientos de *Salmonella* estudiados (Tabla 5 de Materiales y Métodos). En la cepa de *Escherichia coli*, utilizada como control negativo, se observó además del producto de amplificación específico de *Salmonella* una banda adicional superior a 400 pb. (Figura 13).



**Figura 13.** Resultado de la amplificación del gen *dnaK*. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* Typhimurium nº128; **2:** *Salmonella* Enteritidis nº165; **3:** *Salmonella* Enteritidis nº199; **4:** *Salmonella* IIIb 48:r:z; **5:** *Salmonella* Hadar; **6:** *Escherichia coli* CECT 679.

## 1.2. Gen 16S rRNA

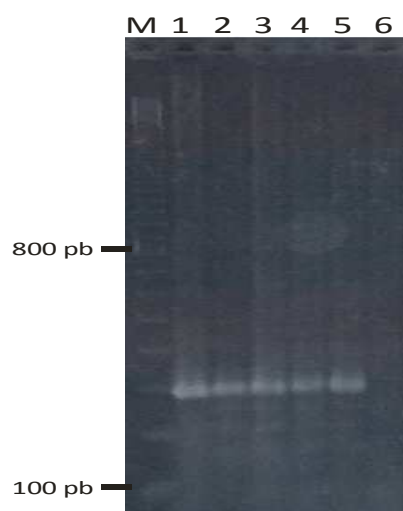
Mediante los iniciadores descritos para amplificar el gen 16S rRNA de *Salmonella* por Trkov M y colaboradores (2003) se obtuvo un producto de amplificación de 402 pb en los aislamientos de *Salmonella* estudiados (Figura 14). En estos aislamientos también se observaron bandas inespecíficas de tamaño superior. La muestra utilizada como control negativo, *Escherichia coli* CECT 679, no presentó el producto de amplificación de 402 pb, pero sí se observaron bandas adicionales superiores a 500 pb.



**Figura 14.** Resultado de la amplificación del gen 16S rRNA. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* Typhimurium nº128; **2:** *Salmonella* Enteritidis nº165; **3:** *Salmonella* Enteritidis nº199; **4:** *Salmonella* IIIb 48:r:z; **5:** *Salmonella* Hadar; **6:** *Escherichia coli* CECT 679.

## 1.3. Gen *invA*

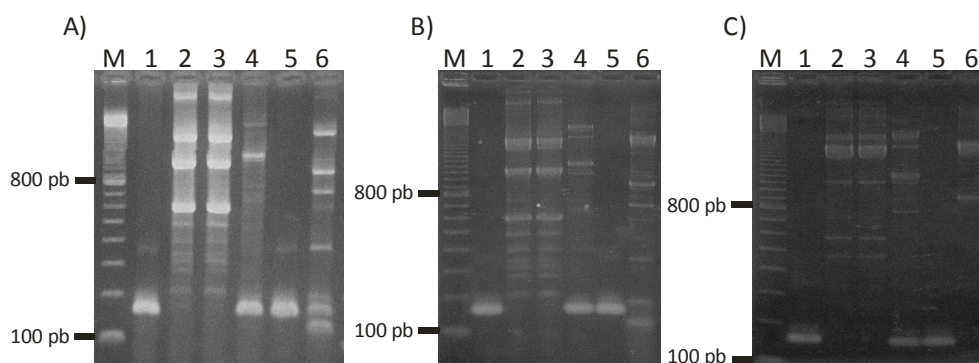
La reacción de amplificación realizada con los iniciadores descritos para el gen *invA* de *Salmonella* por Rahn K y colaboradores (1992) generó un producto de amplificación de 285 pb en todos los aislamientos de *Salmonella* analizados. En el control negativo *Escherichia coli*, no se observó ningún producto de amplificación (Figura 15).



**Figura 15.** Resultado de la amplificación del gen *invA*. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* Typhimurium nº128; **2:** *Salmonella* Enteritidis nº165; **3:** *Salmonella* Enteritidis nº199; **4:** *Salmonella* IIIb 48:r:z; **5:** *Salmonella* Hadar; **6:** *Escherichia coli* CECT 679.

#### 1.4. Gen *ompC*

Para la detección del gen *ompC* de *Salmonella* se utilizaron los iniciadores descritos por Kwang J y colaboradores (1996). Al comienzo de la experimentación las condiciones empleadas para la amplificación comprendieron 38 ciclos de amplificación y una temperatura de anillamiento de 58°C (Figura 16A). En estas condiciones el fragmento de amplificación esperado de 159 pb solo se observó en los aislamientos de *Salmonella* de las calles 1, 4 y 5. Además de esa banda, en los aislamientos 1 y 5 se observó otra banda de superior tamaño de aproximadamente 350 pb. En el aislamiento 4 aparecieron una serie de bandas superiores a 400 pb. Los aislamientos de *Salmonella* de las calles 2 y 3 no presentaron la banda específica de 159 pb, pero sí otras bandas de mayor tamaño. En la cepa de control negativo se pudo observar la banda de 159 pb además de otras bandas adicionales de tamaño superior e inferior.



**Figura 16.** Reacciones de PCR realizadas con los iniciadores específicos del gen *ompC*. **A)** PCR inicial en la cual las condiciones de amplificación fueron de 38 ciclos y una temperatura de anillamiento de 58°C. **B)** PCR en la que se utilizaron 35 ciclos de amplificación y una temperatura de anillamiento de 58°C. **C)** PCR en la que se utilizaron 30 ciclos y una temperatura de anillamiento de 56°C. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* Typhimurium nº128; **2:** *Salmonella* Enteritidis nº165; **3:** *Salmonella* Enteritidis nº199; **4:** *Salmonella* IIIb 48:r:z; **5:** *Salmonella* Hadar; **6:** *Escherichia coli* CECT 679.

En un segundo intento por mejorar los resultados se probó la amplificación con 35 ciclos en lugar de 38 (Figura 16B). Los aislamientos de las calles 1, 4 y 5 presentaron el fragmento de amplificación de 159 pb. La banda de 350 pb que se observaba en los aislamientos de las calles 1 y 5 desapareció, pero persistieron las bandas superiores en el aislamiento de la calle 4. En los aislamientos de *Salmonella* de las calles 2 y 3 no se consiguió amplificar el fragmento de 159 pb, y las bandas de tamaños superiores siguieron estando presentes. El control negativo no presentó el producto de amplificación de 159 pb, pero sí las bandas adicionales de tamaño superior e inferior.

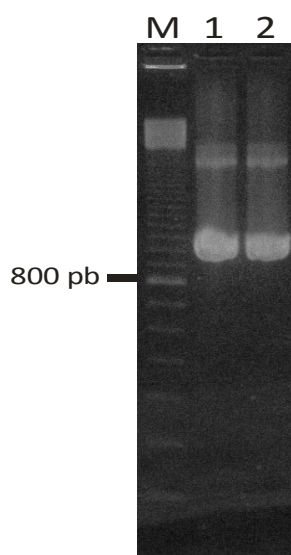
Por último, se probó un programa de amplificación de 30 ciclos con una temperatura de anillamiento de 56°C (Figura 16C). El producto de amplificación de 159 pb solo se observó en los aislamientos de las calles 1, 4 y 5. En el aislamiento de la calle 4 seguían presentes bandas inespecíficas de tamaño superior a 700 pb. En los aislamientos de las calles 2 y 3 la serie de bandas de tamaño superior seguía presente. En el control negativo se observaron bandas superiores a 800 pb.

## 2. DISEÑO DE UNA PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella*

En base a los resultados obtenidos en las diferentes reacciones de amplificación, se determinó que el gen más conveniente para diseñar una PCR capaz de detectar específicamente *Salmonella* era el gen *invA*. La pareja de iniciadores elegida fue la denominada 139/141, descrita por Rahn K y colaboradores (1992) que amplifica un fragmento del gen *invA* de un tamaño de 285 pb.

### 2.1. Diseño de un control interno de amplificación

Se diseñó y se sintetizó un control interno de amplificación según la estrategia y el protocolo descritos en el apartado 2.3.1 de Materiales y Métodos. Tras la amplificación del fragmento de fago  $\lambda$  (985 pb) con los iniciadores quiméricos diseñados para crear el control interno, el producto amplificado que se obtuvo fue de 1025 pb (Figura 17). Este fragmento se purificó y fue usado como control interno (CI).



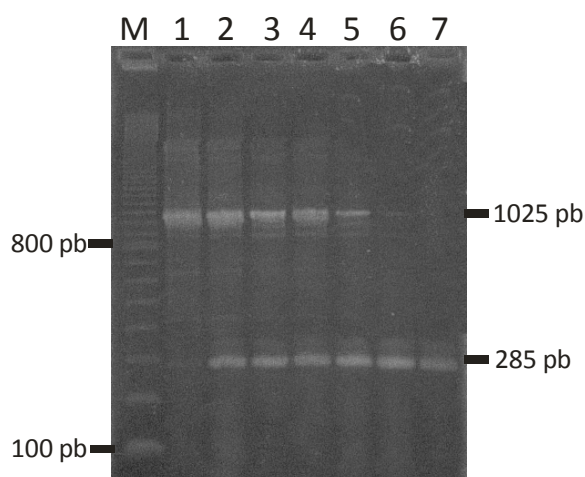
**Figura 17.** Fragmentos amplificados correspondientes al control interno. **M:** marcador de peso molecular; **Calles 1 y 2:** banda de 1025 pb correspondiente al fragmento del control interno.



En las calles 1 y 2 de la Figura 17, se observa la banda de 1025 pb correspondiente al fragmento del control interno. En la parte superior del gel se aprecia un bandeo inespecífico característico de este tipo de quimeras.

### 2.1.1. Límite de detección del control interno

Para estudiar el límite de detección del control interno, se añadió a la reacción de PCR 1  $\mu$ l de las diluciones decimales realizadas del CI. De este modo se pretendía determinar la concentración más baja de CI detectable. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18.

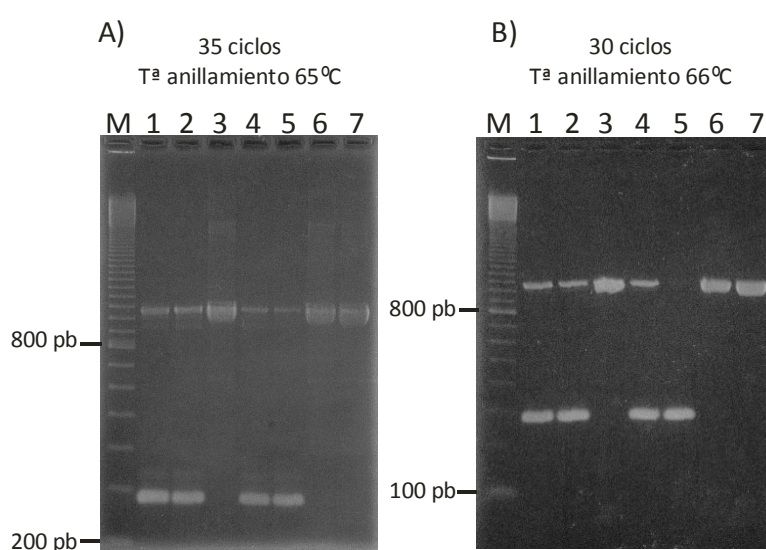


**Figura 18.** Límite de detección del control interno. **M:** marcador de peso molecular; **1:** Dilución  $10^{-1}$  del CI; **2:** Dilución  $10^{-2}$  del CI; **3:** Dilución  $10^{-3}$  del CI; **4:** Dilución  $10^{-4}$  del CI; **5:** Dilución  $10^{-5}$  del CI; **6:** Dilución  $10^{-6}$  del CI; **7:** Dilución  $10^{-7}$  del CI. Se señalan la banda de 1025 pb específica del CI y la de 285 pb específica del gen *invA* de *Salmonella*.

Como se observa en la Figura 18, el fragmento del control interno se visualizó claramente hasta la dilución  $10^{-5}$ . En base a estos resultados, se decidió utilizar una concentración inferior (dilución  $10^{-4}$ ) del control interno en las posteriores reacciones de PCR.

## 2.2. Optimización de la PCR para la detección de *Salmonella*

Se realizaron diferentes ensayos con la intención de optimizar la reacción de PCR. Los ajustes realizados implicaron tanto la reducción de ciclos en el programa de amplificación como el aumento de la temperatura de anillamiento. En la Figura 19 se muestran los resultados de la optimización de la PCR.



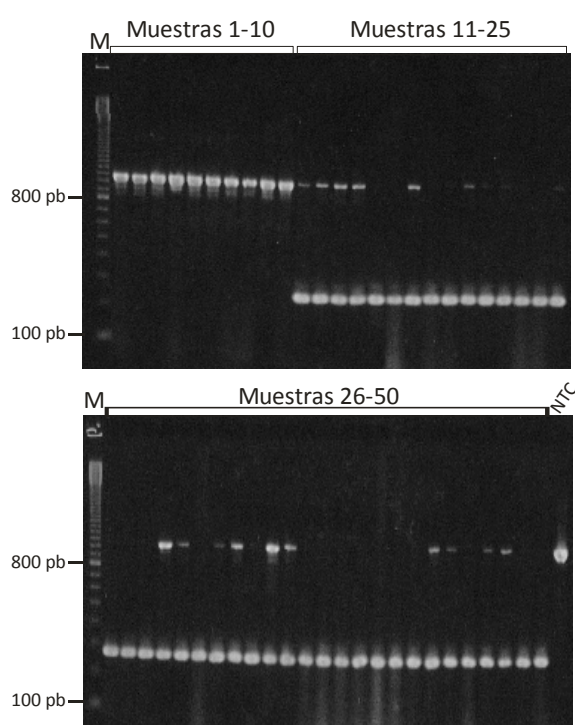
**Figura 19.** Optimización de las condiciones de la PCR para la detección de *Salmonella*. **A)** Programa de PCR de 35 ciclos con una temperatura de anillamiento de 65°C. En las muestras 1, 2 y 3 la cantidad de ADN es de 1 µl. En las muestras 4, 5 y 6 es de 2 µl. **B)** Programa de PCR de 30 ciclos y temperatura de anillamiento de 66°C. En las muestras 1, 2 y 3 la cantidad de ADN es de 0,5 µl. En las muestras 4, 5 y 6 es de 1 µl. **M:** marcador de peso molecular; **Calles 1 y 4:** *Salmonella* Typhimurium DT104; **2 y 5:** *Salmonella* Enteritidis PT1; **3 y 6:** *Escherichia coli* CECT 679; **7:** Control negativo sin ADN (NTC).

Se observó que al disminuir el número de ciclos del programa de amplificación y aumentar la temperatura de anillamiento, las bandas inespecíficas desaparecían.

Las condiciones optimizadas de la PCR, con las que se realizaron los ensayos posteriores, fueron finalmente las descritas en el apartado 2.3.3 de Materiales y Métodos.

### 2.3. Ensayo de validación de la PCR para la detección de *Salmonella*

Para comprobar la especificidad del método diseñado se analizaron 50 cepas diferentes mediante PCR, tanto de aislamientos de *Salmonella* como de otros microorganismos relacionados (Tabla 9 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20.



**Figura 20.** Resultados obtenidos mediante la PCR convencional diseñada para la detección de *Salmonella* en cepas de *Salmonella* y otros microorganismos relacionados. El orden y número identificativo de cada cepa utilizada en la PCR es el detallado en la Tabla 9 de Materiales y Métodos. **M:** marcador de peso molecular; **NTC:** control negativo sin ADN; **Calles 1-10:** Microorganismos relacionados con *Salmonella*; **Calles 11-50:** Cepas de *Salmonella*.

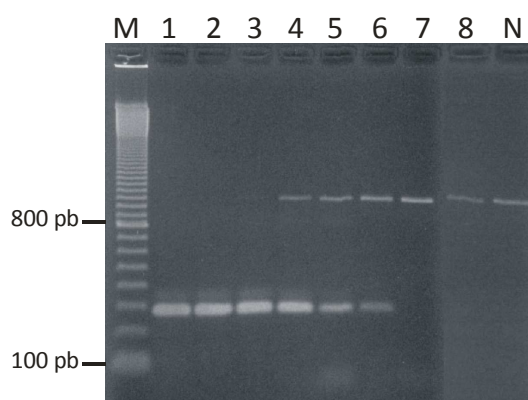
En las 10 primeras calles se pueden observar los resultados obtenidos en las cepas de microorganismos que no pertenecen al género *Salmonella*. En estos casos únicamente se amplificó el fragmento específico del control interno, pero

no el específico del gen *invA* de *Salmonella*. En el resto de las muestras podemos observar la aparición de la banda del gen *invA*, pudiendo aparecer en algunos casos también la banda del CI. En el control negativo, como cabría esperar, únicamente se amplificó el fragmento del CI.

Por lo tanto, mediante PCR se pudieron detectar los 40 aislamientos de *Salmonella* analizados, mientras que las cepas que no pertenecían al género *Salmonella* mostraron un resultado negativo.

#### 2.4. Límite de detección del gen *invA* mediante PCR

Mediante espectrofotometría se calculó la concentración de ADN extraída de la cepa *Salmonella* Enteritidis nº165, cepa utilizada para calcular el límite de detección. La concentración de ADN fue de 644 ng/μl. A partir de esta cantidad se realizaron diluciones seriadas 1/5, abarcando un rango de entre 644 ng/μl y 8 pg/μl de ADN. Los resultados obtenidos en la PCR se muestran en la Figura 21.



**Figura 21.** Resultado del límite de detección del gen *invA*. **M:** marcador de peso molecular; **1:** Cantidad de ADN ensayada de 644 ng/μl; **2:** 128 ng/μl de ADN; **3:** 25 ng/μl de ADN; **4:** 5 ng/μl de ADN; **5:** 1 ng/μl de ADN; **6:** 200 pg/μl de ADN; **7:** 40 pg/μl de ADN; **8:** 8 pg/μl de ADN; **N:** control negativo sin ADN.

El límite de detección de la PCR fue de 200 pg/μl de ADN. Como se observa en la Figura 21, a partir de esa cantidad de ADN la banda específica de *Salmonella* no fue visible.

### 3. DISEÑO DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *invA* CON UNA SONDA TaqMan®

#### 3.1. PCR a tiempo real con sonda Invavitone

Con el fin de determinar la especificidad de la PCR a tiempo real diseñada para detectar el gen *invA*, se analizaron 48 cepas distintas de *Salmonella* además de otros 8 microorganismos relacionados con esta bacteria que fueron utilizados como controles negativos.

El resultado de la amplificación y detección a tiempo real mediante la sonda Invavitone se muestra en la Tabla 31. Las cepas están ordenadas según el código de cepa de la colección de nuestro grupo de investigación.

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Fagotipo	Resultado	Ct
C1	<i>Citrobacter freundii</i>				-	
E1	<i>Enterobacter cloacae</i>				-	
K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				-	
P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				-	
CECT	<i>Hafnia alvei</i>				-	
CECT 484	<i>Proteus vulgaris</i>				-	
CECT 583	<i>Shigella boydii</i>				-	
CECT 679	<i>Escherichia coli</i>				-	
7	<i>Salmonella enterica</i>	I	Virchow		+	17,80
8	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami		-	Undet.
10	<i>Salmonella enterica</i>	I	Abony		+	16,30
20	<i>Salmonella enterica</i>	I	Arizonae		-	Undet.
26	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	4	+	15,81
39	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	39	+	16,13
59	<i>Salmonella enterica</i>	I	Dublin		+	13,28
69	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	96	+	21,94
72	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	66	+	20,92
74	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	12	+	21,42
75	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	169	+	13,33
76	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	120	+	21,33
78	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	193	+	28,49

**Tabla 31.** Resultado de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitone. **En rojo:** cepas de *Salmonella* que mostraron un resultado negativo para la detección del gen *invA*. **Undet.:** valor Ct no determinado.

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Fagotipo	Resultado	Ct
119	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	1	+	11,12
128	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	104	+	14,25
169	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	4	+	26,04
175	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	1	+	30,32
183	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	1	+	23,95
192	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	8	+	23,36
202	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	2	+	22,75
205	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis	8	+	23,81
232	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cremieu		+	30,29
235	<i>Salmonella enterica</i>	I	Lindenburg		+	16,78
238	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cubana		+	16,39
240	<i>Salmonella enterica</i>	IV	48:z4,z32:-		-	Undet.
241	<i>Salmonella enterica</i>	I	Braenderup		+	17,41
245	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium	52	+	11,77
246	<i>Salmonella enterica</i>	I	Duesseldorf		+	21,56
247	<i>Salmonella enterica</i>	I	Blockley		+	13,24
250	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	48:r:z		-	Undet.
257	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	58:z52:z		-	Undet.
259	<i>Salmonella enterica</i>	IV	6,14:z4,z23:-		+	19,24
261	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami		+	30,95
263	<i>Salmonella enterica</i>	I	Agona		+	15,40
264	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:z4,z23:-		-	Undet.
268	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar		+	28,22
270	<i>Salmonella enterica</i>	I	Muenchen		+	18,04
271	<i>Salmonella enterica</i>	I	Anatum		+	21,98
273	<i>Salmonella enterica</i>	I	Litchfield		+	15,82
274	<i>Salmonella enterica</i>	IV	6,14:z4,z23:-		-	Undet.
275	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar		+	19,38
276	<i>Salmonella enterica</i>	I	Fayed		+	19,64
291	<i>Salmonella enterica</i>	I	4,5,12:i:-		+	14,01
312	<i>Salmonella enterica</i>	I	Heidelberg		+	19,65
314	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:-:-		-	Undet.
328	<i>Salmonella enterica</i>	I	Montevideo		+	19,77
340	<i>Salmonella enterica</i>	I	California		+	15,61
456	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar		+	19,00

**Tabla 31 (continuación).** Resultado de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitone. **En rojo:** cepas de *Salmonella* que mostraron un resultado negativo para la detección del gen *invA*. **Undet.:** valor Ct no determinado.

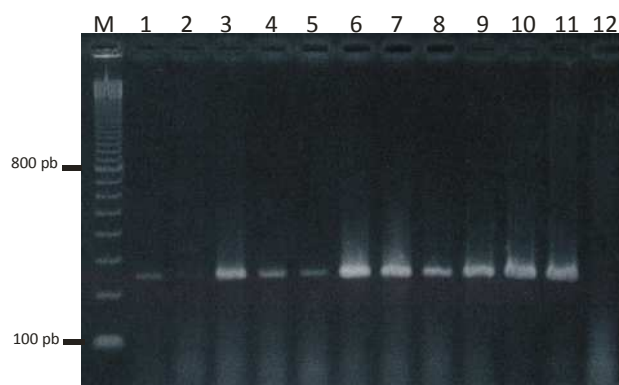
Como se observa en la tabla anterior, mediante la sonda Invavitone se detectaron 40 de las 48 cepas de *Salmonella* analizadas. Los serotipos de *Salmonella* más comunes en nuestro entorno mostraron un resultado positivo para la amplificación del gen *invA*, no obstante, algunos de los ensayos con serotipos foráneos que no son habituales de la zona como son *S. enterica* IV 48:z4,z32:-, *S. enterica* IV 6,14:z4,z23:-, *S. enterica* IIIb 48:r:z, *S. enterica* IIIa 48:-:-, *S. enterica* IIIb 58:z52:z, o *S. enterica* IIIa 48:z4,z23:-, mostraron un resultado negativo para la amplificación de dicho gen. Lo mismo ocurrió con una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Arizonae y otra de serotipo Miami.

Todas las cepas que no pertenecían al género *Salmonella* mostraron un resultado negativo para la detección.

### **3.2. Estudio de las cepas con resultado negativo para la detección del gen *invA***

Como se ha comentado anteriormente, algunas de las cepas de *Salmonella* analizadas mediante PCR a tiempo real con la sonda Invavitone no mostraron un resultado positivo para la detección del gen *invA*. Con la intención de estudiar el por qué de estos resultados, se mandaron a secuenciar las cepas problemáticas.

Para ello se diseñaron unos iniciadores, denominados Invasec1 e Invasec2 (Tabla 13 de Materiales y Métodos), capaces de amplificar una secuencia del gen *invA* que incluye la secuencia amplificada por los iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R de la PCR a tiempo real y la zona de hibridación de la sonda Invavitone. Se realizó una PCR con esos iniciadores nuevos y el resultado se muestra en la Figura 22.



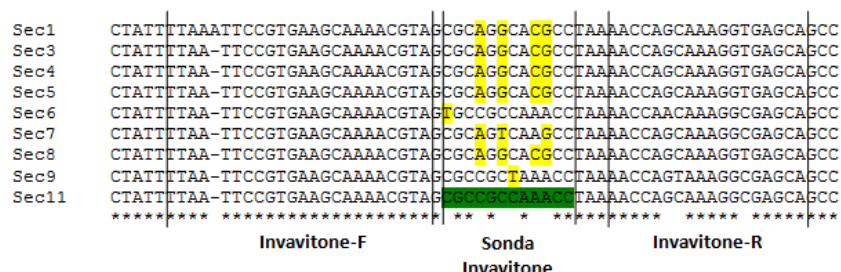
**Figura 22.** Fragmentos de amplificación obtenidos mediante PCR utilizando los iniciadores Invasec1 e Invasec2. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* IV 48:z4,z32:- nº240; **2:** *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- nº274; **3:** *Salmonella* Arizonae nº20; **4:** *Salmonella* IIIb 48:r:z nº250; **5:** *Salmonella* IIIa 48:-: nº314; **6:** *Salmonella* Miami nº8; **7:** *Salmonella* IIIb 58:z52:z nº257; **8:** *Salmonella* IIIa 48:z4,z23:- nº264; **Calles 9, 10 y 11:** Controles positivos (*Salmonella* Anatum nº271, *Salmonella* Typhimurium nº75 y *Salmonella* Enteritidis nº26 respectivamente); **12:** Control negativo (*Escherichia coli*).

Las bandas que se obtuvieron fueron de los tamaños esperados (aproximadamente 300 pb), si bien en la cepa *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- la intensidad del fragmento amplificado fue muy débil. Estos fragmentos de amplificación fueron enviados a secuenciar. Los fragmentos de las cepas *Salmonella* Anatum y *Salmonella* Enteritidis (calles 9 y 11), que habían mostrado un resultado de amplificación positivo en la PCR a tiempo real, también se mandaron a secuenciar con la intención de utilizar sus secuencias como controles.

### 3.2.1. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de los fragmentos amplificados con los iniciadores Invasec1 e Invasec2, se alinearon con el programa ClustalW (Larkin MA *et al.*, 2007) (Figura 23). Se observó que en la zona de hibridación de la sonda había variaciones importantes de la secuencia de nucleótidos. Se encontraron polimorfismos genéticos a nivel de nucleótido que justificaban la ausencia de hibridación de la sonda con esa secuencia, si bien los iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R amplificaban el fragmento.





**Figura 23.** Alineación de las secuencias de los amplicones mediante el programa ClustalW. La sonda Invavitone está señalada en verde. En amarillo se muestran las variaciones nucleotídicas con respecto a la secuencia de la sonda Invavitone. **Sec1:** secuencia de *Salmonella* IV 48:z4,z32:- n°240; **Sec3:** secuencia de *Salmonella* Arizonae n°20; **Sec4:** secuencia de *Salmonella* IIIb 48:r:z n°250; **Sec5:** secuencia de *Salmonella* IIIa 48:-: n°314; **Sec6:** secuencia de *Salmonella* Miami n°8; **Sec7:** secuencia de *Salmonella* IIIb 58:z52:z n°257; **Sec8:** secuencia de *Salmonella* IIIa 48:z4,z23:- n°264; **Sec9:** secuencia de *Salmonella* Anatum n°271; **Sec11:** secuencia de *Salmonella* Enteritidis n°26.

Por otro lado, se observó que la secuencia denominada como Sec2 (no está representada en la Figura anterior), que se corresponde con la cepa de *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- n°274, era de un tamaño mayor que el resto de las secuencias (su tamaño fue de 285 pb en comparación a los aproximadamente 215 pb del resto de secuencias) y además, su secuencia difería bastante del resto. Esta secuencia se enfrentó a todas las secuencias del GenBank mediante BLAST. Los resultados indicaron que parte de la secuencia se correspondía al gen *invA*, aunque con bastantes variaciones en la secuencia de nucleótidos; y que la parte final de la secuencia de 71 pb tenía gran similitud con un gen descrito como *Phosphotransferase system (PTS), mannose-specific IIAB component*.

En la Figura 24 se muestra la secuencia de *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- n°274 (Sec2) alineada con el resto de secuencias obtenidas. Se observa que la primera parte de su secuencia es similar a la del gen *invA*, pero que varía notablemente. Dentro del recuadro azul se encuentra la zona de hibridación de los iniciadores y de la sonda Invavitone. Al final de la secuencia se encuentra, marcada en amarillo, la secuencia identificada como *Phosphotransferase system (PTS), mannose-specific IIAB component*.

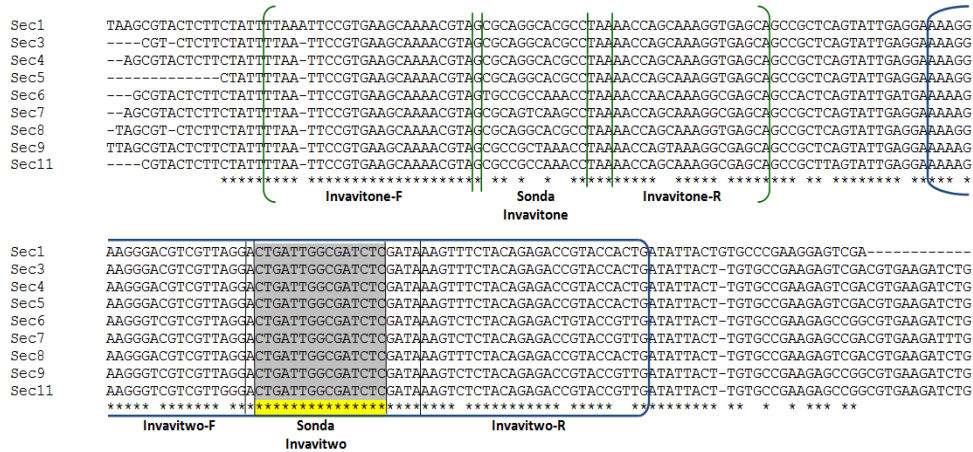


**Figura 24:** Secuencia de la cepa *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- n°274 (Sec2) alineada con el resto de secuencias de *Salmonella* analizadas. En el recuadro se señala la zona de unión de los iniciadores y de la sonda Invavitone. En amarillo se señala el trozo de secuencia identificado como *Phosphotransferase system, mannose-specific IIB component*. **Sec1:** secuencia de *Salmonella* IV 48:z4,z32:- n°240; **Sec2:** secuencia de *Salmonella* IV 6,14:z4,z23:- n°274; **Sec3:** secuencia de *Salmonella* Arizonae n°20; **Sec4:** secuencia de *Salmonella* IIIb 48:r:z n°250; **Sec5:** secuencia de *Salmonella* IIIa 48:-: n°314; **Sec6:** secuencia de *Salmonella* Miami n°8; **Sec7:** secuencia de *Salmonella* IIIa 48:z4,z23:- n°264; **Sec9:** secuencia de *Salmonella* Anatum n°271; **Sec11:** secuencia de *Salmonella* Enteritidis n°26.

### 3.3. PCR a tiempo real con sonda Invavitwo

En base a los datos aportados por la secuenciación se propuso desarrollar una nueva sonda específica de *Salmonella* buscando dentro del gen *invA* un lugar más estable y con menor variación a nivel de nucleótido. La zona elegida se muestra en la siguiente figura (Figura 25):

Resultados



**Figura 25:** Zona del gen *invA* elegida para el diseño de la nueva sonda TaqMan® e iniciadores. Esa zona se señala dentro del recuadro azul. En amarillo se muestra la estabilidad nucleotídica de la zona de hibridación de la nueva sonda. Entre las líneas verdes se muestra la zona adyacente de unión de los iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R y de la sonda Invavitone.

Como se observa la zona que se eligió para el diseño de la nueva sonda era una región próxima a la zona anteriormente elegida. Esta nueva localización se señala dentro del recuadro azul. La zona de hibridación de la nueva sonda está marcada en color gris y, tal y como se remarca en amarillo no existían variaciones nucleotídicas en esa secuencia, razón por la que fue elegida.

Basándonos en el análisis de esas secuencias genéticas, se diseñaron unos nuevos iniciadores (Invavitwo-F e Invavitwo-R) y una nueva sonda la cual se denominó Invavitwo (Apartados 2.4.3.1 y 2.4.3.2 de Materiales y Métodos).

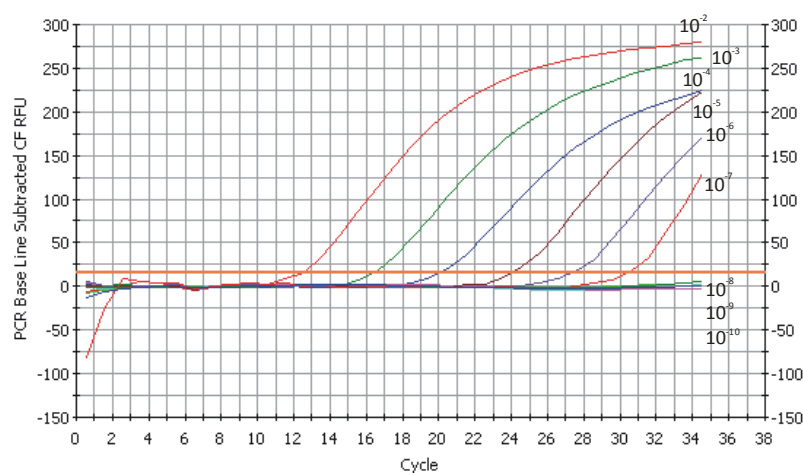
En primer lugar, se optimizó la concentración de iniciadores y sonda necesarios para la reacción de PCR, así como también el programa de amplificación, ajustando el número de ciclos empleados a 36.

Una vez optimizada la PCR se calcularon el límite de detección del CI y el límite de detección de ADN del método. Por último, se evaluó la nueva PCR a tiempo real frente a una amplia colección de aislamientos de *Salmonella* y de otros microorganismos relacionados.

Los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R, y la sonda Invavitwo fueron descritos en la Patente nº P200801267: “Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* ssp.”, en la cual constan como Entidades Titulares la UPV/EHU y Laboratorios Bromatológicos Araba.

### 3.3.1. Límite de detección del control interno

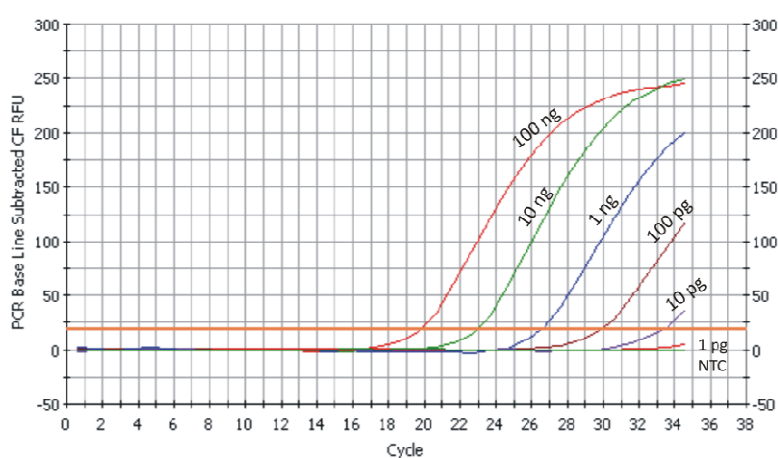
En la Figura 26 se muestra la PCR a tiempo real realizada para calcular el límite de detección del control interno. Se observó amplificación hasta la dilución  $10^{-7}$  del control interno. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la concentración de ADN del control interno era de aproximadamente  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ , el límite de detección del control interno se determinó en torno a  $1\text{ fg}/\mu\text{l}$ . La línea base se determinó automáticamente por el programa ABI Prism 7000 SDS v1.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).



**Figura 26.** Resultado de la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo para calcular el límite de detección del CI. En cada curva de amplificación está indicada la dilución del CI utilizada en esa reacción.

### 3.3.2. Límite de detección del gen *invA*

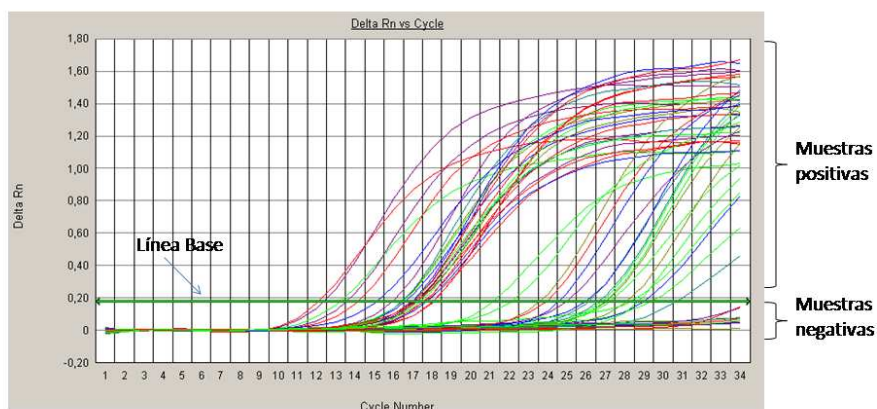
Se calculó el límite de detección del método para el gen *invA*. En la siguiente figura (Figura 27) se muestra el resultado de la PCR a tiempo real. La detección es positiva en las muestras con 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg y hasta 10 pg de ADN molde. Por lo tanto el límite de detección fue de 10 pg de ADN. La línea base se determinó automáticamente.



**Figura 27.** Límite de detección del gen *invA* de la PCR a tiempo real utilizando la sonda Invavitwo. Para cada curva de amplificación está indicada la cantidad de ADN molde añadida en la reacción. **NTC:** control negativo sin ADN.

### 3.3.3. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real

El método de PCR a tiempo real diseñado con la sonda Invavitwo se probó frente a una amplia colección de cepas de *Salmonella* (un total de 47 diferentes) y en otros 8 microorganismos relacionados. En la Figura 28 se observan las curvas de amplificación para el fragmento del gen *invA*. La línea base se determinó automáticamente por el programa. Por encima de la línea base se considera que los resultados son positivos en la detección de *Salmonella*, mientras que las líneas por debajo de esa línea base son resultados negativos.



**Figura 28.** Curvas de amplificación del fragmento del gen *invA* en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo. Por debajo de la línea base aparecen los resultados negativos y por encima los resultados positivos.

En la Tabla 32 se muestran esos mismos resultados pero indicando el resultado específico de cada cepa, tanto para la amplificación del fragmento del gen *invA* de *Salmonella* como para la del control interno. Todas las cepas de *Salmonella* fueron positivas para la amplificación del gen *invA*, a excepción de una cepa de serotipo Montevideo (señalada en la Tabla 32 en color rojo) que dio un resultado negativo. Las cepas utilizadas están ordenadas según el código de la colección de cepas de nuestro grupo de investigación.

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Amplif. gen <i>invA</i>	Ct	Amplif. CI
C1	<i>Citrobacter freundii</i>			-	Undet	+
E1	<i>Enterobacter cloacae</i>			-	Undet	+
K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			-	Undet	+
P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			-	Undet	+
CECT 158T	<i>Hafnia alvei</i>			-	Undet	+
CECT 484	<i>Proteus vulgaris</i>			-	Undet	+
CECT 583	<i>Shigella boydii</i>			-	Undet	+
CECT 679	<i>Escherichia coli</i>			-	Undet	+
7	<i>Salmonella enterica</i>	I	Virchow	+	17,37	-
8	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami	+	26,31	-

**Tabla 32.** Resultado obtenido mediante PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo en las cepas analizadas. **En rojo:** cepa de *Salmonella* que mostró un resultado negativo en la detección del gen *invA*.

Resultados

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Amplif. gen <i>invA</i>	Ct	Amplif. CI
10	<i>Salmonella enterica</i>	I	Abony	+	18,37	-
20	<i>Salmonella enterica</i>	I	Arizonae	+	12,61	-
26	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	27,16	-
39	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	28,08	-
59	<i>Salmonella enterica</i>	I	Dublin	+	30,50	-
69	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT96	+	18,06	-
72	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT66	+	18,45	-
74	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT12	+	17,46	-
75	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT169	+	17,90	-
76	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT120	+	18,19	-
78	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT193	+	18,15	-
119	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	30,58	-
128	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT104	+	19,02	-
169	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	27,89	-
175	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	29,46	-
183	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	29,22	-
192	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT8	+	27,90	-
202	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT2	+	27,36	-
205	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT8	+	31,47	-
232	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cremieu	+	18,53	-
235	<i>Salmonella enterica</i>	I	Lindenbug	+	16,89	-
238	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cubana	+	24,98	-
240	<i>Salmonella enterica</i>	IV	48:z4,z32:-	+	14,23	-
241	<i>Salmonella enterica</i>	I	Braenderup	+	18,00	-
245	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT52	+	17,65	-
246	<i>Salmonella enterica</i>	I	Duesseldorf	+	25,38	-
247	<i>Salmonella enterica</i>	I	Blockley	+	18,36	-
250	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	48:r:z	+	12,87	-
257	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	58:z52:z	+	16,26	-
259	<i>Salmonella enterica</i>	IV	6,14:z4,z23:-	+	19,04	-
261	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami	+	24,50	-
263	<i>Salmonella enterica</i>	I	Agona	+	23,42	-
264	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:z4,z23:-	+	15,02	-
268	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	17,99	-
270	<i>Salmonella enterica</i>	I	Muenchen	+	22,23	-
271	<i>Salmonella enterica</i>	I	Anatum	+	18,79	-
273	<i>Salmonella enterica</i>	I	Litchfield	+	19,05	-
275	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	18,22	-
276	<i>Salmonella enterica</i>	I	Fayed	+	32,55	-

**Tabla 32 (continuación).** Resultado obtenido mediante PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo en las cepas analizadas. **En rojo:** cepa de *Salmonella* que mostró un resultado negativo en la detección del gen *invA*.

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Amplif. gen <i>invA</i>	Ct	Amplif. CI
291	<i>Salmonella enterica</i>	I	4,5,12:i:-	+	17,43	-
312	<i>Salmonella enterica</i>	I	Heidelberg	+	18,72	-
314	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:-:-	+	14,34	-
328	<i>Salmonella enterica</i>	I	Montevideo	-	Undet	+
340	<i>Salmonella enterica</i>	I	California	+	28,21	-
456	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	28,60	-

**Tabla 32 (continuación).** Resultado obtenido mediante PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo en las cepas analizadas. **En rojo:** cepa de *Salmonella* que mostró un resultado negativo en la detección del gen *invA*.

Con los datos de la Tabla 32 se creó una tabla de contingencia (Tabla 33) para calcular la selectividad de la técnica. Para calcular la capacidad de detección, se tuvo en cuenta si los aislamientos mostraban presencia (resultado positivo) o ausencia (resultado negativo) de la curva de amplificación del gen *invA* específico de *Salmonella*.

Método de Referencia	PCR tiempo real		
	Positivo	Negativo	
Positivo	46 Verdaderos positivos	1 Falso negativo	47
Negativo	0 Falsos positivos	8 Verdaderos negativos	8
	46	9	55

**Tabla 33.** Tabla de contingencia para calcular la selectividad de la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo.

Según estos valores, la inclusividad fue del 97,8% y la exclusividad del 100% (no se detectó ningún falso positivo) para la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo. La precisión analítica fue del 98,1%.

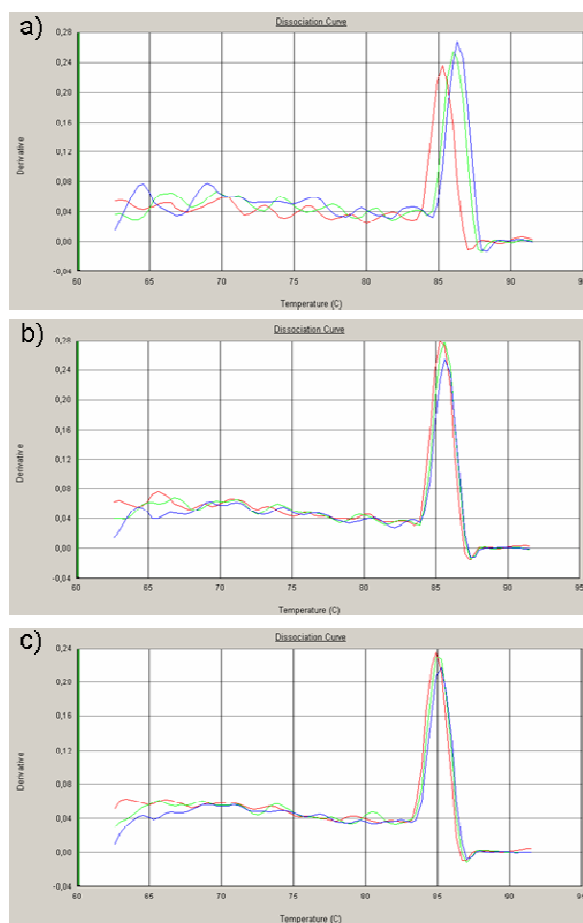


## **4. DISEÑO DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *invA* MEDIANTE SYBR Green I**

### **4.1. Diseño del control interno**

Como posibles controles internos de amplificación se diseñaron tres fragmentos de tamaños diferentes (de 447 pb, 348 pb y 288 pb), mediante iniciadores quiméricos y ADN comercial de fago  $\lambda$ . La curva de disociación del fragmento del CI presentaba una temperatura de disociación diferente a la generada por el fragmento específico de *Salmonella*, para poder realizar una correcta identificación de ambos picos.

Se obtuvieron las distintas curvas de disociación de los posibles controles internos a distintas diluciones (dilución  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ). Dichas curvas se muestran en la Figura 29.



**Figura 29.** Curvas de disociación de los posibles controles internos para la PCR a tiempo real con SYBR Green I. En cada imagen se observan tres curvas, que se corresponden con las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de los controles internos. **A)** CI diseñado mediante el iniciador *reverse* Inva ICR-1. Se generó un fragmento de 447 pb. **B)** CI diseñado mediante el iniciador *reverse* Inva ICR-2. Se obtuvo un fragmento de 348 pb. **C)** CI diseñado mediante el iniciador *reverse* Inva ICR-3. El fragmento generado fue de 288 pb.

No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos: los tres fragmentos poseían una temperatura de disociación similar y las diluciones probadas generaron una intensidad del pico de disociación semejante.

Se consideró que el fragmento más adecuado como control interno fue el sintetizado mediante el iniciador *reverse* Inva ICR-2 y la dilución  $10^{-5}$ . Por lo tanto, el control interno sería un fragmento de 348 pb.

#### 4.2. Límite de detección del control interno

En la Figura 30 se muestran los resultados de la PCR a tiempo real para calcular el límite de detección del control interno. Se observó que había amplificación hasta la dilución  $10^{-6}$  del control interno. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la concentración de ADN del CI era de aproximadamente  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , el límite de detección del CI se estableció en  $10 \text{ fg}/\mu\text{l}$ . La línea base se determinó automáticamente por el programa.

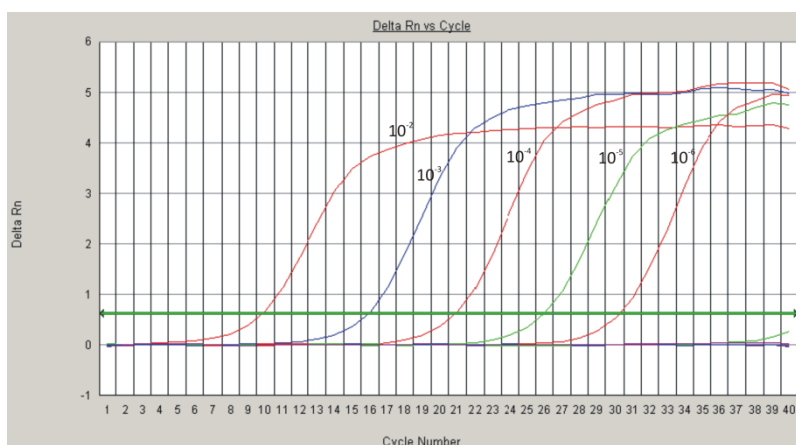
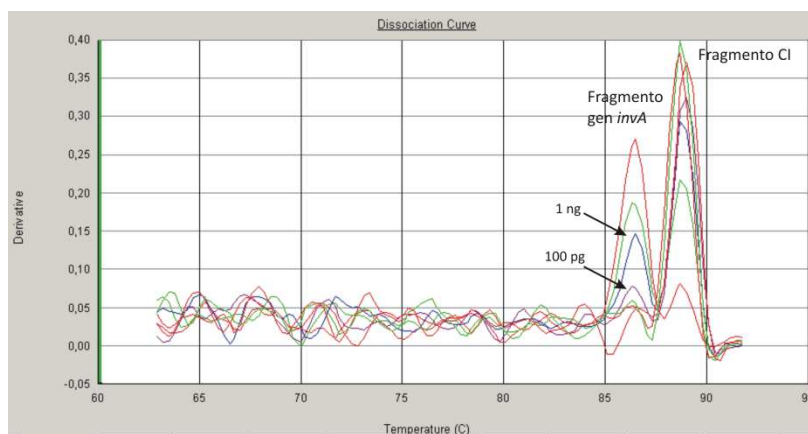


Figura 30. Cálculo del límite de detección del CI utilizado en la PCR a tiempo real con SYBR Green I.

#### 4.3. Límite de detección del gen *invA*

Se calculó el límite de detección del método de PCR a tiempo real para el gen *invA*. En la Figura 31 se observan los picos de disociación obtenidos tras la amplificación, tanto del fragmento del gen *invA* específico de *Salmonella* como del CI. La menor concentración de ADN en la que se observó el pico de *Salmonella* fue de  $1 \text{ ng}$ . A partir de  $100 \text{ pg}$  de ADN no se observó el pico de *Salmonella* y solamente se detectó el CI. Por lo tanto, el límite de detección de la PCR a tiempo real fue establecido en  $1 \text{ ng}$  de ADN.

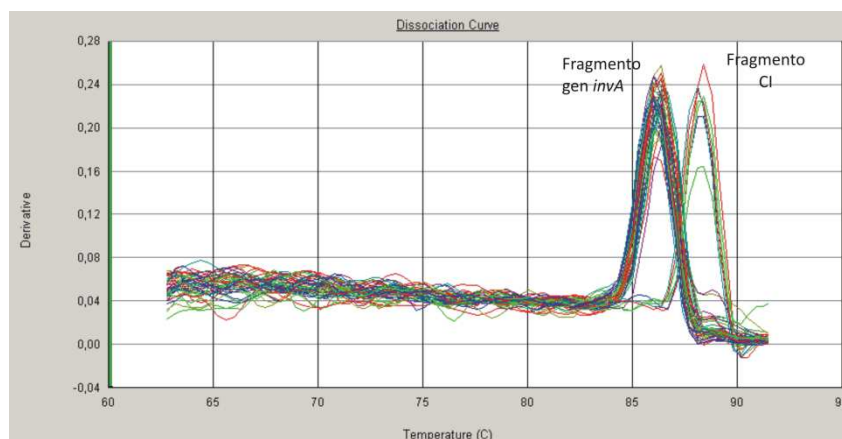


**Figura 31.** Limite de detección del gen *invA* en la PCR a tiempo real con SYBR Green I. Se señalan tanto el pico de disociación específico del gen *invA* como el específico del control interno.

#### 4.4. Estudio de la especificidad de la PCR a tiempo real

Se estudió la especificidad de la detección del gen *invA* para la identificación de *Salmonella*. La PCR a tiempo real se probó frente a una amplia colección de cepas de *Salmonella* y otros microorganismos relacionados. Los resultados de la PCR se pueden ver en la Figura 32, donde se observan dos curvas de disociación diferentes: una con un pico de disociación alrededor de los 86°C y la otra sobre los 88°C. La primera de ellas corresponde al fragmento específico del gen *invA* de *Salmonella*, mientras que la otra es la del fragmento del CI. La aparición de alguno de esos picos significa un resultado positivo en la amplificación del fragmento al que corresponda esa curva de disociación.

## Resultados



**Figura 32.** Curvas de disociación de la PCR a tiempo real con SYBR Green I. El pico de la izquierda corresponde al fragmento específico del gen *invA* y el pico de la derecha al control interno.

Los resultados de la detección para cada cepa se muestran más detalladamente en la siguiente tabla (Tabla 34):

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Amplif. gen <i>invA</i>	Amplif. CI
C1	<i>Citrobacter freundii</i>			-	+
E1	<i>Enterobacter cloacae</i>			-	+
K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			-	+
P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			-	+
CECT 158T	<i>Hafnia alvei</i>			-	+
CECT 484	<i>Proteus vulgaris</i>			-	+
CECT 583	<i>Shigella boydii</i>			-	+
CECT 679	<i>Escherichia coli</i>			-	+
7	<i>Salmonella enterica</i>	I	Virchow	+	-
8	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami	+	-
10	<i>Salmonella enterica</i>	I	Abony	+	-
20	<i>Salmonella enterica</i>	I	Arizonae	+	-
26	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	-
39	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	-
59	<i>Salmonella enterica</i>	I	Dublin	+	-
69	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT96	+	-

**Tabla 34.** Resultado de la PCR a tiempo real con SYBR Green I frente a cepas de *Salmonella* y otros géneros relacionados.

Código cepa	Especie	Subespecie	Serotipo	Amplif. gen <i>invA</i>	Amplif. CI
72	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT66	+	-
74	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT12	+	-
75	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT169	+	-
76	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT120	+	-
78	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT193	+	-
119	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	-
128	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT104	+	-
169	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT4	+	-
175	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	-
183	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT1	+	-
192	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT8	+	-
202	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT2	+	-
205	<i>Salmonella enterica</i>	I	Enteritidis PT8	+	-
232	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cremieu	+	-
235	<i>Salmonella enterica</i>	I	Lindenburg	+	-
238	<i>Salmonella enterica</i>	I	Cubana	+	-
240	<i>Salmonella enterica</i>	IV	48:z4,z32:-	+	-
241	<i>Salmonella enterica</i>	I	Braenderup	+	-
245	<i>Salmonella enterica</i>	I	Typhimurium DT52	+	-
246	<i>Salmonella enterica</i>	I	Duesseldorf	+	-
247	<i>Salmonella enterica</i>	I	Blockley	+	-
250	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	48:r:z	+	-
257	<i>Salmonella enterica</i>	IIIb	58:z52:z	+	-
259	<i>Salmonella enterica</i>	IV	6,14:z4,z23:-	+	-
261	<i>Salmonella enterica</i>	I	Miami	+	-
263	<i>Salmonella enterica</i>	I	Agona	+	-
264	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:z4,z23:-	+	-
268	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	-
270	<i>Salmonella enterica</i>	I	Muenchen	+	+
271	<i>Salmonella enterica</i>	I	Anatum	+	+
273	<i>Salmonella enterica</i>	I	Litchfield	+	-
275	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	-
276	<i>Salmonella enterica</i>	I	Fayed	+	+
291	<i>Salmonella enterica</i>	I	4,5,12:i:-	+	-
312	<i>Salmonella enterica</i>	I	Heidelberg	+	-
314	<i>Salmonella enterica</i>	IIIa	48:-:-	+	-
328	<i>Salmonella enterica</i>	I	Montevideo	+	-
340	<i>Salmonella enterica</i>	I	California	+	-
456	<i>Salmonella enterica</i>	I	Hadar	+	-

**Tabla 34 (continuación).** Resultado de la PCR a tiempo real con SYBR Green I frente a cepas de *Salmonella* y otros géneros relacionados.

En la Tabla 34 podemos observar que todas las cepas de *Salmonella* mostraron un resultado positivo para la detección del gen *invA*, mientras que las cepas que no pertenecían al género *Salmonella* mostraron un resultado negativo.

Con los datos de la Tabla 34 se generó una tabla de contingencia (Tabla 35) para calcular la selectividad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I para identificar *Salmonella* a partir de la detección del gen *invA*.

Método de Referencia	PCR tiempo real		
	Positivo	Negativo	
Positivo	47 Verdaderos positivos	0 Falso negativo	47
Negativo	0 Falsos positivos	8 Verdaderos negativos	8
	47	8	55

**Tabla 35.** Tabla de contingencia para calcular la selectividad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I.

En este caso, tanto la inclusividad como la exclusividad de la PCR a tiempo real con SYBR Green I fueron del 100%. Por lo tanto, la precisión analítica del método para detectar *Salmonella* también fue del 100%.

## 5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL MEDIANTE SONDA INVAVITWO Y SYBR Green I PARA DETECCIÓN DE *Salmonella*

### 5.1. Test de Inclusividad

Los resultados obtenidos en el test de inclusividad se detallan en la Tabla 36 donde se muestran los datos de las reacciones de PCR de los métodos alternativos. También se muestra la cantidad de inóculo (número de células) en los 9 ml de APT (agua de peptona tamponada) y las células/ml tras la incubación a 37°C durante 18h.

Cepa	Origen	ufc en 9 ml APT	cel/ml después de incubar a 37°C	SYBR Green I	Sonda Master Applied		Sonda Master Takara	
				Result.	Ct	Result.	Ct	Result.
<i>Salmonella</i> Litchfield nº6	Agua río Ereño	1,5	2,2x10 <sup>8</sup>	+	20,0	+	17,8	+
<i>Salmonella</i> Virchow nº7	Agua	1	2,0x10 <sup>8</sup>	+	20,1	+	18,3	+
<i>Salmonella</i> Miami nº8	Agua	2,5	1,8x10 <sup>8</sup>	+	27,2	+	25,2	+
<i>Salmonella</i> Abony nº10	Agua	1,5	1,7x10 <sup>8</sup>	+	19,7	+	17,5	+
<i>Salmonella</i> Litchfield nº19	-	1	2,0x10 <sup>8</sup>	+	18,7	+	16,3	+
<i>Salmonella</i> 11:lv nº9	Agua	1	6,1x10 <sup>7</sup>	+	18,9	+	18,2	+
<i>Salmonella</i> Arizonae nº20	Agua río Butrón	1	1,2x10 <sup>8</sup>	+	16,0	+	16,3	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis nº36	Tortilla de patatas	1	9,1x10 <sup>7</sup>	+	26,0	+	23,3	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 nº57	Pastel de nata	1	9,8x10 <sup>7</sup>	+	26,8	+	23,3	+
<i>Salmonella</i> Dublin nº59	-	1	7,0x10 <sup>7</sup>	+	27,2	+	23,8	+
<i>Salmonella</i> Arizonae nº83	Semilla de algodón	1	2,2x10 <sup>8</sup>	+	N/A	-	N/A	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 nº99	Derivado de aves	3	9,9x10 <sup>7</sup>	+	26,8	+	23,0	+
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund nº121	Heces varón	1	2,3x10 <sup>8</sup>	+	N/A	-	33,0	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 nº134	Carne picada	3	7,9x10 <sup>7</sup>	+	19,6	+	17,2	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 nº136	Costilla adobada	2	2,0x10 <sup>8</sup>	+	20,6	+	18,2	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 nº151	Salchicha de cerdo	1	1,7x10 <sup>8</sup>	+	20,0	+	17,5	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT96 nº231	Salchicha de pollo	1	1,5x10 <sup>8</sup>	+	20,1	+	17,4	+
<i>Salmonella</i> Cremieu nº232	Playa Ereaga	1,5	9,6x10 <sup>7</sup>	+	19,8	+	17,4	+
<i>Salmonella</i> Lindenburg nº235	Red de agua	8	9,3x10 <sup>7</sup>	+	19,9	+	17,4	+
<i>Salmonella</i> Glostrup nº237	Pimienta negra	2,5	2,1x10 <sup>8</sup>	+	N/A	-	30,9	+
<i>Salmonella</i> Cubana nº238	Leche en polvo	1	2,4x10 <sup>8</sup>	+	27,0	+	24,3	+
<i>Salmonella</i> Braenderup nº241	Playa Ereaga	2,5	8,8x10 <sup>7</sup>	+	19,6	+	17,3	+
<i>Salmonella</i> Duesseldorf nº246	Playa Arrigunaga	1,5	1,7x10 <sup>8</sup>	+	26,4	+	24,5	+
<i>Salmonella</i> Blockley nº247	Hamburguesa	1	2,0x10 <sup>8</sup>	+	21,5	+	18,7	+
<i>Salmonella</i> Goldcoast nº249	Playa Ereaga	1	1,7x10 <sup>8</sup>	+	25,6	+	23,3	+
<i>Salmonella</i> Infantis nº252	Huevo líquido	1	1,8x10 <sup>8</sup>	+	20,2	+	17,6	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT22 nº256	Salchicha de pollo	1	1,6x10 <sup>8</sup>	+	18,8	+	16,4	+

**Tabla 36.** Resultados del test de inclusividad. **En rojo:** cepas con resultado negativo para la detección de *Salmonella*. **N/A:** no determinado.



Resultados

Cepa	Origen	ufc en 9 ml APT	cel/ml después de incubar a 37°C	SYBR Green I	Sonda Master Applied		Sonda Master Takara	
				Result.	Ct	Result.	Ct	Result.
<i>Salmonella</i> Kottbus n°258	Playa Arrigunaga	1	9,3x10 <sup>7</sup>	+	18,6	+	16,1	+
<i>Salmonella</i> Chailey n°260	Playa Bakio	1	2,0x10 <sup>8</sup>	+	19,5	+	16,5	+
<i>Salmonella</i> Agona n°263	Playa La Arena	1	1,7x10 <sup>8</sup>	+	19,9	+	17,6	+
<i>Salmonella</i> Hadar n°268	Hamburguesa de ave	1	2,2x10 <sup>8</sup>	+	19,3	+	16,8	+
<i>Salmonella</i> Manhattan n°269	Playa La Arena	1,5	8,8x10 <sup>7</sup>	+	19,2	+	17,2	+
<i>Salmonella</i> 4,12:b:- n°267	Hamburguesa de pollo	1	1,4x10 <sup>8</sup>	+	18,0	+	17,1	+
<i>Salmonella</i> Heidelberg n°312	Muslito de pollo	1	2,2x10 <sup>8</sup>	+	19,7	+	16,8	+
<i>Salmonella</i> Montevideo n°328	Soja para piensos	1	1,9x10 <sup>8</sup>	+	N/A	-	N/A	-
<i>Salmonella</i> Anatum n°331	Magro de cerdo	4	1,8x10 <sup>8</sup>	+	20,5	+	17,7	+
<i>Salmonella</i> Rissen n°332	Harina de soja	1	2,1x10 <sup>8</sup>	+	26,8	+	25,2	+
<i>Salmonella</i> California n°333	Soja para piensos	1	2,3x10 <sup>8</sup>	+	27,4	+	24,3	+
<i>Salmonella</i> Anatum n°342	Chorizo	1,5	6,0x10 <sup>7</sup>	+	20,3	+	18,1	+
<i>Salmonella</i> Derby n°343	Chorizo	1,5	1,9x10 <sup>8</sup>	+	25,9	+	22,7	+
<i>Salmonella</i> Derby n°344	Chorizo	2	1,9x10 <sup>8</sup>	+	27,1	+	24,1	+
<i>Salmonella</i> Bredeney n°346	Chorizo	1	2,0x10 <sup>8</sup>	+	26,3	+	24,0	+
<i>Salmonella</i> Anatum n°347	Magro de cerdo	5,5	1,1x10 <sup>8</sup>	+	19,2	+	17,6	+
<i>Salmonella</i> Ohio n°357	Carne	1	1,8x10 <sup>8</sup>	+	19,5	+	17,3	+
<i>Salmonella</i> Give n°379	Carne de cerdo	1	1,0x10 <sup>8</sup>	+	N/A	-	32,3	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium n°414	Carne picada	1	1,5x10 <sup>8</sup>	+	19,7	+	17,6	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis n°464	Bollo de mantequilla	2,5	1,7x10 <sup>8</sup>	+	26,0	+	23,0	+
<i>Salmonella</i> Tennessee n°580	Lechuga	4,5	2,6x10 <sup>8</sup>	+	27,0	+	25,1	+
<i>Salmonella</i> 4,5,12:i:- n°620	Porcino	1	1,0x10 <sup>8</sup>	+	19,8	+	17,6	+
<i>Salmonella</i> 4,5,12:i:- n°628	Porcino	1,5	1,5x10 <sup>8</sup>	+	18,8	+	16,7	+
<i>Salmonella</i> Anatum n°641	Carne fresca	1	8,4x10 <sup>7</sup>	+	19,2	+	17,1	+
<i>Salmonella</i> 4,5,12:i:- n°665	Porcino	1	1,8x10 <sup>8</sup>	+	19,7	+	17,5	+
<i>Salmonella</i> Infantis n°683	Cáscara de huevo	2,5	2,5x10 <sup>8</sup>	+	19,7	+	17,4	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium U302 n°685	Chichiquis	3,5	1,7x10 <sup>8</sup>	+	19,3	+	16,8	+

**Tabla 36 (continuación).** Resultados del test de inclusividad. **En rojo:** cepas con resultado negativo para la detección de *Salmonella*. **N/A:** no determinado.

---

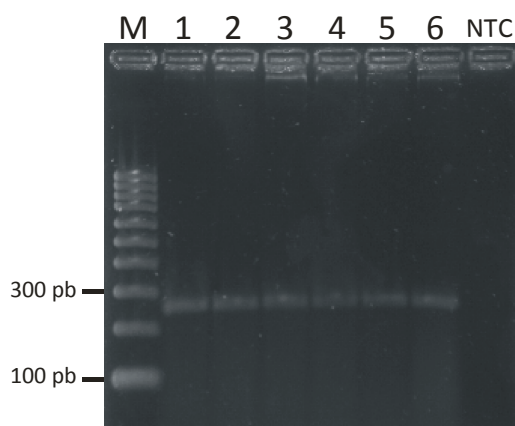
Cinco cepas de *Salmonella* dieron lugar a unos resultados no esperados (resaltadas en rojo en la Tabla 36): a) Las cepas *Salmonella* Montevideo nº328 y la *Salmonella* Arizonae nº83 dieron un resultado positivo con el SYBR Green I pero no se detectaron con la sonda Invavitwo, con independencia de la *master mix* utilizada. b) El resultado de las cepas *Salmonella* Glostrup nº237, *Salmonella* Give nº379 y *Salmonella* Schwarzengrund nº121 fue positivo en las reacciones de PCR con SYBR Green I y con la sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Takara (Otsu, Shiga, Japan), y negativo al utilizar la sonda con la *master mix* de Applied Biosystems. Cabe resaltar que en esas cepas aun obteniendo un resultado positivo con la *master mix* de Takara, el valor Ct (*threshold cycle* o ciclo umbral) de las cepas con esa *master mix* fue muy alto, en torno a 32.

Por lo tanto, la inclusividad del método de PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I fue del 100%, mientras que con la sonda utilizando la *master mix* de Takara fue del 96,3% y utilizando la *master mix* de Applied Biosystems del 90,7%.

#### **5.1.1. Estudio de las cepas con resultado negativo en el test de inclusividad**

Como se ha comentado en el apartado anterior, algunas de las cepas analizadas no dieron un resultado positivo en la detección. Con la intención de estudiar la causa de esto, las cepas problemáticas se enviaron a secuenciar.

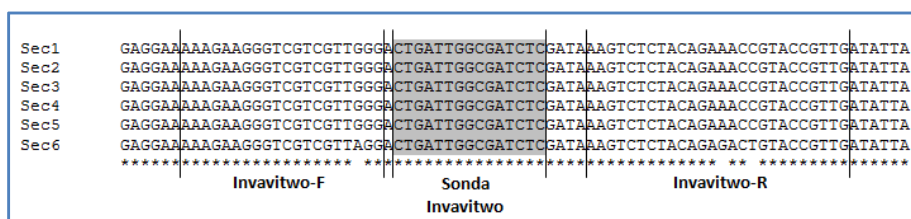
Para ello se realizó una PCR con los iniciadores Invasec1 e Invasec2 (Tabla 13 de Materiales y Métodos) que amplifican un fragmento del gen *invA* que incluye la secuencia amplificada por los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R y la zona de hibridación de la sonda. El resultado de la PCR se muestra en la Figura 33:



**Figura 33.** Separación electroforética de los fragmentos obtenidos tras la PCR con los iniciadores Invasec1 e Invasec2. **M:** marcador de peso molecular; **1:** *Salmonella* Montevideo nº328; **2:** *Salmonella* Arizonae nº83; **3:** *Salmonella* Glostrup nº237; **4:** *Salmonella* Give nº379; **5:** *Salmonella* Schwarzengrund nº121; **6:** Control positivo, *Salmonella* Cubana nº238; **NTC:** Control negativo sin ADN.

En todas las muestras la banda detectada fue del peso molecular esperado para ese fragmento del gen *invA* (banda de aproximadamente 300 pb). Esos fragmentos se enviaron a secuenciar junto con el fragmento de la calle 6, *Salmonella* Cubana nº238, cepa que aunque dio un resultado positivo en el test de inclusividad, se utilizó como control positivo para comparar su secuencia con las del resto de cepas.

Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa ClustalW. En la Figura 34 se muestra el resultado de la alineación de las secuencias para su comparación.



**Figura 34.** Alineación de las secuencias mediante el programa ClustalW. **En gris:** zona de hibridación de la sonda. **Sec1:** secuencia de *Salmonella* Arizonae nº83; **Sec2:** secuencia de *Salmonella* Give nº379; **Sec3:** secuencia de *Salmonella* Schwarzengrund nº121; **Sec4:** secuencia de *Salmonella* Glostrup nº237; **Sec5:** secuencia de *Salmonella* Montevideo; **Sec6:** secuencia de *Salmonella* Cubana nº238, utilizada como control positivo.

Se pudo observar que en la zona de hibridación de la sonda no había variación de la secuencia nucleotídica. Por lo tanto, se consideró que la sonda no debería tener ninguna dificultad en hibridar con esa zona y que esta no sería la causa de la ausencia de detección en la PCR a tiempo real. Además, tres de esas cepas dieron un resultado positivo en la PCR con la *master mix* de Takara pero no con la *master mix* de Applied Biosystems, por lo que se podía preveer que, al menos en esas cepas, la causa del resultado negativo en la PCR no debía ser la ausencia de hibridación de la sonda.

Por otro lado, se observaron ligeras variaciones en las secuencias reconocidas por los iniciadores. Las variaciones nucleotídicas para el iniciador *reverse* se producen en el centro de la secuencia por lo que esa no debería de ser la causa de la falta de amplificación en la PCR a tiempo real. En la zona de unión del iniciador *forward* hay una variación en el tercer nucleótido del extremo 3' que sí podría inducir una falta de hibridación del iniciador.

Para comprobar que la ausencia de amplificación podría deberse a ese cambio en la secuencia del iniciador *forward*, se realizó una PCR a tiempo real con esas cepas tanto con la *master mix* de Applied Biosystems como con la de Takara. La PCR se realizó disminuyendo la temperatura de anillamiento en 4°C, de 60°C a 56°C, para facilitar la unión del iniciador.

Tras esa variación en la temperatura de la PCR, se observó que todas las cepas dieron positivo para la detección de *Salmonella* mediante la sonda Invavitwo con ambas *master mix*.

## 5.2. Test de Exclusividad

En la Tabla 37 se muestran los resultados obtenidos en el test de exclusividad para los tres métodos alternativos. Las cepas analizadas están ordenadas según el número de referencia de la CECT.

Resultados

Nº CECT	Especie	Result. Sonda Master Applied	Result. Sonda Master Takara	Resultado SYBR Green I
110	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
148	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
157	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-
158	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-
166	<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	-	-
232	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
239	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
240	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
356	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
401	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
410	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-
411	<i>Enterococcus durans</i>	-	-	-
583	<i>Shigella boydii</i>	-	-	-
679	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
684	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-
846	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
858	<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	-	-
910	<i>Listeria innocua</i>	-	-	-
935	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
4031	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
4039	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
4102	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-
4168	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
4315	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-
4502	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
4783	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
4887	<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-
4932	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-
5725	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-

Tabla 37. Resultados del test de exclusividad.

Todas las cepas analizadas mostraron un resultado negativo para la detección de *Salmonella*, por lo tanto, se obtuvo una exclusividad del 100% para todos los métodos alternativos.

---

### **5.3. Estudio de la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de los métodos alternativos**

#### **5.3.1. Análisis inicial de los alimentos**

Tras la adquisición de las muestras que iban a ser utilizadas en el ensayo de validación, las muestras fueron procesadas mediante el método de referencia para comprobar si estaban contaminadas con *Salmonella* de una forma natural o si estaban libres de contaminación. De las 309 muestras analizadas solamente se encontró una muestra con contaminación natural de *Salmonella*. Se trató de una muestra de chichiquis de cerdo (picadillo de carne de cerdo con pimentón). Los datos específicos para cada una de las muestras de alimentos se muestran en el Anexo 1.

#### **5.3.2. Contaminación artificial de las muestras**

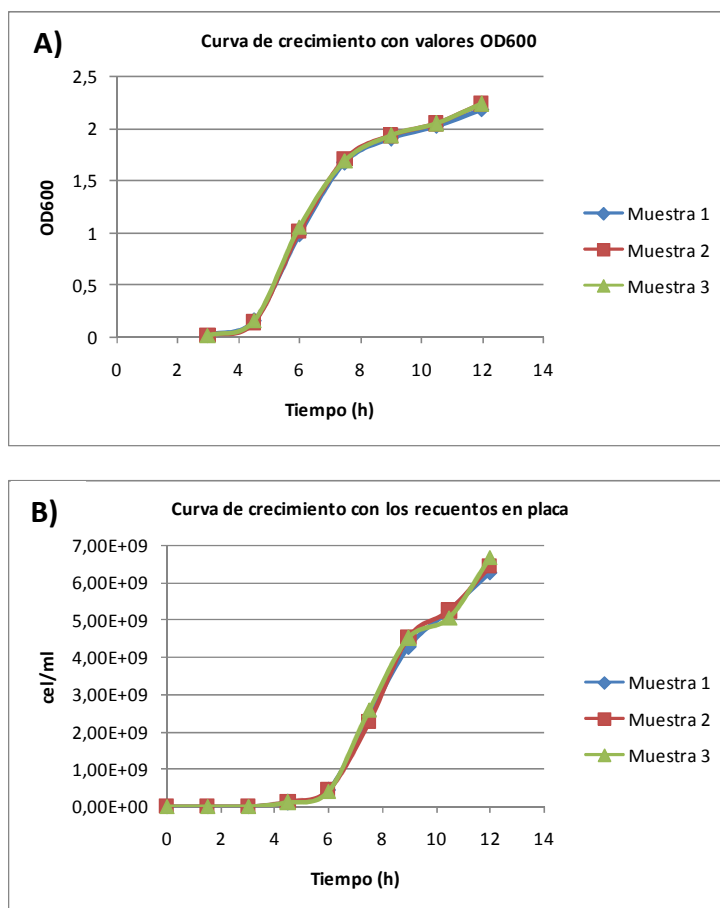
##### **5.3.2.1. Diseño de un protocolo para estresar las bacterias**

- **Tratamientos térmicos ensayados inicialmente**

Ninguno de los dos protocolos propuestos inicialmente (Tratamiento 1 y Tratamiento 2) (Apartado 3.3.3.3 de Materiales y Métodos) para estresar las bacterias resultaron satisfactorios. En algunos de los ensayos el estrés generado no fue suficiente y no se obtuvieron diferencias notables entre células estresadas y no estresadas. En otros ensayos las células no sobrevivieron y no había recuperación.

- **Realización de curvas de crecimiento de *Salmonella***

Para determinar en qué momento las bacterias se encontraban en fase exponencial, se obtuvieron las curvas de crecimiento de tres muestras diferentes de la misma cepa de *Salmonella*. Las condiciones de crecimiento fueron iguales en los tres casos. Los resultados obtenidos, tanto los valores de absorbancia a 600 nm como los recuentos de las colonias de las placas se muestran en la Figura 35.



**Figura 35.** Curvas de crecimiento obtenidas a partir de tres muestras de la misma cepa de *Salmonella*. **A)** Curvas obtenidas a partir de la medición de la absorbancia a 600 nm. **B)** Curvas obtenidas mediante los recuentos de ufc/ml a partir de la siembra en placa.

Las curvas de crecimiento de *Salmonella* mostraron que aproximadamente a las 7 horas de incubación la bacteria alcanzaba la fase exponencial de crecimiento.

---

- **Tratamientos térmicos ensayados tras la determinación de la fase exponencial**

Se propusieron tres protocolos para lesionar las bacterias a partir de las células de la fase exponencial (Tratamiento 3, 4 y 5) (Apartado 3.3.3.3 de Materiales y Métodos). Con el tratamiento 3 no se obtuvieron resultados reproducibles de un ensayo a otro. Con el tratamiento 4 los datos obtenidos fueron reproducibles pero el estrés causado a las células no fue el suficiente y no se observaron diferencias entre las células estresadas y las no estresadas. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento 5, que consistió en mantener las células bacterianas de la fase exponencial a 4°C durante 18h, seguido de 5 minutos a 50°C y un enfriamiento rápido en hielo. El método fue reproducible y el estrés causado a las células demostrable. Este fue el protocolo de estrés elegido para preparar los inóculos para la contaminación artificial de los alimentos.

#### **5.3.2.2. Niveles de inóculo de los alimentos contaminados artificialmente**

Los productos alimentarios se contaminaron con niveles de células estresadas que variaron entre 1 y 59 células en 25 gr. El nivel de inoculación para cada uno de los alimentos se muestra más detalladamente en el Anexo 1.

#### **5.3.2.3. Porcentaje de muestras positivas y negativas**

Los alimentos se inocularon para que hubiera alrededor de un 50% de muestras positivas y un 50% de muestras negativas para *Salmonella*.

El protocolo de contaminación artificial se aplicó a 158 muestras de las 309 muestras de alimentos totales. De estas 158 muestras, 155 fueron contaminadas con *Salmonella* ya que dieron un resultado positivo demostrado en la detección. Las 3 restantes se consideraron muestras negativas ya que no se contaminaron. Únicamente una muestra de las 309 utilizadas estaba contaminada naturalmente. Las otras 149 muestras no fueron contaminadas y se utilizaron como controles negativos.



### 5.3.3. Análisis de los resultados obtenidos con los diferentes métodos

Los análisis de detección de *Salmonella* se realizaron para cada muestra tanto por el método de referencia como por los alternativos (PCR con sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Takara, PCR con sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Applied Biosystems y PCR utilizando SYBR Green I). Los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas con cada uno de los métodos ensayados se muestran detalladamente en el Anexo 1.

No todas las muestras positivas fueron detectadas por todos los métodos: de las 155 muestras positivas solo 87 (un poco más de la mitad) se detectaron por todos los métodos. El resto fueron detectadas por un solo método o por más de uno, pero no todos los métodos fueron capaces de detectarlas. Los datos de la capacidad de detección de muestras positivas de cada método se muestra en la Tabla 38.

	Muestras detectadas/N+	Sensibilidad
Método de Referencia	149/155	96,1%
PCR sonda con <i>master mix</i> de Takara	131/155	84,5%
PCR sonda con <i>master mix</i> de Applied Biosystems	93/155	60%
PCR SYBR Green I	126/155	81,3%

**Tabla 38.** Resultados obtenidos por todos los métodos para la detección de muestras de alimentos contaminados con *Salmonella*. **Muestras detectadas:** número de muestras positivas detectadas por el método. **N+:** número total de muestras positivas.

La única muestra con contaminación natural del estudio detectada mediante el método de referencia durante el proceso de selección de los alimentos, mostró un resultado negativo en los estudios de validación posteriores, incluso por el método de referencia.

Todas las muestras negativas fueron detectadas como tal, a excepción de 6 muestras de helado y 8 muestras de queso que dieron un resultado falso positivo

al analizarlas con la sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Takara. En el resto de métodos no se observó ningún falso positivo.

Durante el análisis algunas de las muestras mostraron inhibición en las reacciones de PCR. Para eliminar la inhibición se realizaron diluciones 1/10 y 1/100 de las extracciones de ADN de esas muestras y se repitió la PCR utilizando las diluciones del ADN. En todos los casos se consiguió eliminar la inhibición y obtener resultados de detección positivos o negativos.

Los resultados obtenidos en cada método alternativo se enfrentaron con los resultados obtenidos mediante el método de referencia para calcular la concordancia positiva y negativa y la desviación positiva y negativa. La tabla de contingencia utilizada para calcular esos valores se cita en el apartado 3.3.3.5 de Materiales y Métodos. Los resultados globales de cada uno de los métodos alternativos y los obtenidos para cada categoría de alimento se muestran a continuación en las Tablas 39, 40 y 41.

PCR a tiempo real con sonda utilizando la <i>master mix</i> de Takara			
		R+	R-
Productos cárnicos	A+	PA=20	PD=0
	A-	ND=9	NA=31
Productos lácteos	A+	PA=30	PD=14
	A-	ND=1	NA=17
Pescados y mariscos	A+	PA=30	PD=0
	A-	ND=0	NA=28
Piensos	A+	PA=25	PD=0
	A-	ND=5	NA=30
Productos varios	A+	PA=25	PD=1
	A-	ND=4	NA=39
Resultado Global	A+	PA=130	PD=15
	A-	ND=19	NA=145

**Tabla 39.** Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Takara enfrentados con los resultados del método de referencia. **R+**: resultados positivos con el método de referencia; **R-**: resultados negativos con el método de referencia; **A+**: resultados positivos con el método alternativo; **A-**: resultados negativos con el método alternativo; **PA**: concordancia positiva; **PD**: desviación positiva; **ND**: desviación negativa; **NA**: concordancia negativa.

PCR a tiempo real con sonda utilizando la <i>master mix</i> de Applied Biosystems			
		R+	R-
Productos cárnicos	A+	PA=17	PD=0
	A-	ND=12	NA=31
Productos lácteos	A+	PA=25	PD=0
	A-	ND=6	NA=31
Pescados y mariscos	A+	PA=19	PD=0
	A-	ND=11	NA=28
Piensos	A+	PA=17	PD=0
	A-	ND=13	NA=30
Productos varios	A+	PA=15	PD=0
	A-	ND=14	NA=40
Resultado Global	A+	PA=93	PD=0
	A-	ND=56	NA=160

**Tabla 40.** Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real con sonda Invaitwo utilizando la *master mix* de Applied Biosystems enfrentados con los resultados del método de referencia. **R+**: resultados positivos con el método de referencia; **R-**: resultados negativos con el método de referencia; **A+**: resultados positivos con el método alternativo; **A-**: resultados negativos con el método alternativo; **PA**: concordancia positiva; **PD**: desviación positiva; **ND**: desviación negativa; **NA**: concordancia negativa.

PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I			
		R+	R-
Productos cárnicos	A+	PA=16	PD=0
	A-	ND=13	NA=31
Productos lácteos	A+	PA=25	PD=0
	A-	ND=6	NA=31
Pescados y mariscos	A+	PA=26	PD=0
	A-	ND=4	NA=28
Piensos	A+	PA=29	PD=0
	A-	ND=1	NA=30
Productos varios	A+	PA=24	PD=6
	A-	ND=5	NA=34
Resultado Global	A+	PA=120	PD=6
	A-	ND=29	NA=154

**Tabla 41.** Resultados obtenidos en la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I enfrentados con los resultados del método de referencia. **R+**: resultados positivos con el método de referencia; **R-**: resultados negativos con el método de referencia; **A+**: resultados positivos con el método alternativo; **A-**: resultados negativos con el método alternativo; **PA**: concordancia positiva; **PD**: desviación positiva; **ND**: desviación negativa; **NA**: concordancia negativa.

Con los datos obtenidos se calcularon la eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa de cada método alternativo para cada categoría de alimento. Los estadísticos utilizados se citan en el apartado 3.3.3.5 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en las Tablas 42, 43 y 44.

La eficacia relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara fue de un 89%, la sensibilidad relativa del 87,2% y la especificidad relativa del 90,6%. El mejor resultado se obtuvo para los pescados y mariscos. Tanto la eficacia, la especificidad así como la sensibilidad relativas fueron del 100% en estos alimentos. Por lo tanto, este método fue capaz de diferenciar todas las muestras positivas y negativas en pescados. Los porcentajes más bajos se obtuvieron en los productos lácteos debido a las 14 muestras que dieron un resultado falso positivo.

En la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems la eficacia relativa fue del 81,9%, la sensibilidad relativa del 62,4% y la especificidad relativa del 100%. La categoría de alimento que mostró una eficacia mejor fue la de productos lácteos, con una eficacia relativa del 90,3%. No se pudo identificar ninguna categoría de alimento en la que funcionase mejor este método porque los datos para todas las categorías fueron similares.

La eficacia relativa de la PCR a tiempo real con SYBR Green I fue del 88,6%, la sensibilidad relativa del 80,5% y la especificidad relativa del 96,2%. Los datos que se obtuvieron para cada categoría de alimento fueron bastante similares. La eficacia relativa y la sensibilidad relativa disminuyeron ligeramente en los productos cárnicos en comparación con el resto de datos. La especificidad de este método fue del 100% en todas las categorías excepto para la categoría de productos varios. Esto se debió a que hubo productos positivos en *Salmonella* que se detectaron con este método alternativo pero no con el método de referencia.

PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara

Categoría	PA	NA	ND	PD	Total N	Eficacia relativa AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N, PA+ND	Sensibilidad relativa SE (%) (100xPA)/N <sub>+</sub>	N, NA+PD	Especificidad relativa SP (%) (100xNA)/N
Productos cárnicos	20	31	9	0	60	85	29	69	31	100
Productos lácteos	30	17	1	14	62	75,8	31	96,7	31	54,8
Pescados y mariscos	30	28	0	0	58	100	30	100	28	100
Plenos	25	30	5	0	60	91,6	30	83,3	30	100
Productos varios	25	39	4	1	69	92,7	29	86,2	40	97,5
TOTAL	130	145	19	15	309	89	149	87,2	160	90,6

**Tabla 42.** Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara. **PA:** concordancia positiva; **NA:** concordancia negativa; **ND:** desviación negativa; **PD:** desviación positiva; **AC:** eficacia relativa; **SE:** sensibilidad relativa; **SP:** especificidad relativa.

PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems

Categoría	PA	NA	ND	PD	Total N	Eficacia relativa AC (%) [100x(PA+NA)]/N	N, PA+ND	Sensibilidad relativa SE (%) (100xPA)/N <sub>+</sub>	N, NA+PD	Especificidad relativa SP (%) (100xNA)/N
Productos cárnicos	17	31	12	0	60	80	29	58,6	31	100
Productos lácteos	25	31	6	0	62	90,3	31	80,6	31	100
Pescados y mariscos	19	28	11	0	58	81	30	63,3	28	100
Plenos	17	30	13	0	60	78,3	30	56,6	30	100
Productos varios	15	40	14	0	69	79,7	29	51,7	40	100
TOTAL	93	160	56	0	309	81,9	149	62,4	160	100

**Tabla 43.** Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems. **PA:** concordancia positiva; **NA:** concordancia negativa; **ND:** desviación negativa; **PD:** desviación positiva; **AC:** eficacia relativa; **SE:** sensibilidad relativa; **SP:** especificidad relativa.

**PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I**

Categoría	PA	NA	ND	PD	Total N	Eficacia relativa AC (%) [100X(PA+NA)]/N	N <sub>+</sub> PA+ND	Sensibilidad relativa SE (%) (100XPA)/N <sub>+</sub>	N <sub>-</sub> NA+PD	Especificidad relativa SP (%) (100XNA)/N <sub>-</sub>
Productos cárnicos	16	31	13	0	60	78,3	29	55,2	31	100
Productos lácteos	25	31	6	0	62	90,3	31	80,6	31	100
Pescados y mariscos	26	28	4	0	58	93,1	30	86,6	28	100
Plensos	29	30	1	0	60	98,3	30	96,6	30	100
Productos varios	24	34	5	6	69	84,1	29	82,5	40	85
<b>TOTAL</b>	<b>120</b>	<b>154</b>	<b>29</b>	<b>6</b>	<b>309</b>	<b>88,6</b>	<b>149</b>	<b>80,5</b>	<b>160</b>	<b>96,2</b>

**Tabla 44.** Cálculo de la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa de la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I. **PA:** concordancia positiva; **NA:** concordancia negativa; **ND:** desviación negativa; **PD:** desviación positiva; **AC:** eficacia relativa; **SE:** sensibilidad relativa; **SP:** especificidad relativa.

A continuación (Tabla 45) se muestran los valores globales de eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa para cada uno de los métodos alternativos:

	Sonda <i>master mix</i> Takara	Sonda <i>master mix</i> Applied	SYBR Green I
Eficacia relativa	89%	81,9%	88,6%
Sensibilidad relativa	87,2%	62,4%	80,5%
Especificidad relativa	90,6%	100%	96,2%

**Tabla 45.** Valores globales de la eficacia, sensibilidad y especificidad relativas de cada uno de los métodos alternativos.

La sensibilidad se recalculó según lo indicado en la norma ISO 16140:2003 (Apartado 3.3.3.5 de Materiales y Métodos), tanto para los métodos alternativos como para el método de referencia (Tabla 46), teniendo en cuenta todos los resultados positivos confirmados como tal, es decir, incluyendo los resultados positivos adicionales obtenidos con el método alternativo y no con el de referencia.

	Sonda con <i>master mix</i> Takara	Método de referencia
Sensibilidad	88,4%	90,8%

	Sonda con <i>master mix</i> Applied	Método de referencia
Sensibilidad	62,4%	100%

	SYBR Green I	Método de referencia
Sensibilidad	81,3%	96,1%

**Tabla 46.** Cálculo de la sensibilidad teniendo en cuenta también los resultados positivos adicionales obtenidos con el método alternativo y no con el de referencia.

#### 5.4. Nivel de detección relativa

Los resultados obtenidos para cada alimento en los diferentes niveles de contaminación y réplicas se detallan en el Anexo 2.

Se calculó el nivel de detección relativa para cada combinación “alimento/cepa” y para cada método utilizando el procedimiento  $LOD_{50}$  (50% *endpoint Limit of Detection*) mediante el método *Spearman-Kärber* con un intervalo de confianza del 95% (U.S. Food and Drug Administration, 2006). Los resultados se muestran en la Tabla 47.

Matriz	Cepa	Nivel de detección relativo (ufc/25 gr)			
		Método de referencia	Sonda <i>master mix</i> Takara	Sonda <i>master mix</i> Applied	SYBR Green I
Huevo	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,112 [0,034-0,365]	0,228 [0,058-0,897]	0,483 [0,117-1,989]	0,178 [0,05-0,636]
Helado	<i>Salmonella</i> Cubana	0,208 [0,044-0,986]	0,208 [0,044-0,986]	2,236	0,266 [0,054-1,326]
Pienso de mascotas	<i>Salmonella</i> Enteritidis	0,178 [0,05-0,636]	0,707	0,707	0,446 [0,174-1,147]
Pescado	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ausencia de crecimiento	161,548 [83,416-312,863]	110,054 [38,951-310,947]	0,858 [0-157-4,697]
Salchichas pollo	<i>Salmonella</i> Typhimurium	3,55 [0,68-18,531]	2,715 [0,374-19,72]	1,26 [0,191-8,327]	10,004 [3,541-28,266]

**Tabla 47.** Niveles de detección relativa para cada método en cada matriz alimentaria.

El menor nivel de detección correspondió al método de referencia en las muestras de huevo, con un valor de 0,112 ufc/25gr. El nivel más alto fue de 161,5 ufc/25gr que se correspondió con la detección en pescado con la sonda utilizando la *master mix* de Takara. Los niveles de detección en cada matriz fueron bastante parecidos entre los diferentes métodos, salvo en la detección en pescado mediante SYBR Green I, donde se obtuvo un valor de 0,858 ufc/25gr mientras que con los demás métodos el nivel de detección fue de más de 100 ufc/25gr. No se consiguió determinar el nivel de detección del método de referencia para el pescado porque los resultados fueron negativos en todas las ocasiones.



## 6. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS DISEÑADOS CON DOS KITS COMERCIALES

Los resultados obtenidos con cada uno de los métodos para cada uno de los tipos de alimento ensayados se muestran a continuación en la Tabla 48.

Tipo de muestra	Muestras	Detección					Método Referencia
		Sonda Takara	Sonda Applied	Salmofast Microbial	iQ-Check BioRad	SYBR Green I	
Pollo	6 contaminadas	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	6/6
	4 no contaminadas	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Helados	6 contaminadas	6/6	5/6	5/6	6/6	6/6	6/6
	4 no contaminadas	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Pescado	6 contaminadas	3/6	1/6	3/6	6/6	3/6	6/6
	4 no contaminadas	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Pienso vacuno	8 contaminadas	8/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	2 no contaminadas	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Bollos	8 contaminadas	0/8	0/8	0/8	8/8	0/8	2/8
	2 no contaminadas	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Huevo	6 contaminadas	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	4 no contaminadas	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Salchichas de pollo	6 contaminadas	6/6	6/6	2/6	5/6	6/6	6/6
	4 no contaminadas	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

**Tabla 48.** Resultados obtenidos en la comparación entre el método de referencia, los métodos alternativos propuestos en este trabajo y los dos kits comerciales.

Ninguno de los métodos probados mostró resultados falsos positivos.

En las muestras de pollo el único método capaz de detectar todas las muestras contaminadas con *Salmonella* fue el método de referencia. Ninguno de los demás detectó esas muestras, salvo el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que detectó dos de ellas.

En las muestras de helado el resultado obtenido con los diferentes métodos fue muy similar, a excepción de una muestra de helado que no se detectó ni con la sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems ni con el kit Salmofast® COMPLET (Microbial, Girona, España).

En el pescado los únicos métodos capaces de detectar *Salmonella* en todas las muestras contaminadas fueron el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit y el método de referencia. La sonda utilizando la *master mix* de Takara, el kit Salmofast® COMPLET y el SYBR Green I mostraron un porcentaje de detección similar, detectando solo 3 de las 6 muestras contaminadas. Con la sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems solamente se detectó una de las muestras.

En las muestras contaminadas de pienso se detectó *Salmonella* con todos los métodos salvo con la sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems, que no detectó ninguna de las muestras contaminadas.

En las muestras de bollos el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit ofreció mejores resultados que el resto de métodos, incluido el método de referencia. Con este último solamente se detectó *Salmonella* en 2 muestras, mientras que con el método comercial todas las muestras contaminadas fueron detectadas. Con el resto de métodos no se detectó ninguna de las muestras contaminadas con *Salmonella*.

Todos los métodos probados fueron capaces de detectar la totalidad de las muestras contaminadas de huevo.

Los métodos diseñados en este trabajo de investigación junto con el método de referencia fueron los métodos que detectaron *Salmonella* en todas las muestras contaminadas de salchichas. El iQ-Check™ *Salmonella* II Kit detectó 5 de las 6 muestras contaminadas, pero el kit Salmofast® COMPLET solo fue capaz de detectar 2 de esas muestras.



# DISCUSIÓN

---



*Salmonella* es una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas 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  $10^6$  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 (D'Aoust JY, 1997). En los alimentos la presencia de *Salmonella*, en la cantidad que sea, se considera siempre un peligro grave para la salud.

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. El método tradicional de detección de *Salmonella* incluye un primer paso de preenriquecimiento que permite reavivar las células que están dañadas o en estado subletal y así favorecer el inicio del crecimiento bacteriano. A continuación, una segunda fase de enriquecimiento selectivo favorece el crecimiento de la bacteria diana y reduce el crecimiento de la flora competidora. A partir del cultivo enriquecido se realiza un aislamiento en medios sólidos selectivos, a partir de los cuales se aíslan las presuntas colonias de *Salmonella*. La confirmación de las colonias sospechosas se realiza mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Este procedimiento puede durar entre 5 y 7 días, por lo tanto, es necesaria casi una semana entera para obtener resultados.

Las técnicas moleculares permiten obtener los resultados en menos tiempo y con una alta sensibilidad. Las técnicas basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos, como es la PCR o amplificación en cadena de la polimerasa, proporcionan una estrategia rápida y sensible para la detección de patógenos. Para el correcto control y regulación de los alimentos se requieren métodos sensibles y específicos para la detección de bacterias patógenas. Por lo tanto, el control de la infección dependerá de la capacidad de los métodos y de su precisión para monitorizar la producción animal primaria, las fábricas de producción alimentarias y los productos finales.

Teniendo en cuenta lo anteriormente señalado, uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral fue desarrollar un sistema rápido de detección de *Salmonella* basado en la reacción de PCR. Para ello, en primer lugar se debe seleccionar la diana genética más adecuada para la bacteria que se quiere detectar. En el caso de *Salmonella* han sido muchas las dianas genéticas descritas en la bibliografía que se han utilizado para la detección de esta bacteria a lo largo de los años. Uno de los primeros genes utilizados fue el origen de replicación del cromosoma (*oriC*), utilizado por Widjoatmodjo MN y colaboradores (Widjoatmodjo MN *et al.*, 1991; Widjoatmodjo MN *et al.*, 1992). Desde entonces se han utilizado genes muy diversos para detectar *Salmonella* (Amini K *et al.*, 2010), desde genes de virulencia como son los genes *invA* (Rahn K *et al.*, 1992; Malorny *et al.*, 2003c; entre muchos otros), *iroB* (Bäumler AJ *et al.*, 1997), *invE* (Feder I *et al.*, 2001), y *slyA* (Del Cerro A *et al.*, 2003); hasta genes de las fimbrias como *fimA* (Cohen HJ *et al.*, 1996), *fimY* (Yeh KS *et al.*, 2002) o *sefA* (Pan TM y Liu YJ, 2002). Otros autores han preferido utilizar genes esenciales en el ciclo vital de *Salmonella* como por ejemplo el gen *ttr* (Malorny B *et al.*, 2004) que participa en la respiración del tetratoato, o el gen *ompC* (Kwang J *et al.*, 1996) que codifica una proteína de la membrana externa muy importante en el ciclo vital de la bacteria. El gen 16S rRNA también ha sido utilizado en la detección de *Salmonella* (Trkov M y Avgustin G, 2003).

Entre todos los genes descritos en la bibliografía, en este estudio se eligieron 4 como posibles candidatos para ser utilizados en el desarrollo de un método para detectar *Salmonella* basado en PCR. Los genes elegidos fueron *ompC*, *dnaK*, *invA* y el 16S rRNA. No se diseñaron iniciadores específicos para amplificar un fragmento de cada gen, si no que se utilizaron los descritos previamente para cada uno de ellos. En el caso del gen *ompC* se utilizó la pareja de iniciadores S18 y S19 (Kwang J *et al.*, 1996); para amplificar el fragmento del gen *dnaK* se utilizaron los iniciadores SDnaK1 y SDnaK2 (Simpkins SA *et al.*, 2000); para el *invA* se utilizaron los iniciadores 139 y 141 (Rahn K *et al.*, 1992); y para amplificar el 16S rRNA se utilizó la pareja de iniciadores MINf y MINr (Trkov M y Avgustin G, 2003).

Tras realizar diferentes reacciones de amplificación para cada uno de los genes, se eligió el gen *invA* como el más adecuado para nuestro propósito, ya que

al amplificar el resto de los genes, en algunos casos aparecieron bandas en la cepa utilizada como control negativo (*Escherichia coli*), o aparecieron bandas inespecíficas en las cepas de *Salmonella* (además de la banda del fragmento que se debía amplificar).

La decisión de elegir el gen *invA* como diana genética de *Salmonella* venía reforzada por la elección del mismo gen por el Grupo Europeo para la Estandarización de la PCR en el diagnóstico de patógenos alimentarios (Food-PCR) para el diagnóstico de *Salmonella* en alimentos mediante PCR (Malorny B *et al.*, 2003b).

Aun habiendo un grupo que apoyaba esa elección y diferentes autores que la defendían, también hay estudios que demuestran que esta secuencia puede estar ausente en algunos aislamientos de *Salmonella*. Ya en el estudio realizado por Rahn K y colaboradores (1992) cuatro (dos cepas de *Salmonella* Senftenberg y dos de *Salmonella* Litchfield) de las 630 cepas de *Salmonella* analizadas dieron un resultado negativo para la amplificación del gen *invA*. Se observó que este tipo de cepas ambientales que no están asociadas de un modo específico con la virulencia o con enfermedades, pueden tener deleciones importantes en las regiones del cromosoma asociadas con la invasión, por lo que las islas de patogenicidad pueden ser inestables en ciertos serotipos de *Salmonella* (Ginocchio CC *et al.*, 1997) pudiendo provocar la ausencia del gen *invA*. De todas formas, aunque Rahn K y colaboradores (1992) señalaron que esos dos serotipos de *Salmonella* no podían ser detectados con los iniciadores 139/141, en el estudio de Malorny B y colaboradores (2003b) esos serotipos pudieron ser detectados con los mismos iniciadores tras modificar las condiciones de amplificación y realizando una *hot start* PCR (Chou Q *et al.*, 1992; Paul N *et al.*, 2010). Por eso, muchos investigadores siguen pensando que el gen *invA*, al tener secuencias únicas del género *Salmonella*, sigue siendo una diana genética adecuada para la detección de *Salmonella*, y que tiene un alto potencial en aplicaciones diagnósticas (Jamshidi A *et al.*, 2009). Además, existen estudios en los que el gen *invA* se detecta en todos los aislamientos de *Salmonella*, apoyando de este modo su uso (Chiu CH y Ou JT, 1996; Ziemer CJ y Steadham SR, 2003; Trafny EA *et al.*, 2006; Amini K *et al.*, 2010).



En este trabajo, para estudiar la especificidad de la PCR se utilizaron un total de 50 cepas. Los 40 aislamientos pertenecientes al género *Salmonella* mostraron un resultado positivo para la amplificación del gen *invA*, mientras que las otras 10 cepas de microorganismos relacionados con *Salmonella* mostraron un resultado negativo. Las condiciones de amplificación utilizadas también fueron modificadas con respecto a las originales descritas por Rahn K y colaboradores (1992) e incluso fueron diferentes a las descritas posteriormente por Malorny B y colaboradores (2003b). Los resultados óptimos se obtuvieron con un programa de amplificación de 30 ciclos en vez de 35 y aumentando la temperatura de anillamiento a 66°C.

A esta PCR para la detección específica de *Salmonella* se le añadió un control interno de amplificación diseñado en este trabajo de investigación. Un control interno de amplificación es un fragmento de ADN no diana que se añade en el mismo tubo de reacción y que coamplifica a la vez que la secuencia diana. En una PCR sin control interno un resultado negativo (ausencia de banda o de señal) puede ser un verdadero negativo, porque realmente no hay secuencia diana en la reacción, pero también puede ser un falso negativo porque la reacción haya sido inhibida. Sin embargo, en una PCR con control interno la detección de ese control, aún en ausencia de señal de la secuencia específica, indica que la reacción se ha realizado correctamente y que el resultado negativo es verdadero. 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" (Anonymous, 2005). En la norma se han dejado abiertos el tipo de control interno que tiene que utilizarse y la manera de diseñarlo.

Existen diversos tipos de controles internos y diferentes maneras de construirlos, tal y como se ha comentado en la Introducción. Entre todos ellos en este trabajo se eligió la estrategia descrita por Hoorfar J y colaboradores (2000)

por ser un método sencillo y eficaz, que no contiene etapas caras y complejas como ocurre en otros métodos. Ya que la inclusión de un CI es necesaria, esta técnica puede ser muy útil en todo tipo de laboratorios microbiológicos, sobre todo en aquellos en los que se hacen análisis de rutina, porque no se necesita equipamiento caro o personal con conocimientos especiales. Además de por la sencillez de la metodología, también se decidió sintetizar esta clase de control interno por ser un CI de tipo competitivo, y por lo tanto, el CI se amplifica con los mismos iniciadores que la secuencia diana. Diseñar un CI no competitivo significa que hay que añadir otra pareja de iniciadores a la reacción, lo que aumenta la posibilidad de formación de dímeros, y la necesidad de optimizar la PCR para que se produzcan dos reacciones de amplificación de diferentes características. Aun así, el uso de controles internos competitivos también conlleva riesgos causados por la competición que se crea entre el CI y la secuencia diana por los mismos iniciadores, ya que la amplificación del CI podría verse más favorecida que la de la secuencia diana.

Un factor importante a la hora de utilizar este tipo de controles internos es su concentración. Se debe utilizar la menor cantidad detectable posible de CI (Hoorfar J *et al.*, 2004). Por eso mismo, una vez sintetizado y purificado nuestro CI, se determinó su límite de detección para poder establecer la cantidad que debía añadirse en la PCR. Si se añade mucha cantidad de ADN del CI, éste compite en mayor medida con la secuencia diana por los iniciadores y puede llegar a suprimir la amplificación de la secuencia diana generando un falso negativo, también puede que no se lleguen a detectar inhibiciones débiles que dan resultados falsos negativos si la secuencia diana está presente en una concentración muy baja.

Otro factor que hay que tener en cuenta es el tamaño del CI. En este trabajo se decidió diseñar un CI de tamaño superior al de la secuencia diana, tal y como recomiendan Hoorfar J y colaboradores (2004). Al utilizar fragmentos de diferentes tamaños, en teoría, se favorece la reacción hacia el fragmento más pequeño. Por lo tanto, al utilizar un CI mayor que el fragmento generado por la amplificación del gen *invA* de *Salmonella*, favoreceríamos la amplificación de la secuencia diana y no del CI. Al compartir los dos fragmentos los mismos iniciadores y estar favorecida la amplificación de la secuencia diana, puede ser que en algunas ocasiones el fragmento del CI no sea detectable. Este hecho no es

relevante en presencia del fragmento diana ya que se hace evidente que la PCR no se ha inhibido.

Se calculó también el límite de detección de la PCR convencional diseñada para amplificar el gen *invA*, obteniéndose un valor de 200 pg de ADN por reacción de PCR. En el primer estudio realizado por Rahn K y colaboradores (1992) el límite de detección era de 27 pg, que es un resultado mejor que el obtenido en nuestro estudio. Esto puede deberse a la adición de un CI en nuestra PCR que influye directamente en el límite de detección del gen diana. El número de copias de CI que se añaden a la reacción de amplificación tiene mucha influencia en ese límite (Malorny B *et al.*, 2003b). En comparación con estudios de PCR realizados en otros genes de *Salmonella* el límite de detección obtenido en este estudio sigue siendo ligeramente peor. En la detección del gen *hilA* (Pathmanathan SG *et al.*, 2003) se obtuvo un valor de 100 pg que se acerca bastante a nuestro valor, pero sin embargo en la amplificación del gen *ompC* (Kwang J *et al.*, 1996) y del *fimA* (Cohen HJ *et al.*, 1996) se obtienen valores de 1 pg y 5 pg respectivamente. Parece ser que otros autores describen métodos que son *a priori* más sensibles que el descrito en este trabajo.

Con la intención de ofrecer mayor rapidez en la obtención de los resultados y con vistas a una posible utilización del método para detección de *Salmonella* en alimentos, se pensó que esta PCR debía adaptarse y convertirse en una PCR a tiempo real. Las ventajas que tiene la PCR a tiempo real sobre la PCR convencional son abundantes y por eso, a lo largo de estos últimos años, los métodos basados en PCR a tiempo real para detectar *Salmonella* y otros microorganismos, ya sea en alimentos o en otro tipo de muestras, han ido aumentando de manera incesable. Una de las principales ventajas de la PCR a tiempo real es que no se requiere ningún tipo de manipulación de las muestras para observar los resultados tras el proceso de amplificación, hecho que disminuye notablemente el riesgo de contaminación de la muestra. En la PCR convencional se debe realizar un análisis post-PCR mediante electroforesis para confirmar la presencia de la diana, mientras que en la PCR a tiempo real el resultado de la amplificación se obtiene mediante un incremento de la fluorescencia que indica la presencia de la diana y es monitorizado a lo largo de todo el proceso de PCR (Hein I *et al.*, 2006). Si a la baja probabilidad de contaminación le sumamos que los resultados se obtienen

antes que en una PCR convencional, que la sensibilidad y la especificidad que se logran con la PCR a tiempo real son realmente buenas, y que además es una técnica muy sencilla de realizar, la PCR a tiempo real se convierte en una buena alternativa a otros métodos utilizados en microbiología (Espy MJ *et al.*, 2006).

Existen diferentes sistemas de detección en la PCR a tiempo real. En este trabajo se optó por probar las sondas TaqMan® y el SYBR Green I para evaluar su capacidad de detección, ya que son sistemas que funcionan de una manera totalmente diferente. Ambos se basan en la emisión de fluorescencia en presencia del fragmento diana, pero el funcionamiento no es el mismo. Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos que hibridan específicamente con una zona del fragmento amplificado por los iniciadores. En su extremo 5' están marcadas con un fluoróforo y en el 3' tienen un *quencher* que captura la energía del fluoróforo, inhibiendo la emisión de fluorescencia. Cuando la sonda hibrida con el fragmento específico, la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa escinde la sonda dejando libre el fluoróforo, y produciéndose de este modo emisión de fluorescencia. El SYBR Green I en cambio es una molécula fluorescente intercalante que se une a cualquier ADN de doble cadena. El que se una a cualquier tipo de ADN bicatenario que haya en la reacción puede hacer creer que este método es menos específico que las sondas, por eso, tras la reacción de amplificación se suele añadir un protocolo de disociación para aumentar la especificidad mediante el cual se generan curvas de disociación específicas de cada fragmento. En caso de haber más de un amplicón en la muestra, estos podrán ser diferenciados por sus curvas de disociación.

La PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I se diseñó a partir de la PCR convencional creada anteriormente. De este modo, los iniciadores utilizados en la PCR a tiempo real fueron los mismos que los utilizados para el fragmento del gen *invA* en la PCR convencional (iniciadores 139/141 descritos por Rahn K y colaboradores en 1992). Se diseñó un nuevo control interno de amplificación competitivo que fuese de tamaño superior al fragmento del gen *invA* siguiendo la misma metodología empleada en el diseño del CI de la PCR convencional (Hoorfar J *et al.*, 2000). Se probó la PCR a tiempo real en diferentes cepas de *Salmonella* y en otros microorganismos relacionados obteniendo un resultado de inclusividad y

exclusividad del 100%. Por lo tanto, se detectaron todas las cepas de *Salmonella* y ninguna que no fuera *Salmonella*.

El diseño de la PCR a tiempo real utilizando una sonda TaqMan® requirió el diseño de unos nuevos iniciadores y de una sonda específica que hibridase con el fragmento que estos amplificaban (iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R, y sonda Invavitone). El gen diana continuó siendo el gen *invA* de *Salmonella*. Ya que la especificidad y sensibilidad de los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos recae fundamentalmente en el diseño adecuado de los iniciadores y las sondas (Haffar M y Gilbride KA, 2010), se quiso diseñar una pareja de iniciadores y una sonda específicos de *Salmonella* que no dieran lugar a amplificaciones inespecíficas de otros microorganismos, sobre todo de microorganismos que pudiesen estar presentes junto a *Salmonella* en los alimentos.

La especificidad de los iniciadores y de la sonda diseñados fue comprobada tanto de forma teórica por homología *in silico* como de forma experimental. Mediante la herramienta BLAST se realizaron hibridaciones *in silico* que corroboraron la especificidad de los iniciadores y de la sonda por *Salmonella*. La especificidad también fue testada de forma experimental utilizando 48 cepas de *Salmonella* de diversos serotipos y orígenes. Se observó que los iniciadores y la sonda no eran lo suficientemente específicos ya que de las 48 cepas de *Salmonella* analizadas solo se detectaron 40.

Con la intención de aumentar la especificidad de la PCR a tiempo real, se estudió el fragmento del gen *invA* que amplificaban los iniciadores para encontrar la causa de la ausencia de amplificación en las cepas que habían mostrado un resultado negativo en la PCR. Se descubrió que era una zona con una alta variabilidad nucleotídica de la secuencia, por lo que no era una zona recomendable para el uso de sondas TaqMan®. Pero se encontró una zona próxima con una alta estabilidad en la secuencia, adecuada por tanto para diseñar unos nuevos iniciadores y una nueva sonda específicos de esa zona (iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R, y sonda Invavitwo).

Como ocurrió con la primera pareja de iniciadores y sonda, la especificidad de esta segunda pareja de iniciadores y de la nueva sonda también fue comprobada tanto de forma teórica como de forma experimental. Se realizaron

hibridaciones *in silico* mediante la herramienta BLAST que corroboraron la especificidad de los iniciadores y de la sonda por *Salmonella*. Además, se analizaron de forma experimental 47 cepas de *Salmonella* de diferentes serotipos y orígenes para confirmar esa especificidad. Todas las cepas de *Salmonella* analizadas excepto una cepa de serotipo Montevideo mostraron un resultado positivo en la amplificación. Se analizaron también varios microorganismos relacionados con *Salmonella* para los cuales los resultados de la PCR a tiempo real fueron negativos, verificando de este modo que los iniciadores y la sonda diseñados reconocen solamente el ADN de *Salmonella*. La exclusividad de este método de PCR a tiempo real fue del 100%, mientras que la inclusividad fue del 97,8%, valor un poco menor que el obtenido con la PCR utilizando SYBR Green I (100%), debido a la presencia de la citada cepa que no fue amplificada.

Para la PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo también se diseñó un control interno de amplificación. La estrategia seguida para crear el CI fue la misma que para el CI de la PCR a tiempo real con SYBR Green I (Hoorfar J *et al.*, 2000) mediante la cual se creó un CI competitivo de tamaño superior al fragmento específico de *Salmonella*.

Los iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R junto con la sonda Invavitwo específica del fragmento amplificado por esos iniciadores, así como el control interno con su sonda específica, fueron objeto de la Patente nº P200801267 (Métodos y reactivos para la detección de *Salmonella* spp.), en la cual constan como Entidades Titulares la UPV/EHU y Laboratorios Bromatológicos Araba.

Al estudiar los límites de detección de la PCR a tiempo real con SYBR Green I y la PCR a tiempo real con la sonda Invavitwo, se determinaron los siguientes límites: 10 pg de ADN por reacción de PCR con la sonda TaqMan® y 1ng con SYBR Green I. Estos datos indican que la tecnología de las sondas TaqMan® es más sensible que la tecnología SYBR Green I en este estudio. Aunque por otro lado, la incapacidad de detectar con la sonda una de las cepas de *Salmonella* analizadas, indica que esa tecnología es a su vez menos específica que la detección con SYBR Green I.

Otro de los principales objetivos de este trabajo de investigación fue probar la aplicabilidad de los métodos de PCR a tiempo real desarrollados a la detección

de *Salmonella* a partir de muestras de alimentos. 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).

Siguiendo las directrices descritas en la norma ISO 16140:2003 (Anonymous, 2003) que describe la manera de realizar la validación de métodos nuevos para detección de patógenos en alimentos, se realizó un estudio comparativo entre los distintos métodos. Se compararon 4 métodos distintos: (1) el método de referencia para detección de *Salmonella* descrito en la norma ISO 6579:2002 (Anonymous, 2002), (2) la PCR a tiempo real que utiliza SYBR Green I como sistema de detección, (3) la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), y (4) la PCR a tiempo real con sonda Invavitwo utilizando la *master mix* de Takara (Otsu, Shiga, Japan). La PCR a tiempo real con sonda se realizó con dos *master mix* comerciales diferentes con la intención de realizar un estudio sobre la posible influencia que ejerce el tipo de *master mix* utilizado en las reacciones de PCR.

En primer lugar se realizó un estudio de inclusividad y exclusividad de los métodos alternativos. Estos parámetros se calcularon mediante el análisis de 54 cepas de *Salmonella* (para el test de inclusividad) y 31 cepas de otros géneros diferentes a *Salmonella* (para el de exclusividad) a partir de cultivos puros. Mientras que la PCR a tiempo real con SYBR Green I mostró unos resultados del 100% tanto para la inclusividad como para la exclusividad, la PCR a tiempo real mediante sonda obtuvo también una exclusividad del 100% pero una inclusividad menor. Utilizando la sonda con la *master mix* de Takara la inclusividad fue del 96,3%, ya que de las 54 cepas de *Salmonella* analizadas 2 no fueron detectadas. Utilizando la sonda con la *master mix* de Applied Biosystems la inclusividad fue aun menor, de un 90,7%, ya que solo se detectaron 49 cepas. Se estudió el por qué de estos resultados realizando una secuenciación del fragmento que amplifican los iniciadores para determinar si la falta de reacción se debía a variaciones nucleotídicas de la secuencia. No se esperaban cambios en la zona de hibridación de la sonda en el caso de las cepas *Salmonella* Glostrup nº237, *Salmonella* Give nº379 y *Salmonella* Schwarzengrund nº121 ya que habían

mostrado un resultado positivo para la detección con sonda utilizando la *master mix* de Takara. Sin embargo, en las otras 2 cepas en las que el resultado en la amplificación había sido negativo con ambas *master mix*, la causa de la ausencia de reacción podía ser esa. Los resultados de la secuenciación determinaron que no había ninguna variación nucleotídica en la zona de hibridación de la sonda, por lo que la sonda diseñada era en un principio totalmente específica de *Salmonella*, pero sí que se observó un cambio en el tercer nucleótido del extremo 3' del iniciador *forward*. Se decidió repetir la PCR a tiempo real en esas cepas pero disminuyendo 4°C la temperatura de anillamiento para facilitar la unión del iniciador y el ADN bacteriano, ya que al disminuir la temperatura de anillamiento se toleran variaciones nucleotídicas en la hibridación entre las secuencias (Rybicki E, 2001). Con ese cambio en el protocolo de la PCR se quería comprobar si la causa de la falta de reacción era debida a la variación en la secuencia del iniciador. Tras el cambio en el programa de PCR, los resultados de la amplificación del gen *invA* mediante PCR a tiempo real con la sonda en ambas *master mix* fueron positivos. Por lo tanto, todas las cepas utilizadas en el test de inclusividad podían considerarse positivas.

Observando los resultados, nos sorprendió la influencia que ejercía el tipo de *master mix* utilizada en una PCR a tiempo real. El mecanismo de detección es el mismo para las reacciones de PCR que utilizan la sonda, siendo el tipo de *master mix* lo que variaba entre ambos protocolos. En un principio, cabría pensar que al ser el mecanismo de detección el mismo los resultados obtenidos deberían ser iguales. Sin embargo, la sensibilidad varía de una *master mix* a otra. En este estudio la *master mix* de Takara proporcionaba más sensibilidad que la de Applied Biosystems, y esto se observó a lo largo de todo el trabajo. 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 *master mix*, aparte de otros factores como los iniciadores, las sondas y la plataforma donde se realizan los análisis. Estos autores compararon 5 *master mix* comerciales de PCR para utilizar con sondas TaqMan® en *Bacillus anthracis*, e identificaron 3 de ellas como superiores a las otras dos. También se han evaluado *master mix* comerciales diferentes para RT-PCR a tiempo real (Stephens KW *et al.*, 2010) y al igual que en el anterior estudio, se demostró que



los reactivos de la *master mix* influyen en la sensibilidad y regularidad de los resultados obtenidos en la PCR a tiempo real. En una *application note* de Applied Biosystems sobre PCR a tiempo real (Applied Biosystems. *Real-time PCR: Understanding Ct*) se explica como la *master mix* utilizada tiene influencia en la emisión de fluorescencia, lo cual genera cambios en los valores Ct (*threshold cycle* o ciclo umbral). Esto se debe a que la emisión de fluorescencia de cualquier molécula depende de los factores ambientales en los que se encuentre, como por ejemplo el pH de la solución y la concentración de sales. Esto hace que la señal y por lo tanto el Ct, sea diferente con cada *master mix*. En el test de inclusividad realizado en este trabajo se observa que aunque las cepas *Salmonella* Glostrup nº237, *Salmonella* GIVE nº379 y *Salmonella* Schwarzengrund nº121 son positivas al utilizar la sonda con la *master mix* de Takara, tienen un valor Ct muy alto, alrededor de 32. Sabiendo que la sonda no tiene ningún impedimento para hibridar porque no existen variaciones en la secuencia, el que las cepas se detecten con una *master mix* y no con otra se puede atribuir al efecto generado por la composición de cada *master mix*. En nuestro caso no se han comparado distintas *master mix* para SYBR Green I, pero en cualquier caso también se podrían esperar cambios en los resultados obtenidos con cada una de ellas.

El siguiente paso en la validación de un método alternativo es realizar un estudio comparativo entre el método alternativo y el de referencia para calcular la eficacia relativa, la sensibilidad relativa y la especificidad relativa del método alternativo.

En este caso, el estudio comparativo se realizó en muestras de alimentos. Las muestras de alimentos utilizadas fueron adquiridas en diversos comercios y supermercados de la ciudad, salvo las muestras de leche cruda y piel de pollo que se obtuvieron de diferentes ganaderos de la zona y las muestras de pienso que fueron suministradas por una empresa productora de piensos de la zona. Se obtuvieron un total de 309 muestras que abarcaban 5 categorías de alimentos según la clasificación de tipos de alimentos incluida en la norma ISO 16140:2003. Las categorías y los productos analizados para cada una de ellas fueron: productos cárnicos (salchichas de pollo y cerdo, piel de pollo y despiece de pollo, chichiquis de cerdo y carne picada de cerdo), productos lácteos (helados, quesos y leche cruda de vaca), pescados y mariscos (pescados blancos, pescados azules y

almejas), piensos (pienso para vacuno, para mascotas y para aves) y productos varios (bollería de nata y crema, comidas precocinadas y huevos).

Tras su adquisición, estos alimentos fueron analizados mediante el método de referencia en busca de posibles contaminaciones naturales por *Salmonella*. Solamente una muestra de chichiquis (picadillo de carne de cerdo con pimentón) tuvo un resultado positivo para *Salmonella*. Las muestras contaminadas de forma natural reflejan el modo en el que las bacterias se encuentran en condiciones reales en los alimentos. Lo ideal sería utilizar este tipo de muestras en los estudios comparativos, pero la realidad es que estas muestras habitualmente no están disponibles en número suficiente. Por ello, en caso de no encontrar el suficiente número de muestras contaminadas naturalmente se utilizan muestras contaminadas artificialmente, en las cuales se intenta reproducir el estado en el que las bacterias se encuentran en los alimentos (Andrews WH, 1987). Para controlar la contaminación bacteriana en los alimentos, normalmente se realizan diferentes tratamientos a los alimentos: tratamientos térmicos, refrigeración, congelación, secado, irradiación o la adición de antimicrobianos y químicos. Como consecuencia de los tratamientos aplicados durante el procesado de los alimentos o para su conservación, los microorganismos presentes en el alimento normalmente mueren, aunque también puede que sobrevivan o que permanezcan en una fase subletal por estar dañados o estresados (Mansfield LP y Forsythe SJ, 2000; Wu VCH, 2008;). Para simular esas condiciones naturales de las bacterias en los alimentos las muestras que se contaminan de manera artificial se deben contaminar con microorganismos lesionados o dañados.

Para realizar la contaminación artificial se debe diseñar previamente un protocolo con el que se consigan células estresadas y ese estrés debe ser verificado. La verificación del estrés de las bacterias puede realizarse mediante recuento de colonias en un medio no selectivo y en un medio selectivo (Debevere J y Uyttendaele M, 2003). Los medios selectivos, si bien reducen notablemente el crecimiento de las bacterias competidoras y son muy útiles para ese fin, no son los más idóneos para la recuperación bacteriana, pues se ha demostrado que en los medios no selectivos la recuperación celular siempre es mayor (Rajkowski KT y Dudley RL, 1999; Velázquez M *et al.*, 2000; Miller FA *et al.*, 2006). Los medios no selectivos permiten el crecimiento tanto de las células no dañadas como de las

células dañadas, mientras que los medios selectivos inhiben o dificultan el crecimiento y recuperación de las células lesionadas. Por lo tanto, en los medios selectivos solamente se espera el crecimiento de las células no dañadas (Wu VCH, 2008). Teóricamente habrá un mayor número de colonias en el medio no selectivo que en el selectivo. Para poder afirmar que las células están estresadas, la diferencia del recuento de colonias entre ambos medios debe ser al menos de 0,5 log (Anonymous, 2004). En este trabajo se contaminaron artificialmente aproximadamente el 50% de las muestras de alimento con inóculos de células de *Salmonella* estresadas, ya que el número de muestras contaminadas de manera natural conseguido no fue suficiente para realizar el estudio comparativo de los métodos alternativos con el de referencia. Los niveles de inóculo variaron entre 1 y 59 células en 25 gr de alimento.

De las 309 muestras utilizadas 155 fueron contaminadas artificialmente, 153 no se contaminaron y una muestra estaba contaminada naturalmente. Cada una de estas muestras fue analizada tanto con el método de referencia como por los métodos alternativos.

La muestra de chichiquis con contaminación natural detectada en el análisis inicial de los alimentos, fue posteriormente negativa en el estudio comparativo por todos los métodos ensayados. Esto puede deberse a que durante la conservación de la muestra a -20°C hasta la utilización de la misma en el estudio comparativo las bacterias presentes en la muestra podrían haber muerto, además de que posiblemente la contaminación natural pudiera ser muy reducida.

Ninguno de los métodos detectó el 100% de las muestras contaminadas. Mediante el método de referencia se detectaron 149 de las 155 muestras contaminadas, consiguiendo una sensibilidad del 96,1%; mediante la PCR a tiempo real con la sonda utilizando la *master mix* de Takara fueron 131 las detectadas, por lo tanto la sensibilidad fue del 84,5%; mientras que con la *master mix* de Applied Biosystems solamente se detectaron 93 muestras, obteniendo una sensibilidad del 60%. Con la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I se detectaron 126 de las 155 muestras contaminadas, consiguiendo una sensibilidad del 81,3%. Estos datos globales están fuertemente influenciados por el tipo de matriz alimentaria, ya que dependiendo del alimento analizado la eficacia de los métodos varía. Todas las muestras negativas fueron detectadas como tal por

todos los métodos salvo en 6 muestras de helado y en 8 de queso que dieron un resultado positivo con la sonda utilizando la *master mix* de Takara. La aparición de resultados falsos positivos puede deberse, entre otras causas, a la interferencia con la flora presente en la muestra o a la detección de ADN de células muertas presentes en la muestra (Wolffs PF *et al.*, 2006). En este caso no se cree que haya sido alguna de estas causas ya que la extracción de ADN utilizada es la misma para todas las reacciones de PCR y por lo tanto, también se deberían de haber obtenido resultados positivos con los demás métodos de PCR a tiempo real. En cualquier caso, no se llegó a determinar la causa de este efecto.

Con los resultados obtenidos en los alimentos se calcularon la eficacia relativa, la sensibilidad relativa y la especificidad relativa para cada uno de los métodos alternativos en comparación con el método de referencia. En la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara la eficacia relativa fue del 89%, la sensibilidad relativa del 88,4% y la especificidad relativa del 90,6%. Para la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems fueron del 81,9%, 62,4% y 100%, respectivamente. Y en la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I los resultados fueron de un 88,6%, 81,3% y 96,2%, respectivamente.

El método que mejores resultados ofreció en eficacia y sensibilidad fue la PCR con sonda utilizando la *master mix* de Takara. Aunque la especificidad de este método no haya sido del 100% (debido a falsos positivos en unas muestras de productos lácteos generados por algún tipo de fallo, pero que para el resto de categorías alimentarias analizadas sí que fue del 100%), es preferible obtener resultados falsos positivos que han de verificarse con el método tradicional que obtener falsos negativos y pasar esas muestras contaminadas como negativas, principalmente por los peligros que eso supone para la salud de los consumidores. Utilizando la *master mix* de Applied Biosystems los resultados de eficacia y sensibilidad disminuyeron notablemente, volviendo esa PCR a tiempo real poco eficaz para la detección de muestras contaminadas. Los resultados obtenidos con SYBR Green I se asemejaron más a los obtenidos con la sonda y la *master mix* de Takara.

Los resultados de eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa en comparación con el método de referencia obtenidos en este trabajo se

encuentran por debajo de resultados obtenidos por otros autores. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Malorny B y colaboradores (2004) en muestras de pollo, carne picada, pescado y leche cruda obtuvieron un resultado del 100% en los tres parámetros. En McCabe EM y colaboradores (2011) los valores fueron de un 98,5%, 98,1% y 100%, respectivamente, en el análisis de muestras de ensalada, chocolate, queso, pescado y carcasas de animales. En Hein I y colaboradores (2006) también obtuvieron una concordancia con el método tradicional del 100% en muestras de carne de pollo, carne picada, salmón y leche cruda. El que los resultados de este trabajo sean inferiores a los obtenidos en otros trabajos puede ser debido a que en ninguno de los trabajos mencionados utilizan para la contaminación artificial de los alimentos cepas estresadas. El que las bacterias estén debilitadas en el momento de la inoculación de los alimentos puede hacer que la recuperación de las mismas, aun incluyendo un paso previo de preenriquecimiento antes de la extracción de ADN, sea más lenta, influyendo en la capacidad de detección de las células diana. Sin embargo, en el estudio de validación del iQ-Check™ *Salmonella* II Kit de Bio-Rad (Hercules, CA, USA) (Anonymous, 2004) sí que se utilizan células de *Salmonella* estresadas para la contaminación artificial de las muestras, y aun así obtienen mejores resultados que los nuestros (eficacia relativa del 99,3%, sensibilidad relativa del 99% y especificidad relativa del 99,6%). En el estudio de validación del iQ-Check™ *Salmonella* II Kit utilizan para la contaminación artificial de las muestras cepas sometidas a estrés tanto por frío como por calor, pero no se detalla en qué consiste cada uno de ellos. Por lo tanto, el protocolo para generar estrés realizado en esa validación y el realizado en nuestro trabajo son diferentes, y por lo tanto difícilmente comparables. En nuestro trabajo se podría haber generado una mayor lesión a las células bacterianas que influiría en los resultados de eficacia, sensibilidad y especificidad relativas, obteniendo unos valores inferiores.

Además del hecho de que la detección de células estresadas sea más complicada que la detección de células en buen estado, el principal problema con el que nos hemos encontrado a lo largo de este trabajo es la extracción de ADN. La extracción de los ácidos nucleicos a partir de muestras de alimentos es un punto crítico para la utilización de métodos moleculares. La extracción se vio muy influenciada por el tipo de alimento que se procesaba, ya que dependiendo de las

características de éste (cantidad de grasa, azúcares, presencia de sangre, naturaleza física, etc.), la eficacia de la extracción y las complicaciones surgidas durante el proceso variaron. La presencia de restos de la matriz alimentaria influyó en el proceso debido principalmente a la colmatación de las columnas utilizadas a lo largo del proceso de extracción del ADN. Este problema se pudo solventar modificando en algunos puntos el protocolo de extracción propuesto por el fabricante del kit, bien mediante el aumento del tiempo y las revoluciones durante los periodos de centrifugación, o añadiendo algún paso de centrifugación adicional para retirar las partículas sólidas presentes durante el proceso.

Aún así es difícil optimizar un protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de matrices alimentarias debido a la complejidad de las mismas, y sobre todo si el método alternativo se quiere aplicar en diferentes tipos de alimentos. Actualmente no existe ningún método universal para realizar la extracción de ADN a partir de alimentos, y por lo tanto, conseguir la máxima eficacia en la extracción para cada uno de los tipos de alimentos es de vital importancia.

Para lograr este fin la preparación de la muestra adquiere una gran importancia. 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. Estudios realizados por diferentes autores proporcionan diferentes estrategias con las que conseguir los objetivos anteriormente mencionados. Una de las estrategias más utilizadas es la separación inmunomagnética (IMS) de las células diana. En la IMS se emplean partículas paramagnéticas cubiertas de anticuerpos específicos para la bacteria diana, mediante las cuales se separa de la muestra de alimento la bacteria deseada. En la literatura hay descritos diferentes estudios en los que utilizan IMS para realizar la detección de patógenos en muestras de alimentos. La manera de usar esa técnica difiere de unos estudios a otros. Por ejemplo, mientras que en el estudio realizado por Taban BM y colaboradores (2009) después de realizar un

paso de preenriquecimiento de la muestra combinan la separación inmunomagnética de las células con la PCR, en Uyttendaele M y colaboradores (2000) realizan una detección directa utilizando ISM sin un paso previo de preenriquecimiento. En el estudio de Warren BR y colaboradores (2007), realizan un proceso intermedio entre los dos anteriores ya que emplean un paso de preenriquecimiento de menor duración (5 horas) seguido de IMS.

Otro método que se puede utilizar para aumentar la eficacia de los métodos moleculares es la filtración, mediante la cual, por filtrado de la muestra, se separan las particular no deseadas de la muestra. Wolffs PF y colaboradores (2006) utilizan un método basado en dos pasos de filtración por dos filtros de diferente tamaño de poro, uno para quitar las partículas más grandes y otro a partir del cual recuperan las células de *Salmonella*. D'Urso OF y colaboradores (2009) van más allá y además de aplicar la técnica de filtrado para recuperar las células son capaces de recuperar solo las células vivas (y no las muertas o dañadas) gracias a la adición de un tratamiento de discriminación directamente en la suspensión bacteriana antes del filtrado.

Otros autores en cambio prefieren realizar dos pasos de enriquecimiento antes de la extracción del ADN. Tanto Krascenicsová y colaboradores (2008) como McGuinness S y colaboradores (2009) realizan una incubación en agua de peptona tamponada durante aproximadamente 18 horas seguida de una segunda fase de enriquecimiento en Rappaport-Vassiliadis de 5h y 6 h respectivamente. La idea que subyace tras esos dos pasos de enriquecimiento es poder diluir la muestra aun más y de este modo también los posibles inhibidores que haya en ella.

Otra opción para disminuir los inhibidores de las muestras y separar la matriz alimentaria de las bacterias puede ser la flotación. Esta técnica es un método de preparación de la muestra basado en la centrifugación tradicional que persigue la separación de las partículas por densidad boyante (*traditional bouyant density centrifugation*). La separación de las células y partículas ocurre como consecuencia de las diferencias de densidad. Al finalizar el proceso, la bacteria diana quedará en la interfase superior separada de las sustancias inhibitorias, del ADN procedente de células muertas y de las partículas del alimento. La flotación ha sido utilizada por diferentes autores y en diferentes patógenos. Wolffs PF y

colaboradores (2004) lo presentaron como un método novedoso para la preparación de la muestra durante la detección de *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras de cerdo, y posteriormente (Wolffs PF *et al.*, 2005) lo utilizaron para detectar *Campylobacter* spp. en muestras de pollo, pudiendo separar las células vivas de las muertas. La flotación también ha sido el método elegido por Löfström C y colaboradores (2011) para cuantificar *Salmonella* en carcasas de cerdo.

En el estudio presentado en este trabajo se realizó una fase de preenriquecimiento de las muestras en agua de peptona tamponada seguida de la extracción del ADN. Con la fase de preenriquecimiento nos aseguramos que las células dañadas presentes en las muestras tengan tiempo para recuperarse. El paso de preenriquecimiento también es conveniente para detectar un bajo número de células presentes en el alimento, y de este modo, favorecer el crecimiento de la bacteria diana en presencia de otras bacterias en la muestra. Por eso, normalmente no se suele eliminar el paso de preenriquecimiento a la hora de detectar los patógenos alimentarios (Malorny B *et al.*, 2008).

Aun aplicando ese paso de preenriquecimiento de la muestra, el mayor problema que surge en los métodos de PCR es la posible detección de ADN de células muertas presentes en la muestra de alimento. El ADN es una molécula mucho más estable que el ARN capaz de persistir en un alimento durante un largo periodo de tiempo después de que el microorganismo haya muerto, lo que puede generar resultados falsos positivos. La capacidad que tiene la PCR de detectar ADN tanto de células muertas como de células viables, no permite distinguir si realmente lo que se está detectando son únicamente las células viables (Yaron S y Matthews KR, 2002; González-Escalona N *et al.*, 2009). Para solucionar ese problema se ha propuesto la utilización del ARN mensajero como indicador de viabilidad de las células. De todas formas, los métodos que utilizan el ARN mensajero como diana no están todavía muy extendidos comercialmente, debido principalmente a las dificultades que existen en la elección de un buen gen diana que sea representativo de la viabilidad y la baja eficiencia de los métodos de extracción de ARN que provocan una disminución en la sensibilidad de la detección (Yaron S y Matthews KR, 2002; D'Souza DH *et al.*, 2009). Las desventajas de los métodos de PCR basados en ADN pueden solucionarse en cierto modo mediante la inclusión del paso de preenriquecimiento. Este



procedimiento aumenta la sensibilidad y ayuda a diferenciar entre muestras que contiene células viables de las que no (Yaron S y Matthews KR, 2002). Aun así, existe la posibilidad de que muestras donde inicialmente había mucha cantidad de células muertas sigan dando resultados falsos positivos (Sheridan GE *et al.*, 1998). Además, hay que tener en cuenta que desde el punto de vista del consumidor difícilmente podrá ser aceptado un alimento que aun no teniendo patógenos vivos los presente muertos.

Una opción para diferenciar las células muertas de las vivas es la utilización de monoacida de bromuro de etidio (EMA, *ethidium bromide monoazide*). Esta molécula intercalante penetra específicamente por la membrana dañada de las células muertas y bloquea la amplificación del ADN de estas células durante la reacción de PCR, amplificándose solamente el ADN de las células viables. De este modo se reducen los posibles falsos positivos generados por la detección de ADN de células muertas. En estos últimos años distintos autores han optado por utilizar EMA en sus ensayos los cuales han ido dirigidos a la detección de diferentes bacterias, como por ejemplo Lee LJ y Levin RE (2007) para la detección de bacterias en muestras de bacalao, Wang L y colaboradores (2009) para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne picada, Meng XC y colaboradores (2010) para la detección de bifidobacterias presentes en yogures probióticos, Minami J y colaboradores (2010) para detectar células viables de *Cronobacter*, o Wang L y Mustapha A (2010) para la detección de *Salmonella* en pollo y huevos. Si bien parece ser que el uso de EMA está indicado para diferenciar las células viables de las no viables, hay autores que contradicen esa opinión. Tanto Flekna y colaboradores (2007) como Kobayashi H y colaboradores (2009) dudan de la eficacia del EMA, ya que en la diferenciación entre células vivas y muertas tanto de *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*, así como de especies de *Staphylococcus*, respectivamente, la diferenciación entre esos dos tipos de células fue insuficiente. Estos autores observaron una inhibición en el crecimiento de las bacterias al utilizar EMA y demostraron que el uso de EMA tenía influencia tanto en las células vivas como en las muertas, y que además su efecto dependía de la concentración de células bacterianas presentes en la muestra y de la concentración de EMA utilizada.

En nuestro estudio, como se ha comentado anteriormente, 14 muestras tuvieron un resultado falso positivo al ser analizadas con la sonda utilizando la *master mix* de Takara. Pero en este caso no se cree que estos resultados sean debidos a la presencia de ADN de células muertas de *Salmonella*, ya que la extracción de ADN utilizada fue la misma para todas las reacciones de PCR y en el resto no se obtuvieron resultados falsos positivos.

Otro factor que ejerce una influencia importante en el resultado de la detección es el tipo de método de extracción de ADN utilizado. En este trabajo se eligió el kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel (Düren, Germany) ya que ha sido un kit comercial de extracción de ADN ampliamente utilizado por diversos autores para extraer ADN a partir de cultivos bacterianos, pero también a partir de muestras de alimentos como por ejemplo en Calvo L y colaboradores (2008). De todas formas existe una alta diversidad de kits comerciales de extracción que pueden ser igual o más útiles que el elegido en este trabajo. En los últimos años se han realizado diferentes estudios comparativos entre métodos comerciales de extracción de ADN en los cuales varían tanto los métodos comparados, como los sustratos, como también los microorganismos dianas que se quieren detectar (Klerks MM *et al.*, 2006; Scupham AJ *et al.*, 2007; Elizaquível P y Aznar R, 2008; Dauphin LA *et al.*, 2009; Dauphin LA *et al.*, 2010; Hyeon JY *et al.*, 2010). La conclusión principal aportada por todos estos autores es que existen diferencias claras en la eficacia de la extracción entre los diferentes kits comerciales. Cada metodología difiere en su capacidad de recuperar el ADN de los microorganismos y el tipo de método de extracción utilizado en una determinada matriz alimentaria influye en la sensibilidad de la PCR. Por lo tanto, si bien un método de extracción puede ser adecuado para una determinada matriz y para la detección de un determinado microorganismo, ese mismo método puede ser el que peores resultados ofrezca en otro tipo de matriz o cuando se detecta otro tipo de microorganismo.

A lo largo de todo el estudio de comparación de métodos realizado en este trabajo, fue muy notable la influencia que ejercía el tipo de alimento procesado en los resultados obtenidos. Se observó que dependiendo del tipo de matriz alimentaria analizada la eficacia de los métodos alternativos variaba notablemente. Alimentos como productos cárnicos (salvo las muestras de pollo),

pescados, piensos para mascotas y aves, huevos y comidas precocinadas resultaron ser poco problemáticos, ofreciendo unos resultados que si bien no fueron idénticos a los obtenidos con el método de referencia no variaban mucho de estos. Sin embargo, otros tipos de alimentos como las muestras de pollo, algunos productos lácteos, los piensos para vacuno y la bollería, fueron más problemáticos y ofrecieron unos resultados que diferían notablemente de los obtenidos por el método tradicional. Aun así, hay que resaltar que los resultados fueron también diferentes dependiendo del método alternativo empleado: la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara y la PCR a tiempo real con SYBR Green I mostraron unos resultados similares, y la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems obtuvo peores resultados que los dos anteriores en todos los casos.

Dentro de la variedad de productos cárnicos analizados, la mayor complicación estuvo a la hora de detectar la contaminación por *Salmonella* en las muestras de pollo. La causa de la aparición de resultados negativos cuando debían de haber sido positivos puede atribuirse a la composición de la piel de pollo.

Se han descrito una gran cantidad de componentes presentes en las muestras biológicas que pueden ser inhibidores de la PCR. Entre los inhibidores más comunes se incluyen componentes de los fluidos corporales y reactivos utilizados en ciencias clínicas y forenses (hemoglobina, urea, heparina, sales biliares, polisacáridos complejos,...), componentes de los alimentos (compuestos orgánicos, compuestos fenólicos, glucógeno, grasas, calcio,...) y compuestos medioambientales (compuestos fenólicos, ácidos húmicos, metales pesados,...) entre muchos otros (Wilson IG, 1997; Radström P *et al.*, 2004). Entre todos estos componentes la grasa es uno de los componentes que presenta una mayor influencia como inhibidor de la PCR o del crecimiento bacteriano.

La cantidad de grasa presente en la piel de pollo es bastante elevada, siendo esta uno de los principales factores que puede provocar la ausencia de reacción en este tipo de muestras o la inhibición del crecimiento de las bacterias. En nuestro caso, las muestras de pollo analizadas fueron tanto pieles de pollo como despiece de pollo (alas y muslos), pero que fueron procesados junto con la piel. La naturaleza física del alimento puede crear dificultades en la recuperación de las células diana. Los alimentos grasos, como es la piel de pollo, pueden

interferir con la recuperación de las células de *Salmonella* ya que las bacterias pueden quedarse retenidas dentro de las micelas lipídicas (Mansfield LP y Forsythe SJ, 2000). La temperatura del proceso de incubación permite a los lípidos de la piel volverse solubles, lo cual genera un aumento en el contenido de lípidos solubles en el medio durante el proceso de preenriquecimiento de la muestra. Los lípidos tienen tendencia a encapsular los materiales, en este caso las bacterias, por lo tanto esa retención dentro de las micelas lipídicas constituye una barrera protectora para las células que hace difícil su captura (Carter M, 2008). Además de el alto contenido en grasa de las pieles, su alto contenido en colágeno (Márquez E *et al.*, 2006) es otro obstáculo añadido en la detección de las células, ya que el colágeno también es un conocido inhibidor de la PCR (Kim S *et al.*, 2000; Radström P *et al.*, 2004).

En los diferentes productos lácteos estudiados, se observaron problemas de detección en varios de ellos, pero no pudo determinarse relación alguna entre la ausencia de detección y un tipo específico de producto. Tanto en las muestras de helado, como en las de queso y también en las de leche cruda se observaron resultados falsos negativos. La PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara mostró mejores resultados que los demás métodos de PCR (se detectaron 30 de las 31 muestras contaminadas), por lo que cabría pensar que ese método de PCR a tiempo real sería un buen método de *screening* para los productos lácteos. El inconveniente que surgió fue la aparición de resultados falsos positivos con ese método que no se cree que fuese debido a interferencias con otros microorganismos presentes en la muestra o a la detección de ADN de células muertas de *Salmonella*. En todo caso, desde el punto de vista del consumidor es preferible aplicar un método que sea capaz de detectar las muestras contaminadas aunque ese método detecte un porcentaje de muestras como falsos positivos, que utilizar un método que genere falsos negativos. Las muestras falsas negativas pasarían sin ser detectadas al consumidor pudiendo causar algún tipo de intoxicación alimentaria que sería peligroso para la salud, mientras que las muestras falsas positivas serían confirmadas en el laboratorio evitando así el consiguiente riesgo para la salud pública.

Algunas de las muestras de leche cruda de vaca mostraron un resultado de inhibición en la amplificación. Gracias a la inclusión del CI de amplificación la

inhibición fue detectada y puede ser eliminada mediante dilución 1/10 o 1/100 de la extracción de ADN. Este paso de dilución también se realizó en el resto de muestras inhibidas durante el trabajo. La causa de la inhibición en las muestras de leche se puede atribuir a sustancias presentes en la leche. La leche es un alimento muy complejo con abundantes posibles inhibidores de la PCR. Además de los componentes químicos naturales, en la leche proveniente directamente de la vaca se encuentran un alto número de células somáticas y flora bacteriana, que pueden causar problemas si hay poca cantidad de ADN diana (Poms RE *et al.*, 2001). Estudios realizados por Kim C-H y colaboradores (2001) demuestran que las sustancias inhibitorias presentes en la leche son capaces de inhibir la *Taq* ADN polimerasa generando de este modo resultados falsos negativos. La sustitución de la *Taq* ADN polimerasa por una *Thermus thermophilus* (*Tth*) ADN polimerasa podría resolver el problema ya que se ha visto que aumenta la sensibilidad de la detección de *Staphylococcus aureus* en leche.

En otro estudio realizado por Poms RE y colaboradores (2001) se observa como el ADN libre que está presente en la muestra de leche se encuentra principalmente en la capa superior de la nata, y no solamente en la fracción sedimentaria de donde principalmente se recoge la muestra para realizar la extracción. Por lo tanto, una gran cantidad de ADN se perdería durante el proceso de extracción ya que normalmente la capa superior grasa se descarta para ese proceso. Esta sería una posible razón de la ausencia de amplificación de *Salmonella* en algunos de los productos lácteos analizados (5 muestras de helados, 2 de queso y 5 de leche) ya que durante el proceso de extracción de ADN se evitó en todos los casos coger la muestra de la capa grasa superior presente en los cultivos de preenriquecimiento.

Las dificultades observadas relacionadas con una alta cantidad de grasa (en las pieles de pollo y algunos productos lácteos), se pueden atribuir también a los problemas surgidos con las muestras de bollos. En este tipo de muestras se obtuvieron una alta cantidad de falsos negativos mediante los métodos moleculares. Durante el procesamiento de las muestras de bollos se observó un alto contenido en grasa. Los bollos analizados eran de nata y de crema, componentes que tienen un alto contenido de esa sustancia. Además, algunos de los bollos estaban fritos, y por lo tanto, su contenido en grasa estaba aumentado.

En las muestras en las que se observaba una capa superior grasa se evitó por completo recoger de esa zona la muestra para la extracción de ADN, por lo tanto, como hemos comentado en la leche, parte del ADN podría haberse quedado en esa zona y no ser recogido. Del mismo modo que en el pollo, posiblemente las células de *Salmonella* se podrían haber quedado encapsuladas dentro de las micelas lipídicas formadas por la grasa de los bollos, y como consecuencia de ello seguramente no se habrían podido recuperar todas las células de *Salmonella* presentes.

En las muestras de bollos se obtuvieron resultados positivos por PCR pero negativos por el método de referencia. Dado que las muestras estaban experimentalmente contaminadas con *Salmonella*, en realidad el resultado correcto se corresponde con el obtenido por PCR. En ocasiones pueden obtenerse resultados de este tipo, en el que los métodos moleculares tienen mayor sensibilidad que el método de cultivo. La distribución desigual de *Salmonella* en la muestra o en el caldo de preenriquecimiento puede ser una de las causas de estos resultados, pudiendo recoger células para realizar la extracción de ADN pero no recuperarlas para la siembra en los caldos de enriquecimiento selectivo. Además, puede que las cepas no crezcan en los caldos selectivos o en las placas de agar. También se sabe que para poder diferenciar entre *Salmonella* y otras bacterias que crecen junto a ella en las placas de agar selectivo, la cantidad de células de *Salmonella* después del paso de enriquecimiento debe ser de al menos  $10^4$  ufc/ml (Löfström C *et al.*, 2004). Por lo tanto, si no se alcanza ese número de células en el caldo de preenriquecimiento, puede ser que no se detecte *Salmonella* mediante el método tradicional de cultivo.

En cuanto a las muestras de pescado, la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara demostró ser un buen método para este tipo de muestras, ya que alcanzó un 100% de eficacia, igualando el valor del método de referencia. No se puede decir lo mismo de los otros dos métodos de PCR a tiempo real ya que no se obtuvieron los resultados esperados, siendo la eficacia alcanzada mucho menor que con la sonda utilizando la *master mix* de Takara. En las muestras de pescados también se obtuvieron inicialmente algunos resultados de inhibición, que como en las muestras de lácteos se solucionaron realizando una dilución de la muestra de ADN. Pero es de destacar la inhibición que se dio en las

tres muestras de almejas analizadas con la sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems, fenómeno que no ocurrió con el resto de métodos moleculares. Que haya inhibición con alguna *master mix* y con otras no principalmente se debe a la eficacia de cada una de ellas derivada de la composición de sus reactivos, pero nos llamó la atención que justamente fuera en las muestras de almejas. Esto puede deberse a la naturaleza física de estos moluscos bivalvos. Los bivalvos se alimentan filtrando grandes volúmenes de agua, y junto con el agua toda clase de sustancias que puede haber en ella. Como animales filtradores que son, acumulan metales pesados en sus tejidos en una proporción directa al grado de contaminación ambiental. Además de metales pesados, también obtienen y concentran cantidades de organismos del plancton, incluidos los tóxicos (Fang Z-Q *et al.*, 2003; Beltrán G, 2005). Una de las causas de la inhibición de la PCR puede ser la presencia de este tipo de sustancias en la carne de la almeja, que durante el proceso de preparación de la muestra y el de extracción del ADN no se hubieran podido eliminar, y pudieran interferir en la reacción de amplificación, si bien no se tienen pruebas de este hecho. Por su naturaleza como filtradores, y por lo tanto su capacidad de bioacumulación de metales pesados y otros tóxicos, los bivalvos (almejas, mejillones, ostras,...) son elegidos para la monitorización de la presencia de contaminantes e indicadores de la calidad de los ecosistemas (Guthrie RK *et al.*, 1979; Baqueiro-Cárdenas ER *et al.*, 2007).

En las muestras de pienso el dato más destacado es la eficacia reducida que presentaron los métodos alternativos en las muestras de pienso para vacuno. Mientras que la eficacia en el pienso para mascotas y para aves fue del 100% para la PCR con sonda utilizando la *master mix* de Takara y con SYBR Green I (un poco menor con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems), los resultados obtenidos para el pienso para vacuno difieren notablemente. El que haya estas diferencias entre unos tipos de piensos y otros se puede atribuir al tipo de animal al que va dirigido cada pienso, y por lo tanto, a la diferente composición nutricional de cada uno de ellos: porcentaje en hidratos de carbono, grasas, proteínas, etc. Además, el uso de adulterantes como hormonas, antibióticos, presencia de dioxinas y otros tipos de químicos en los piensos utilizados en

producción animal es más que conocido (Leeman WR *et al.*, 2007), pudiendo influir esas sustancias en la detección y/o recuperación de las bacterias diana.

El siguiente paso en la validación de los métodos alternativos fue calcular el nivel de detección relativa. Este parámetro se determinó siguiendo lo indicado en la norma ISO 16140:2003, donde se define que el nivel de detección relativo está situado entre los dos niveles de contaminación que dan respectivamente menos y más del 50% del nivel de detección. Para calcular ese nivel se utilizó el procedimiento LOD<sub>50</sub> (*50% endpoint Limit of Detection*) y el resultado se calculó mediante el método *Spearman-Karber* (U.S. Food and Drug Administration, 2006). Se seleccionaron 5 tipos de alimentos representativos de cada categoría alimentaria. Para cada alimento se estudiaron 5 o 6 niveles de contaminación, realizándose 6 réplicas de cada combinación “matriz alimentaria/nivel de contaminación”.

Como se ha observado en la eficacia relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa, la matriz alimentaria que se analiza influye notablemente en los resultados que se obtienen. En los niveles de detección relativa el tipo de matriz alimentaria ejerció influencia sobre los resultados pero no se vio tan fuertemente afectada como los parámetros anteriores. Salvo por los niveles de detección en las muestras de pescados, todos los demás alimentos analizados mostraron valores comparables a los del método de referencia para todos los métodos moleculares. En los pescados se obtuvieron valores de alrededor de 130 ufc/25 gr con los métodos moleculares. Además, ese valor no pudo determinarse mediante el método de referencia para las muestras de pescado debido a la ausencia de crecimiento bacteriano en los ensayos realizados. En el resto de alimentos se obtuvieron unos niveles de detección con valores entre 0,5 y 3 ufc/25 gr, salvo en la PCR a tiempo real con SYBR Green I en salchichas de pollo que se obtuvo un nivel de detección ligeramente mayor de 10 ufc/25 gr. El que las células de *Salmonella* utilizadas para la contaminación de las muestras utilizadas en el estudio del nivel de detección no estuviesen estresadas, puede haber influido en que los resultados obtenidos mediante los métodos moleculares se asemejasen y fuesen totalmente equivalentes a los obtenidos por el método de referencia, ya que por el contrario, en el estudio para determinar la eficacia relativa las células utilizadas en la contaminación artificial estaban estresadas y el



método de referencia logró en todos los casos mejores resultados que los métodos moleculares.

Los niveles de detección relativa obtenidos en este estudio igualan o incluso mejoran resultados obtenidos en otros estudios. Por ejemplo, en la validación del iQ-Check *Salmonella* (Anonymous, 2004) obtuvieron un nivel de detección entre 0,27 y 2,18 células de *Salmonella* en 25 gr, valores muy similares a los obtenidos en este trabajo. McCabe EM y colaboradores (2011) mostraron unos niveles de detección entre 0,01 y 1 células, valores incluso mejores que los logrados en nuestro estudio y los obtenidos en la validación del iQ-Check *Salmonella*. Cheung PY y colaboradores (2004) estudiaron la eficacia del LightCycler *Salmonella* Detection kit (Roche, Indianapolis, USA) y obtuvieron unos niveles de detección de entre  $1,5 \times 10^3$  hasta  $1,5 \times 10^5$  ufc/25 gr dependiendo del alimento analizado. El primer valor se obtiene en muestras de comida precocinada y el segundo en muestras de pollo crudo. Este último valor es relativamente peor en comparación con el resto de estudios. Seguramente tenga que ver con el que las muestras analizadas sean muestras de pollo y por eso el nivel de detección en esas muestras se reduce considerablemente. Es de recordar que en nuestro trabajo las muestras de pollo contaminadas no se pudieron detectar con los métodos moleculares.

En todo caso, consideramos que nuestros niveles de detección son suficientemente sensibles para detectar *Salmonella* ya que son similares y comparables a los niveles de detección obtenidos con el método de referencia.

Para finalizar con el estudio, se quisieron comparar los métodos de PCR a tiempo real diseñados en este trabajo con algunos kits comerciales de detección de *Salmonella* para alimentos. Se quería comprobar de qué modo se asemejaban nuestros métodos a los métodos comerciales y si eran comparables o no. Los kits comerciales elegidos fueron por un lado el kit Salmofast® COMPLET de Microbial (Girona, España) porque era un sistema que se podía utilizar en cualquier aparato de PCR a tiempo real, y por otro lado, el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit de Bio-Rad porque era compatible con en el aparato iCycler de Bio-Rad donde se habían ido realizando todos los ensayos anteriores. Se compararon los resultados obtenidos en 7 tipos de alimentos diferentes con los tres métodos de PCR a tiempo real

---

diseñados en este trabajo, los dos kits comerciales de detección de *Salmonella* y el método de referencia.

Tras el análisis con los diferentes métodos el método de PCR a tiempo real que obtuvo la mayor eficacia fue el kit comercial iQ-Check™ *Salmonella* II con unos resultados similares al método de referencia. Excepto en las muestras de pollo, en el que ningún método molecular consiguió detectar las muestras contaminadas, los resultados de ese kit igualaron los obtenidos con el método de referencia, e incluso llegaron a ser superiores en las muestras de bollos donde el único método que consiguió detectar todas las muestras contaminadas con *Salmonella* fue el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit. El kit Salmofast® COMPLET, la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara y la PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I tuvieron unos resultados similares entre ellos, pero inferiores a los obtenidos con el iQ-Check™ *Salmonella* II Kit. El método con el que se obtuvo peores resultados fue la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems. Este resultado no es extraño ya que se ha observado a lo largo de todo el estudio que al utilizar esta *master mix* la eficacia del método se ve disminuida en prácticamente todos los ensayos.

La influencia que ejerce el tipo de matriz alimentaria analizada también se vio reflejada en este estudio. Mientras que la contaminación en algunos de los alimentos fue detectada correctamente por todos los métodos, como por ejemplo en las muestras de helados, las muestras de huevo, las muestras de pienso (excepto mediante la PCR con sonda utilizando la *master mix* de Applied Biosystems) o las salchichas de pollo (excepto con el kit Salmofast® COMPLET), en otras matrices más problemáticas como por ejemplo las muestras de pollo, las muestras de pescado o las de bollos, las muestras contaminadas no se detectaron por los métodos moleculares o los resultados obtenidos tenían una alta variabilidad entre los diferentes métodos.

En líneas generales, a lo largo de todo este trabajo se ha podido intuir la gran influencia que ejerce el tipo de alimento analizado sobre los resultados obtenidos. Algunos de los alimentos que tradicionalmente se analizan en busca de contaminación por *Salmonella*, debido a su composición (ya sea un alto contenido en grasas u otros componentes como antibióticos que ejercen inhibición en el

crecimiento de las bacterias), generan problemas al analizarlos y provocan una disminución de la eficacia en los métodos moleculares.

Otro aspecto destacable de este trabajo es la influencia que también ejerció en los resultados la *master mix* de PCR a tiempo real utilizada. Se ha demostrado como los resultados obtenidos con cada *master mix* difieren. La variación se debería principalmente a la composición de cada una de ellas. Por lo tanto, utilizar la *master mix* que mejores resultados proporcione para los alimentos que se quieran analizar, y usar el aparato de PCR a tiempo real y el sistema de detección más adecuado, es fundamental para la detección de patógenos en alimentos. En nuestro caso, con la *master mix* de Takara obtuvimos resultados mejores que con la de Applied Biosystems.

En cuanto a la utilización de sondas o de SYBR Green I como sistemas de detección en los alimentos, observando nuestros resultados y aunque la PCR a tiempo real con sonda utilizando la *master mix* de Takara haya proporcionado unos resultados ligeramente mejores, creemos que ambos métodos pueden ser igual de válidos para la detección de patógenos. La tendencia actual es utilizar métodos de PCR a tiempo real con sondas, y la mayoría de los kits comerciales se basan en ese tipo de detección, pero el SYBR Green I también se sigue utilizando para la detección y es una buena alternativa a las sondas. Y además, es una tecnología que presenta un menor coste. Por ejemplo, dentro de los kits comerciales que existen actualmente algunos de los sistemas BAX® Systems de Du Pont (Delaware, USA) funcionan mediante moléculas intercalantes como el SYBR Green I. Otros autores también prefieren la utilización del SYBR Green I a las sondas a la hora de detectar *Salmonella* en alimentos. Nam H-M y colaboradores (2005) describieron una PCR a tiempo real usando SYBR Green I para la detección específica de *Salmonella* en muestras ambientales de una granja (estiércol, comida de los animales, tanque de la leche, etc.), o por ejemplo Kumar R y colaboradores (2010) diseñaron una PCR a tiempo real usando SYBR Green I para realizar una detección cuantitativa de *Salmonella* en marisco. Otros autores también han elegido el SYBR Green I para PCR múltiple, y de este modo poder detectar más de una bacteria patógena simultáneamente en las muestras, como por ejemplo Park SH y colaboradores (2011) que realizan una detección simultánea de *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* en

muestras de agua, o Wang X y colaboradores (2004) que detectan simultáneamente *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en salchichas crudas.

Por último, otro aspecto importante a la hora de detectar patógenos en alimentos es la elección del método de extracción más adecuado. Hay que optimizar cada método teniendo en cuenta el tipo de alimento que se vaya a analizar y el patógeno que se quiera detectar, ya que algunos kits o métodos de extracción funcionan mejor para una determinada bacteria o en un determinado alimento. Por eso mismo, dependiendo de la rutina de cada laboratorio, debe elegirse el método más adecuado para cada ocasión y amoldarlo a cada circunstancia. Esto debe hacerse no solo con el método de extracción de ácidos nucleicos, sino que cada laboratorio debe adecuar todo el proceso, desde la recepción de la muestra hasta la obtención de los resultados, y cada uno de los pasos, a sus circunstancias particulares. Hoy en día idear un método que sirva para todos los alimentos y que funcione en todos los lugares no parece factible, por eso mismo la optimización del proceso completo en cada lugar de trabajo es fundamental para la obtención de unos resultados rápidos y fiables mediante métodos basados en PCR a tiempo real que puedan en un futuro sustituir a los métodos de cultivo tradicionales.



# CONCLUSIONES

---



1. El gen *invA* es una buena diana genética para la detección de *Salmonella* mediante PCR. Ha sido detectado en todos los aislamientos de *Salmonella* analizados pero no en el resto de microorganismos de otras especies.
2. El gen *invA* puede presentar variaciones nucleotídicas a lo largo de su secuencia, que puede dificultar el diseño de iniciadores y sondas para las reacciones de PCR. La sonda Invavitone, diseñada en primer lugar, no mostró los resultados deseados debido a esas variaciones, problema que fue solventado mediante el diseño de la sonda Invavitwo que no presentó esos problemas.
3. La detección mediante sondas TaqMan® resultó ser más sensible que la detección con SYBR Green I, pero a su vez menos específica. Por lo tanto, la detección mediante SYBR Green I es una buena alternativa a las sondas TaqMan®.
4. La generación de células bacterianas estresadas para su utilización en la contaminación artificial de los alimentos es un punto crítico de la validación, por la dificultad que conlleva su obtención y su detección. El protocolo de generación de células estresadas siempre debe estar debidamente definido.
5. La composición del alimento ejerce una influencia notoria en la capacidad de detección de microorganismos por los métodos moleculares, siendo los alimentos con un alto contenido en grasa los más problemáticos.
6. Los procesos pre-PCR, como la preparación de la muestra o la extracción del ADN, son otros puntos críticos del proceso de detección de patógenos en alimentos. Estos procesos deben ser adaptados al tipo de alimento que ha de ser analizado y al microorganismo que se debe detectar.



7. La *master mix* empleada en las reacciones de PCR tiene influencia sobre la capacidad de detección de ADN en la muestra. En nuestros ensayos la *master mix* de Takara funcionó mejor que la *master mix* de Applied Biosystems.
  
8. El kit comercial iQ-Check™ *Salmonella* II Kit para detección de *Salmonella* a partir de muestras de alimentos mediante PCR a tiempo real, ha resultado ser superior al resto de métodos estudiados. Los resultados obtenidos con los métodos moleculares diseñados en este trabajo han sido similares a los obtenidos con el kit comercial *Salmofast*® COMPLET.
  
9. Los métodos moleculares propuestos podrían ser utilizados como métodos de *screening* para la detección de *Salmonella* en muestras de alimento. No obstante, el método de elección podría variar en función de la matriz alimentaria.

# BIBLIOGRAFÍA

---



**Abdulmawjood, A., S. Roth, and M. Bülte.** 2002. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 16: 335-339.

**Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.** ([http://www.aesan.msps.es/AESAN/web/notas\\_prensa/salmonella\\_poona.shtml](http://www.aesan.msps.es/AESAN/web/notas_prensa/salmonella_poona.shtml)).

**Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.

**Amini, K., T. Z. Salehi, G. Nikbakht, R. Ranjbar, J. Amini, and S. B. Ashrafganjooei.** 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4(21): 2202-2210.

**Andrews, W. H.** 1987. Recommendations for preparing test samples for AOAC collaborative studies of microbiological procedures for foods. *Journal – Association of Official Analytical Chemists* 70(6): 931-936.

**Anonymous.** 2002. ISO 6579:2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

**Anonymous.** 2003. ISO 16140:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

**Anonymous.** 2004. AFNOR Validation following ISO 16140 of the iQ-Check *Salmonella* method. Institut Pasteur de Lille, France.

**Anonymous.** 2005. 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.

**Applied Biosystems.** Real-time PCR: Understanding Ct. Real-time PCR application note.

([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_053906.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf))

**Baqueiro-Cárdenas, E. R., L. Borabe, C. G. Goldaracena-Islas, and J. Rodríguez-Navarro.** 2007. Mollusks and pollution. A review. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78(suppl. oct): 1-7.

**Bäumler, A. J., F. Heffron, and R. Reissbrodt.** 1997. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *Journal of Clinical Microbiology* 35(5): 1224-1230.

**Beltrán, G.** 2005. La marea roja, p. 23-26. En *AMBIENT, 25ª edición*. Sección de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. ETS de Ingeniería de Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Cataluña.

**Betsou, F., K. Beaumont, J. M. Sueur, and J. Orfila.** 2003. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA from urine samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41(3): 1274-1276.

**Boyd, E. F., J. Li, H. Ochman, and R. K. Selander.** 1997. Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 179(6): 1985-1991.

**Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7): 2465-2467.

**Calvó, L., A. Martínez-Planells, J. Pardos-Bosch, and L. J. García-Gil.** 2008. A new real-time PCR assay for the specific detection of *Salmonella* spp. targeting the *bipA* gene. *Food Analytical Methods* 1(4): 236-242.

**Carter, M.** 2008. Development of a rapid detection method of *Salmonella* spp. on chicken skin real-time polymerase chain reaction. *Dissertation*. Auburn University. Alabama.

**Centro Nacional de Epidemiología y Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.** 2009. Informe Anual del Sistema de Información Microbiológica 2009. Abril 2010.

**Cheung, P-Y., C. W. Chan, W. Wong, T. L. Cheung, and K. M. Kam.** 2004. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detections kits for *Salmonella* spp. in food. *Letters in Applied Microbiology* 39: 509-515.

**Chiu, C-H., and J. T. Ou.** 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *Journal of Clinical Microbiology* 34(10): 2619-2622.

**Chiu, C-H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y-Y. Chou, H-S. Wang, and Y-S. Lee.** 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Research* 33(5): 1690-1698.

**Chou, Q., M. Russell, D. E. Birch, J. Raymond, and W. Bloch.** 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20(7): 1717-1723.

**Cohen, H. J., S. M. Mechanda, and W. Lin.** 1996. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 62(12): 4303-4308.

**Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization* 82: 346-353.

**D'Aoust, J-Y.** 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 12: 17-40.

**D'Aoust, J-Y.** 1997. Especies de *Salmonella*, p. 133-163. En Doyle, M. P., L. R. Beuchart, and T. J. Montville (ed.) *Microbiología de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

**Dauphin, L. A., R. J. Hutchins, L. A. Bost and M. D. Bowen.** 2009. Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 47(12): 3920-3926.

**Dauphin, L. A., K. W. Stephens, S. C. Eufinger, and M. D. Bowen.** 2010. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Yersinia pestis* DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples. *Journal of Applied Microbiology* 108(1): 163-172.

**Debevere, J., and M. Uyttendaele.** 2003. Validating detection techniques, p. 69-92. En McMeekin, T. A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.

**Del Cerro, A., S. M. Soto, and M. C. Mendoza.** 2003. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology* 20: 431-438.

**Deng, W., S-R. Liou, G. Plunkett III, G. F. Mayhew, D. J. Rose, V. Burland, V. Kodoyianni, D. C. Schwartz, and F. R. Blattner.** 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology* 185(7): 2330-2337.

**Dodd, C. E. R., P. J. Richards, and T. G. Aldsworth.** 2007. Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology* 120: 46-50.

**D'Souza, D. H., F. J. Critzer, and D. A. Golden.** 2009. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of *Salmonella* using *invA* primers. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(9): 1097-1106.

**D'Urso, O. F., P. Poltronieri, S. Marsigliante, C. Storelli, M. Hernández, and D. Rodríguez-Lázaro.** 2009. A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology* 26: 311-316.

---

**Edwards, R. A., G. J. Olsen, and S. R. Maloy.** 2002. Comparative genomics of closely related *salmonellae*. *Trends in Microbiology* 10(2): 94-99.

**Elizaquível, P., and R. Aznar.** 2008. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection* 71(10): 2110-2114.

**Espy, M. J., J. R. 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.

**Fang, Z-Q., R. Y. H. Cheung, and M. H. Wong.** 2003. Heavy metals in oysters, mussels and clams collected from coastal sites along the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Sciences* 15(1):9-24.

**Feder, I., J. C. Nietfeld, J. Galland, T. Yeary, J. M. sergeant, R. Oberst, M. L. Tamplin, and J. B. Luchansky.** 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *Journal of Clinical Microbiology* 39(7): 2477-2484.

**Feng, P.** 2001. Appendix 1: Rapid methods for detecting foodborne pathogens. En *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. FDA, Food and Drug Administration.

**Fierer, J., and D. G. Guiney.** 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of Clinical Investigation* 107(7): 775-780.

**Flekna, G., P. Stefanic, M. Wagner, F. J. Smulders, S. S. Mozina, and I. Hein.** 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology* 158(5): 405-412.

**Foy, C. A., and H. C. Parkes.** 2001. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* 47(6): 990-1000.



**Galán, J. E., and R. Curtis III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6383-6387.

**Galán, J. E., C. Ginocchio, and P. Costeas.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of Bacteriology* 174(13): 4338-4349.

**Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey, and F. Van Immerseel.** 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews* 33(4): 718-738.

**Ginocchio, C. C., K. Rahn, R. C. Clarke, and J. E. Galán.** 1997. Naturally occurring deletions in the centrisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infection and Immunity* 65(4): 1267-1272.

**González-Escalona, N., T. S. Hammack, M. Russell, A. P. Jacobson, A. J. De Jesús, E. W. Brown, and K. A. Lampel.** 2009. Detection of live *Salmonella* sp. cells in procedure by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 75(11): 3714-3720.

**Grimont, P. A. D., and F-X. Weill.** 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research of *Salmonella*.

**Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemühl, P. A. D. Grimont, and F-X. Weill.** 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161: 26-29.

**Guthrie, R. K., E. M. Davis, D. S. Cherry, and H. E. Murray.** 1979. Biomagnification of heavy metals by organisms in a marine microcosm. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 21(1): 53-61.

**Haffar, M., and K. A. Gilbride.** 2010. The utility and application of real-time PCR and FISH in the detection of single-copy gene targets in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium. *Canadian Journal of Microbiology* 56: 254-262.

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

**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.

**Hohmann, E. L.** 2001. Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases* 32: 263-269.

**Holt, K. E., N. R. Thomson, J. Wain, G. C. Langridge, R. Hasan, Z. A. Bhutta, M. A. Quail, H. Norbertczak, D. Walker, M. Simmonds, B. White, N. Bason, K. Mungall, G. Dougan, and J. Parkhill.** 2009. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BCM Genomics* 10: 36.

**Hoorfar, J., P. Ahrens, and P. Radström.** 2000. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3429-3435.

**Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner, and P. Fach.** 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 42(5): 1863-1868.

**Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77(1): 61-68.

**Hyeon, J-Y., I-G. Hwang, H-S. Kwak, C. Park, I-S. Choi, and K-H. Seo.** 2010. Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella* Enteritidis using real-time PCR assay. *Journal of Veterinary Science* 11(2): 143-149.

**Jamshidi, A., M. R. Bassami, and S. Afshari-Nic.** 2009. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. *International Journal of Veterinary Research* 3(1): 43-48.

**Jarvik, T., C. Smillie, E. A. Groisman, and H. Ochman.** 2010. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of Bacteriology* 192(2): 560-567.

**Jasson, V., L. Jaxsens, P. Luning, A. Rajkovic, and M. Uyttendaele.** 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27: 710-730.

**Kellogg, D. E., J.J. Sninsky, and S. Kwok.** 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 189(2): 202-208.

**Kim, C-H., M. Khant, and D. E. Morin.** 2001. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 84: 74-83.

**Kim, S., R. G. Labbe, and S. Ryu.** 2000. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1213-1215.

**Kingsley, R. A., C. L. Msefula, N. R. Thomson, S. Kariuki, K. E. Holt, M. A. Gordon, D. Harris, L. Clarke, S. Whitehead, V. Sangal, K. Marsh, M. Achtman, M. E. Molyneux, M. Cormican, J. Parkhill, C. A. MacLennan, R. S. Heyderman, and G. Dougan.** 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Research* 19(12): 2279-2287.

**Klerks, M. M., A. H. C. van Bruggen, C. Zijlstra, and M. Donnikov.** 2006. Comparison of methods of extracting *Salmonella enterica* serovar Enteritidis DNA from environmental substrates and quantification of organisms by using a general internal procedural control. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3879-3886.

**Kobayashi, H., M. Oethinger, M. J. Tuohy, G. S. Hall, and T. W. Bauer.** 2009. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Letters in Applied Microbiology* 48(5): 633-638.

**Krascenicsová, K., L. Píknová, E. Kačíková, and T. Kuchta.** 2008. Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 46: 483-487.

**Kubori, T., A. Sukhan, S-I. Aizawa, and J. E. Galán.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(18): 10225-10230.

**Kumar, R., P. K. Surendran, and N. Thampuran.** 2010. Rapid quantification of *Salmonella* in seafood by real-time PCR assay. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(3): 569-573.

**Kwang, J., E. T. Littledike, and J. E. Keen.** 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology* 22: 46-51.

**Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

**Lee, J. L., and R. E. Levin.** 2007. Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* 118(3): 312-317.

**Leeman, W. R., K. J. Van Den Berg, and G. F. Houben.** 2007. Transfer of chemicals from feed to animal products: The use of transfer factors in risk assessment. *Food Additives and Contaminants: Part A* 24(1): 1-13.

**Le Minor, L., and M. Y. Popoff.** 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(4): 465-468.

**Lilic, M., C. M. Quezada, and C. E. Stebbins.** 2010. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 66: 709-713.

**Liu, W-Q., Y. Feng, Y. Wang, Q-H. Zou, F. Chen, J-T. Guo, Y-H. Peng, Y. Jin, Y-G. Li, S-N. Hu, R. N. Johnston, G-R. Liu, and S-L. Liu.** 2009. *Salmonella* Paratyphi C: Genetic divergence from *Salmonella* Choleraesuis and pathogenic convergence with *Salmonella* Typhi. *PLoS ONE* 4(2): e4510.

**Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz.** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* 4: 357-362.

**Löfström, C., R. Knutsson, C. E. Axelsson, and P. Radström.** 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 69-75.

**Löfström, C., J. Schelin, B. Norling, H. Vigre, J. Hoorfar, and P. Radström.** 2011. Culture-independent quantification of *Salmonella enterica* in carcass gauze swabs by flotation prior to real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 145, supplement 1: S103-S109.

**Lübeck, P. S., P. Wolffs, S. L. W. On, P. Ahrens, P. Radström, and J. Hoorfar.** 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant Campylobacters: assay development and analytical validation. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5664-5669.

**Malorny, B., P. T. Tassios, P. Radström, N. Cook, M. Wagner, and J. Hoorfar.** 2003a. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 83: 39-48.

**Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge, and R. Helmuth.** 2003b. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 290-296.

**Malorny, B., J. Hoorfar, M. Hugas, A. Heuvelink, P. Fach, L. Ellerbroek, C. Bunge, C. Dorn, and R. Helmuth.** 2003c. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology* 89: 241-249.

**Malorny, B., E. Paccassoni, P. Fach, C. Bunge, A. Martin, and R. Helmuth.** 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12): 7046-7052.

**Malorny, B., C. Löfström, M. Wagner, N. Krämer, and J. Hoorfar.** 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): 1299-1304.

**Mansfield, L. P., and S. J. Forsythe.** 2000. Detection of *Salmonellae* in food. *Reviews in Medical Microbiology* 11(1): 37-46.

**Márquez, E., E. Arévalo, Y. Barboza, B. Benítez, L. Rangel, and A. Archile.** 2006. Formulación de un embutido con agregado de piel de pollo emulsificada con sangre de bovino. *Revista Científica* 16(4): 438-444.

**McCabe, E. M., C. M. Burgess, D. Walsh, E. O'Regan, S. McGuinness, T. Barry, S. Fanning, and G. Duffy.** 2011. Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods* 84: 19-26.

**McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413(6858): 852-856.

**McClelland, M., K. E. Sanderson, S. W. Clifton, P. Latreille, S. Porwollik, A. Sabo, R. Meyer, T. Bieri, P. Ozersky, M. McLellan, C. R. Harkins, C. Wang, C. Nguyen, A. Berghoff, G. Elliott, S. Kohlberg, C. Strong, F. Du, J. Carter, C. Kremizki, D. Layman, S. Leonard, H. Sun, L. Fulton, W. Nash, T. Miner, P. Minx, K. Delehaunty, C. Fronick, V. Magrini, M. Nhan, W. Warren, L. Florea, J. Spieth, and R. K. Wilson.** 2004. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics* 36(12): 1268-1274.

**McGuinness, S., E. McCabe, E. O'Regan, A. Dolan, G. Duffy, C. Burgess, S. Fanning, T. Barry, and J. O'Grady.** 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Science* 83: 555-562.

**Méndez-Álvarez, S., and E. Pérez-Roth.** 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(3): 183-192.

**Meng, X. C., R. Pang, C. Wang, and L. Q. Wang.** 2010. Rapid and direct quantitative detection of viable bifidobacteria in probiotic yogurt by combination of ethidium monoazide and real-time PCR using a molecular beacon approach. *The Journal of Dairy Research* 77(4): 498-504.

**Miller, F. A., T. R. S. Brandão, P. Teixeira, and C. L. M. Silva.** 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* 112: 261-265.

**Minami, J., K. Yoshida, T. Soejima, T. Yaeshima, and K. Iwatsuki.** 2010. New approach to use ethidium bromide monoazide as an analytical tool. *Journal of Applied Microbiology* 109(3): 900-909.

**Mozola, M. A.** 2006. Genetics-based methods for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Journal of AOAC International* 89(2): 517-529.

**Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.

**Nam, H-M., V. Srinivasan, B. E. Gillespie, S. E. Murinda, and S. P. Oliver.** 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* 102: 161-171.

**Niesters, H. G.** 2002. Clinical virology in real time. *Journal of Clinical Virology* 25, Supplement 3: 3-12.

**Noonan, K. E., C. Beck, T. A. Holzmayer, J. E. Chin, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, A. F. Gazdar, C. L. Willman, B. Griffith, D. D. Von Hoff, and I. B. Roninson.** 1990. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7160-7164.

**Olsen, J. E., S. Aabo, W. Hill, S. Notermans, K. Wernars, P. E. Granum, T. Popovic, H. N. Rasmussen, and O. Olsvik.** 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 28: 1-78.

**Pan, T. M., and Y. J. Liu.** 2002. Identification of *Salmonella* Enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 35(3): 147-151.

**Park, S. H., I. Hanning, R. Jarquin, P. Moore, D. J. Donoghue, A. M. Donoghue, and S. C. Ricke.** 2011. Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiology Letters* 316(1): 7-15.



**Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connor, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413(6858): 848-852.

**Pathmanathan, S. G., N. Cardona-Castro, M. M. Sánchez-Jiménez, M. M. Correa-Ochoa, S. D. Puthuchery, and K. L. Thong.** 2003. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hlyA* gene. *Journal of Medical Microbiology* 52: 773-776.

**Paul, N., J. Shum, and T. Le.** 2010. Hot start PCR. *Methods in Molecular Biology* 630: 301-318.

**Poms, R. E., J. Glössl, and H. Foissy.** 2001. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology* 213: 361-365.

**Porwollik, S., and M. McClelland.** 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection* 5: 977-989.

**Qvist, S.** 2007. NordVal: A Nordic system for validation of alternative microbiological methods. *Food Control* 18: 113-117.

**Radström, P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lövenklev, and C. Löfström.** 2004. Pre-PCR processing. *Molecular Biotechnology* 26: 133-146.

**Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galán, C. Ginocchio, R. Curtis III, and C. L. Gyles.** 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6: 271-279.

**Rajkowski, K. T., and R. L. Dudley.** 1999. Use of selective media to recover *Salmonella* and *Vibrio cholerae* after growth in reconditioned pork-processing wastewater. *Journal of Food Protection* 62(7): 724-730.

**Scupham, A. J., J. A. Jones, and I. V. Wesley.** 2007. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 102(2): 401-409.

**Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.** 2008. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmisibles. Informe Anual.

**Rosenstraus, M., Z. Wang, S-Y. Chang, D. DeBonville, and J. P. Spadoro.** 1998. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties and effect on clinical performance. *Journal of Clinical Microbiology* 36(1): 191-197.

**Rybicki, E.** 2001. PCR primer design and reaction optimisation. En *Molecular Biology Techniques Manual*. ([http://www.mcb.uct.ac.za/Manual/molbiol\\_manual.htm](http://www.mcb.uct.ac.za/Manual/molbiol_manual.htm))

**Sachadyn, P., and J. Kur.** 1998. The construction and use of a PCR internal control. *Molecular and Cellular Probes* 12: 259-262.

**Sánchez-Jiménez, M. M., N. Cardona-Castro, N. Canu, S. Uzzau, and S. Rubino.** 2010. Distribution of pathogenicity islands among Colombian isolates of *Salmonella*. *Journal of Infection in Developing Countries* 4(9): 555-559.

**Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M-A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, and P. M. Griffin.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States-Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17(1): 7-15.

**Schmidt, H., and M. Hensel.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 17(1): 14-56.

**Schraidt, O., M. D. Lefebre, M. J. Brunner, W. H. Schmied, A. Schmidt, J. Radics, K. Mechtler, J. E. Galán, and T. C. Marlovits.** 2010. Topology and organization of the *Salmonella* Typhimurium type III secretion needle complex components. *PLoS Pathogens* 6(4): e1000824. doi:10.1371/journal.ppat.1000824

**Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley.** 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 2959-2965.

**Sheridan, G. E. C., C. I. Masters, J. A. Shallcross, and B. M. Mackey.** 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1313-1318.

**Siebert, P. D., and J. W. Larrick.** 1992. Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558.

**Simpkins, S. A., A. B. Chan, J. Hays, B. Pöpping, and N. Cook.** 2000. An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Letters in Applied Microbiology* 30: 75-79.

**Smith, J. L.** 1994. Arthritis and Foodborne Bacteria. *Journal of Food Protection* 57(10): 935-941.

**Sohni, Y., S. Kanjilal, and V. Kapur.** 2008. Performance evaluation of five commercial real-time PCR reagent systems using TaqMan assays for *B. anthracis* detection. *Clinical Biochemistry* 41: 640-644.

**Soler, P., S. Herrera, J. Rodríguez, J. Cascante, R. Cabral, A. Echeita-Sarriondia, and S. Mateo.** 2008. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype Kedougou infection in infants linked to infant formula milk, Spain, 2008. *Eurosurveillance* 13(27-39): 451-452.

**Stephens, K. W., R. J. Hutchins, and L. A. Dauphin.** 2010. Cross-platform evaluation of commercial real-time reverse transcription PCR master mix kits using a quantitative 5' nuclease assay for Ebola virus. *Molecular and Cellular Probes* 24: 370-375.

**Taban, B. M., U. Ben, and S. A. Aytac.** 2009. Rapid detection of *Salmonella* in milk by combined immunomagnetic separation-polymerase chain reaction assay. *Journal of Dairy Science* 92(6): 2382-2388.

Thomson, N. R., D. J. Clayton, D. Windhorst, G. Vernikos, S. Davidson, C. Churcher, M. A. Quail, M. Stevens, M. A. Jones, M. Watson, A. Barron, A. Layton, D. Pickard, R. A. Kingsley, A. Bignell, L. Clark, B. Harris, D. Ormond, Z. Abdellah, K. Brooks, I. Cherevach, T. Chillingworth, J. Woodward, H. Norberczak, A. Lord, C. Arrowsmith, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, M. Sanders, S. Whitehead, J. A. Chabalgoity, D. Maskell, T. Humphrey, M. Roberts, P. A. Barrow, G. Dougan, and J. Parkhill. 2008. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research* 18(10): 1624-1637.

Trafny, E. A., K. Kozłowska, and M. Szpakowska. 2006. A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in human faeces. *Letters in Applied Microbiology* 43: 673-679.

Trkov, M., and G. Avgustin. 2003. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology* 80: 67-75.

Tyagi, S., and F. R. Kramer. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14(3): 303-308.

U. S. Food and Drug Administration. 2006. Appendix K: Determining Microbial Limits of Detection. En *Final Report and Executive Summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology*.

(<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm124900.htm>). La versión revisada del software de Excel está disponible en [Anthony.Hitchins@fda.hhs.gov](mailto:Anthony.Hitchins@fda.hhs.gov)

Uyttendaele, M., I. Van Hoorde, and J. Debevere. 2000. The use of immune-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. *International Journal of Food Microbiology* 54: 205-212.

**van Asten, A. J., and J. E. van Dijk.** 2006. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 44(3): 251-259.

**Velázquez, M., S. R. Tatini, and J. M. Feirtag.** 2000. Evaluation of a two-step protocol for rapid detection of *Salmonella* in ice-cream and Cheddar cheese. *Food Microbiology* 17: 349-359.

**Wang, L., Y. Li, and A. Mustapha.** 2009. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 107(5): 1719-1728.

**Wang, L., and A. Mustapha.** 2010. EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable *Salmonella* in chicken eggs. *Journal of Food Science* 75(3): 134-139.

**Wang, X., N. Jothikumar, and M. W. Griffiths.** 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection* 67(1): 189-192.

**Warren, B. R., H. G. Yuk, and K. R. Schneider.** 2007. Detection of *Salmonella* by flow-through immunocapture real-time PCR in selected foods within 8 hours. *Journal of Food Protection* 70(4): 1002-1006.

**Welch, T. J., W. F. Fricke, P. F. McDermott, D. G. White, M. L. Rosso, D. A. Rasko, M. K. Mammel, M. Eppinger, M. J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J. E. Leclerc, J. M. Hinshaw, L. E. Lindler, T. A. Cebula, E. Carniel, and J. Ravel.** 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE* 2(3): e309.

**Widjoatmodjo, M. N., A. C. Fluit, R. Torensma, B. H. Keller, and J. Verhoef.** 1991. Evaluation of the magnetic immune PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10(11): 935-938.

**Widjoatmodjo, M. N., A. C. Fluit, R. Torensma, G. P. H. T. Verdonk, and J. Verhoef.** 1992. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30(12): 3195-3199.

**Wilhelm, J., and A. Pingoud.** 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4: 1120-1128.

**Wilson, I. G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3741-3751.

**Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, C. N. Gundry, and K. S. J. Elenitoba-Johnson.** 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25(4): 430-442.

**Wolffs, P. F., R. Knutsson, B. Norling, and P. Radström.** 2004. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, Flotation, prior to real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1042-1047.

**Wolffs, P. F., B. Norling, J. Hoorfar, M. Griffiths, and P. Radström.** 2005. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10): 5759-5764.

**Wolffs, P. F., K. Glencross, R. Thibaudeau, and M. W. Griffiths.** 2006. Direct quantitation and detection of *Salmonellae* in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3896-3900.

**Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov.** 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular Microbiology* 29(3): 883-891.

**Wu, V. C. H.** 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25: 735-744.

**Yaron, S., and K. R. Matthews.** 2002. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology* 92: 633-640.

**Yeh, K. S., T. H. Chen, C. W. Liao, C. S. Chang, and H. C. Lo.** 2002. PCR amplification of the *Salmonella* Typhimurium *fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species. *International Journal of Food Microbiology* 78(3): 227-234.

**Ziemer, C. J., and S. R. Steadham.** 2003. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters in Applied Microbiology* 37: 463-469.

# ANEXOS

---

---





## ANEXO 1. Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
SP1	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	2, 3	+	+	+	+
SP2	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	2, 2	+	+	+	+
SP3	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	4, 2	+	+	+	+
SP4	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	2, 0	+	+	+	+
SP5	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	1, 3	+	+	+	+
SP6	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	2, 2	+	+	+	+
SP7	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP8	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP9	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP10	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP11	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP12	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP13	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	2, 0	+	+	+	+
SP14	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	16, 13	+	+	+	+
SP15	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	16, 13	+	+	+	+
SP16	Salchicha pollo	-	SI	S. Typhimurium nº 256	16,13	+	+	+	+
SP17	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP18	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP19	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
SP20	Salchicha pollo	-	NO			-	-	-	-
PP1	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	-	-	-	+
PP2	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	+	-	-	+
PP3	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	-	-	-	+
PP4	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	-	-	-	+
PP5	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	-	-	-	+

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
PP6	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	15, 19	-	-	-	+
PP7	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
PP8	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
PP9	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
PP10	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
PP11	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	33, 29	-	-	-	+
PP12	Piel de pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	33, 29	+	-	-	+
PP13	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
PP14	Piel de pollo	-	NO			-	-	-	-
DP1	Despiece pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	33, 29	-	-	-	+
DP2	Despiece pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	33, 29	-	-	-	+
DP3	Despiece pollo	-	SI	S. Heidelberg nº 312	33, 29	+	-	-	+
DP4	Despiece pollo	-	NO			-	-	-	-
DP5	Despiece pollo	-	NO			-	-	-	-
DP6	Despiece pollo	-	NO			-	-	-	-
TX1	Chichiquis cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 685	9, 14	+	+	+	+
TX2	Chichiquis cerdo	-	SI		9, 14	+	+	+	+
TX3	Chichiquis cerdo	-	SI		9, 12	+	+	+	+
TX4	Chichiquis cerdo	-	SI		9, 12	+	+	+	+
TX5	Chichiquis cerdo	+	Cont natural			-	-	-	-
TX6	Chichiquis cerdo	-	NO			-	-	-	-
TX7	Chichiquis cerdo	-	NO			-	-	-	-
TX8	Chichiquis cerdo	-	NO			-	-	-	-
TX9	Chichiquis cerdo	-	NO			-	-	-	-
SC1	Salchicha cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 151	13, 20	+	+	+	+
SC2	Salchicha cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 151	13, 20	+	+	+	+
CPC1	Carne picada cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 134	16, 25	-	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
CPC2	Carne picada cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 134	16, 25	-	-	-	+
CPC3	Carne picada cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 134	16, 25	+	+	+	+
CPC4	Carne picada cerdo	-	SI	S. Typhimurium nº 134	16, 25	-	-	-	-
CPC5	Carne picada cerdo	-	NO			-	-	-	-
CPC6	Carne picada cerdo	-	NO			-	-	-	-
CPC7	Carne picada cerdo	-	NO			-	-	-	-
CPC8	Carne picada cerdo	-	NO			-	-	-	-
CPC9	Carne picada cerdo	-	NO			-	-	-	-
HEL1	Helado nata	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	+	+
HEL2	Helado vainilla	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	-	+
HEL3	Helado fresa	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	-	+
HEL4	Helado avellana	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	-	+
HEL5	Helado chocolate	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	+	+
HEL6	Helado fresa	-	SI	S. Cubana nº 238	25, 30	+	+	+	+
HEL7	Helado avellana	-	NO			-	-	-	-
HEL8	Helado vainilla	-	NO			-	-	-	-
HEL9	Helado chocolate	-	NO			-	-	-	-
HEL10	Helado nata	-	NO			-	-	-	-
HEL11	Helado nata	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	-	+	+
HEL12	Helado fresa	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	+	+	+
HEL13	Helado limón	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	+	+	+
HEL14	Helado strachiatella	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	-	+	+
HEL15	Helado café	-	NO			+	-	-	-
HEL16	Helado nata	-	NO			+	-	-	-
HEL17	Helado fresa	-	NO			+	-	-	-
HEL18	Helado nata	-	NO			+	-	-	-
HEL19	Helado strachiatella	-	NO			+	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
HEL20	Helado limón	-	NO			+	-	-	-
QUE1	Queso tetilla	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	+	+	+
QUE2	Queso tetilla	-	SI	S. Cubana nº 238	10, 10	+	+	+	+
QUE3	Queso fresco	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	-	+	+
QUE4	Queso de barra	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE5	Queso curado	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE6	Idiazabal	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE7	Idiazabal	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE8	Queso de barra	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE9	Queso fresco	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	-	+	+
QUE10	Queso pasta blanda	-	SI	S. Cubana nº 238	24, 22	+	+	+	+
QUE11	Queso de cabra	-	NO			-	-	-	-
QUE12	Queso de cabra	-	NO			+	-	-	-
QUE13	Queso fresco	-	NO			+	-	-	-
QUE14	Queso barra	-	NO			+	-	-	-
QUE15	Queso semicurado	-	NO			+	-	-	-
QUE16	Queso fresco	-	NO			+	-	-	-
QUE17	Queso pasta blanda	-	NO			+	-	-	-
QUE18	Idiazabal	-	NO			+	-	-	-
QUE19	Idiazabal	-	NO			+	-	-	-
LC1	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	+	+
LC2	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	-	+
LC3	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	-	+
LC4	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	+	+
LC5	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	+	+
LC6	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	22, 22	+	+	+	+
LC7	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
LC8	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC9	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC10	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC11	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC12	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC13	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC14	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC15	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC16	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC17	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC18	Leche cruda vaca	-	NO			-	-	-	-
LC19	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	51, 55	+	+	+	+
LC20	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	51, 55	+	+	+	+
LC21	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	51, 55	+	+	+	+
LC22	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	51, 55	+	+	+	+
LC23	Leche cruda vaca	-	SI	S. Cubana nº 238	51, 55	-	-	-	-
PES1	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES2	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES3	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES4	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES5	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES6	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	30, 35	+	+	+	+
PES7	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	23, 23	+	+	+	+
PES8	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	23, 23	+	+	+	+
PES9	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	23, 23	+	+	+	+
PES10	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	23, 23	+	+	+	+
PES11	Pescado	-	NO			-	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
PES12	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES13	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES14	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES15	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES16	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES17	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES18	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES19	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES20	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES21	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	50, 46	+	+	+	+
PES22	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	50, 46	+	+	+	+
PES23	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	50, 46	+	+	+	+
PES24	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	50, 46	+	+	+	+
PES25	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	50, 46	+	+	+	+
PES26	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES27	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES28	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES29	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES30	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES31	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	59, 43	+	+	+	+
PES32	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	59, 43	+	+	+	+
PES33	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	59, 43	+	+	+	+
PES34	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	59, 43	+	+	+	+
PES35	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	59, 43	+	+	+	+
PES36	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES37	Pescado	-	NO			-	-	-	-
PES38	Pescado	-	NO			-	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
PES39	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES40	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES41	Almejas	-	SI	S. Enteritidis nº 676	31, 25	+	-	+	+
PES42	Almejas	-	SI	S. Enteritidis nº 676	31, 25	+	-	+	+
PES43	Almejas	-	NO		-	-	-	-	-
PES44	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	37, 27	+	+	+	+
PES45	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	37, 27	+	+	+	+
PES46	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	37, 27	+	+	+	+
PES47	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	37, 27	+	+	+	+
PES48	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	37, 27	+	+	+	+
PES49	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES50	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES51	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES52	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES53	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES54	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	31, 25	+	+	+	+
PES55	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	31, 25	+	+	+	+
PES56	Pescado	-	SI	S. Enteritidis nº 676	31, 25	+	+	+	+
PES57	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
PES58	Pescado	-	NO		-	-	-	-	-
VAC1	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	5, 16	-	-	+	+
VAC2	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	5, 16	-	-	+	+
VAC3	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	5, 16	-	-	+	+
VAC4	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	5, 16	+	-	+	+
VAC5	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	5, 16	-	-	+	+
VAC6	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	9, 9	-	-	+	+
VAC7	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	9, 9	+	-	+	+

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.



## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
VAC8	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	9, 9	+	-	+	+
VAC9	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	9, 9	+	-	+	+
VAC10	Pienso para vacuno	-	SI	S. Enteritidis nº 174	9, 9	+	-	+	+
VAC11	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC12	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC13	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC14	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC15	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC16	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC17	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC18	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC19	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
VAC20	Pienso para vacuno	-	NO			-	-	-	-
MASC1	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	7, 11	+	+	+	+
MASC2	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	7, 11	+	+	+	+
MASC3	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	7, 11	+	+	+	+
MASC4	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	12, 10	+	+	+	+
MASC5	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	12, 10	+	+	+	+
MASC6	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC7	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC8	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC9	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC10	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC11	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	15, 4	+	+	+	+
MASC12	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	15, 4	+	+	+	+
MASC13	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	15, 4	+	+	+	+
MASC14	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	6, 13	+	+	+	+

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
MASC15	Pienso para mascotas	-	SI	S. Enteritidis nº 174	6, 13	+	+	+	+
MASC16	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC17	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC18	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC19	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
MASC20	Pienso para mascotas	-	NO			-	-	-	-
AVI1	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	11, 16	+	+	+	+
AVI2	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	11, 16	+	+	+	+
AVI3	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	11, 16	+	+	+	+
AVI4	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	11, 16	+	+	+	+
AVI5	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	11, 16	+	+	+	+
AVI6	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	17, 15	+	+	+	+
AVI7	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	17, 15	+	+	+	+
AVI8	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	17, 15	+	+	+	+
AVI9	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	17, 15	+	+	+	+
AVI10	Pienso para avicultura	-	SI	S. Enteritidis nº 174	17, 15	+	+	+	+
AVI11	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI12	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI13	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI14	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI15	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI16	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI17	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI18	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI19	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
AVI20	Pienso para avicultura	-	NO			-	-	-	-
BN1	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	9, 11	+	+	+	+

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INOCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
BN2	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	9, 11	+	-	+	+
BN3	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	9, 11	+	-	+	+
BN4	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	16, 12	+	-	+	+
BN5	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	16, 12	+	-	+	+
BN6	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BN7	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BN8	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BN9	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BN10	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BN11	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	25, 25	-	-	+	-
BN12	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	25, 25	-	-	+	-
BN13	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	25, 25	-	-	+	-
BN14	Bollo nata	-	SI	S. Enteritidis nº 57	25, 25	-	-	+	+
BN15	Bollo nata	-	NO			-	-	-	-
BC1	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	14, 13	+	-	-	+
BC2	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	14, 13	+	-	+	-
BC3	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	14, 13	-	-	-	+
BC4	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	15, 7	-	-	-	+
BC5	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	15, 7	+	-	-	+
BC6	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
BC7	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
BC8	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
BC9	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
BC10	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
BC11	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	9, 10	-	-	+	-
BC12	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	9, 10	-	-	-	+
BC13	Bollo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	9, 10	-	-	+	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
BC14	Boillo crema	-	SI	S. Enteritidis nº 598	9, 10	-	-	-	-
BC15	Bollo crema	-	NO			-	-	-	-
COMP1	Croquetas congeladas	-	NO			-	-	-	-
COMP2	Lasaña de carne	-	SI	S. Typhimurium nº 678	8, 17	+	+	+	+
COMP3	Cocido garbanzos	-	NO			-	-	-	-
COMP4	Pizza carbonara	-	SI	S. Typhimurium nº 678	24, 28	+	+	+	+
COMP7	Canelones de carne	-	SI	S. Typhimurium nº 678	8, 17	+	+	+	+
COMP8	Ensalada	-	SI	S. Tennessee nº 580	16, 17	+	+	+	+
COMP9	Pizza barbacoa	-	SI	S. Typhimurium nº 678	8, 17	+	+	+	+
COMP10	Sandwich atún	-	NO			-	-	-	-
COMP11	Ensalada	-	SI	S. Tennessee nº 580	16, 17	+	+	+	+
COMP12	Albóndigas tomate	-	NO			-	-	-	-
COMP13	Sandwich cangrejo	-	NO			-	-	-	-
COMP14	Tortilla	-	SI	S. Enteritidis nº 36	9, 13	+	+	+	+
COMP15	Tortilla	-	NO			-	-	-	-
COMP17	Patatas a la riojana	-	SI	S. Typhimurium nº 678	24, 28	+	+	+	+
COMP18	Filete ruso en salsa	-	NO			-	-	-	-
COMP19	Sandwich vegetal	-	NO			-	-	-	-
COMP20	Ensalada americana	-	NO			-	-	-	-
COMP21	Lasaña de atún	-	NO			-	-	-	-
COMP22	Ensalada	-	NO			-	-	-	-
H1	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	8, 8	+	+	+	+
H2	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	8, 8	+	+	+	+
H3	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	8, 8	+	+	+	+
H4	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	8, 8	+	+	+	+
H5	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	8, 8	+	+	+	+
H6	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	9, 12	+	+	+	+

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

## ANEXO 1 (continuación). Muestras de alimentos analizados en el estudio.

Cod muestra	Alimento	ANÁLISIS INICIAL	INÓCULADA	CEPA	Colonias inóculo	Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green	Método Referencia
H7	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	9, 12	+	+	+	+
H8	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	9, 12	+	+	+	+
H9	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	9, 12	+	+	+	+
H10	Interior del huevo	-	SI	S. Enteritidis nº 54	9, 12	+	-	+	+
H11	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H12	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H13	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H14	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H15	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H16	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H17	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H18	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H19	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-
H20	Interior del huevo	-	NO			-	-	-	-

**En amarillo:** muestra contaminada naturalmente. **En azul:** muestras que mostraron inhibición de la PCR, el resultado mostrado en la casilla es el obtenido tras diluir la muestra de ADN 1/10 o 1/100. **En verde:** muestras que fueron contaminadas artificialmente pero que resultaron finalmente tener un resultado negativo comprobado (se consideraron como muestras negativas). **En morado:** muestras con un resultado falso positivo.

**Anexo 2. Resultados obtenidos en cada alimento y para cada nivel de contaminación en los ensayos realizados para el cálculo del nivel de detección.**

			Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR Green I	Método Referencia
Huevo	Nivel de Inoculación 1 0 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nivel de Inoculación 2 0,5 ufc	6 réplicas	3/6	3/6	3/6	4/6
	Nivel de Inoculación 3 1 ufc	6 réplicas	5/6	2/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 4 10 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 5 100 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 6 500 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
Helado	Nivel de Inoculación 1 0 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nivel de Inoculación 2 1 ufc	6 réplicas	4/6	0/6	4/6	4/6
	Nivel de Inoculación 3 5 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 4 10 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 5 100 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 6 500 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
Pienso	Nivel de Inoculación 1 0 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nivel de Inoculación 2 0,5 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	1/6	3/6
	Nivel de Inoculación 3 1 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 4 10 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 5 100 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 6 500 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6

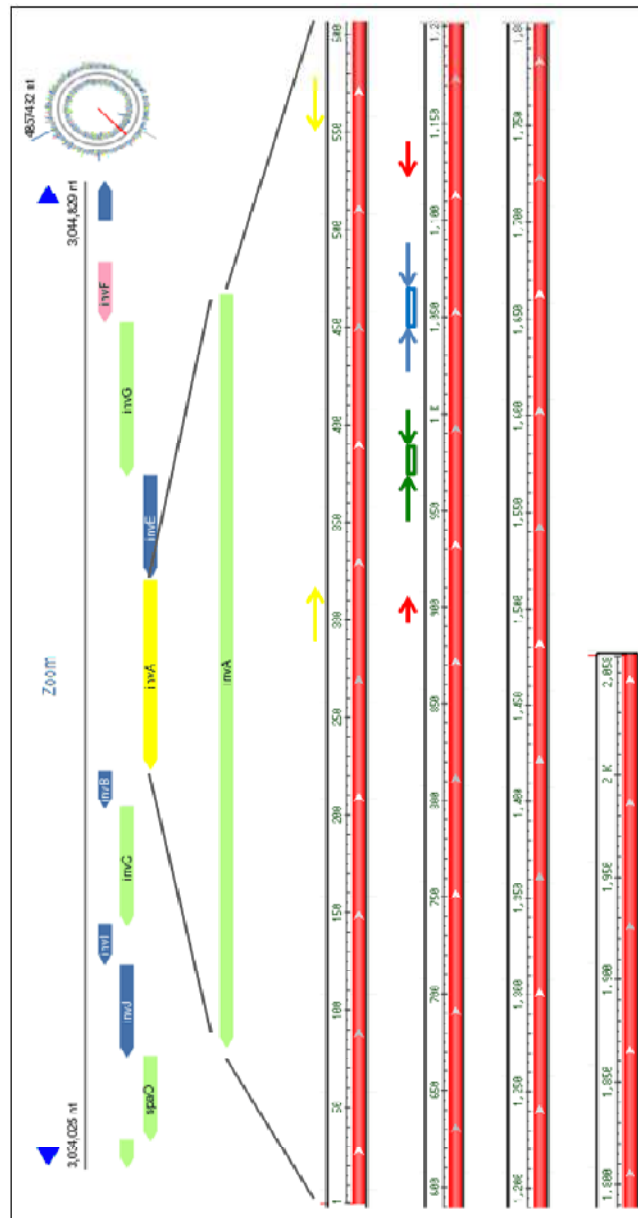
**Anexo 2 (continuación). Resultados obtenidos en cada alimento y para cada nivel de contaminación en los ensayos realizados para el cálculo del nivel de detección.**

			Sonda Takara	Sonda Applied	SYBR	Método Referencia
Pescado	Nivel de Inoculación 1 0 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nivel de Inoculación 2 1 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	2/6	0/6
	Nivel de Inoculación 3 10 ufc	6 réplicas	0/6	1/6	6/6	1/6
	Nivel de Inoculación 4 100 ufc	6 réplicas	1/6	1/6	6/6	1/6
	Nivel de Inoculación 5 500 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	0/6
	Nivel de Inoculación 6 1000 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	0/6
Salchichas de pollo	Nivel de Inoculación 1 0 ufc	6 réplicas	0/6	0/6	0/6	0/6
	Nivel de Inoculación 2 1 ufc	6 réplicas	2/6	2/6	0/6	1/6
	Nivel de Inoculación 3 10 ufc	6 réplicas	3/6	5/6	3/6	4/6
	Nivel de Inoculación 4 100 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6
	Nivel de Inoculación 5 500 ufc	6 réplicas	6/6	6/6	6/6	6/6

Se indica el número de muestras que fueron detectadas de las 6 réplicas realizadas en cada nivel de inoculación por cada alimento.

**ANEXO 3. Gen *invA* de *Salmonella*.**

a) Localización de los diversos iniciadores utilizados en el estudio a lo largo de la secuencia del gen.



La localización de los iniciadores en el gen *invA* está señalada con flechas; amarillo: localización iniciadores 139/141; rojo: iniciadores *Invasec1* e *Invasec2*; verde: iniciadores *Invvitone-F* e *Invvitone-R* y zona de hibridación de la sonda *Invvitone*; azul: iniciadores *Invvitone-F* e *Invvitone-R* y zona de hibridación de la sonda *Invvitone*.



**ANEXO 3 (continuación). Gen *invA* de *Salmonella*.**

**b) Secuencia detallada del gen *invA* y localización de los iniciadores utilizados en el estudio.**

```

GTGCTGCTTTTCTCTACTTAAACAGTGCTCGTTTACGACCTGAATTACTGATTCTGGTACTAA
TGGTGATGATCATTTCATGTTTCGTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTTCTCTGAT
CGCACTGAATATCGTACTGGCGATATTGGTGTTTATGGGGTCGTTCTACATTGACAGAATC
CTCAGTTTTTCAACGTTTCCTGCGGTAAGTTAATTACCACGCTCTTTCGTCCTGGCATTAT
CGATCAGTACCAGTTCGTTTATCTTGTATTGAAGCCGATGCCGGTGAAATTTATCGCCACGTT
CGGGCAATTTCGTTATTGGCGATAGCCTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATTGTCCACC
GTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAAGCGTGTTCGCGGAAGTCGCGGCCCGAT
TTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAACAGATGAGTATTGATGCCGATTTGAAGCCGGTAT
TATTGATGCCGATGCCCGCGCGAAGCGGCAAGCGTACTGGAAAGGGAAAGCCAGCTTTAC
GGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATTGCCGGCATCATTATTA
TCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTTTTCGGTGGGGATGACTCGCCATGGTATGGATTTGTCT
CTCCGCCCTGTCTACTTATAACCATGCTGACCATTGGTGATGGTCTTGTTCGCCAGATCCCC
GCATTGTTGATTGCGATTAGTGCCGGTTTTTATCGTGACCCGCGTAAATGGCGATAGCGATA
ATATGGGGCGGAATATCATGACGCAGCTGTTGAACAACCCATTTGTATTGGTTGTTACGGC
TATTTTGACCATTTCAATGGGAACTCTGCCGGGATTCCCACTGCCGGTTTTTGTATTTTA
TCGGTGGTTTTAAGCGTACTCTTCTATTTTAAATTCGGTGAAGCAAAACGTACGCCGCCA
AACCTAAACCAGCAAAGGCGAGCAGCCGCTCAGTATTGAGGAAAAAGAAGGGTCGTCGTT
AGGACTGATTGGCGATCTCGATAAAGTCTCTACAGAGACCGTACCGTGATATTACTTGTG
CCGAAGAGCCGGCGTGAAGATCTGGAAAAAGCTCAACTTGCGGAGCGTCTACGTAGTCAGT
TCTTTATTGATTATGGCGTGCGCCTGCCGGAAGTATTGTTACGCGATGGCGAGGGCCTGGA
CGATAACAGCATCGTATTGTTGATTAATGAGATCCGTTGTAACAATTTACGGTCTATTTT
GATTTGATGCGAGTGGTAAATTATTCCGATGAAGTCGTGTCCTTTGGTATTAATCCAACAA
TCCATCAGCAAGGTAGCAGTCAGTATTTCTGGGTAACGCATGAAGAGGGGGAGAACTCCG
GGAGCTTGGCTATGTGTTGCGGAACCGCTTGATGAGCTTTACCACTGTCTGGCGGTGACG
CTGGCGCGCAACGTCAATGAATATTTCCGGTATTGAGGAAACAAAACATATGCTGGACCAAC
TGGAAGCGAAATTTCTGATTTACTTAAAGAAGTGCTCAGACATGCCACGGTACAACGTAT
ATCTGAAGTTTTGTCAGCGTTTTGTTAAGCGAACGTGTTCCGTGCGTAATATGAAGTTAATT
ATGGAAGCGCTCGCATTGTGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTAACCTTGTGGAGCATA
TTCGTGGAGCAATGGCGCGTTATATTTGTCATAAAATTCGCCAATGGCGCGCAATTACGAGC
AGTAATGGTATCTGCTGAAGTTGAGGATGTTATTTCGCAAAGGGATCCGTCAGACCTCTGGC
AGTACCTTCCCTCAGCCTTGACCCGGAAGCCTCCGCTAATTTGATGGATCTCATTACACTTA
AGTTGGATGATTTATTGATTGCACATAAAGATCTTGTCTCCTTACGTCTGTGCGATGTCGG
TCGATTTATTAAGAAAATGATTGAAGGTGTTTTCCGGATCTGGAGGTTTTATCTTTCCGGT
GAGATAGCAGATAGCAAGTCAGTGAATGTTATAAAAAACAATATAA
    
```

**Amarillo:** localización de los iniciadores 139/141; **rojo:** iniciadores Invasec1 e Invasec 2; **verde:** iniciadores Invavitone-F e Invavitone-R y zona de hibridación de la sonda Invavitone; **morado:** iniciadores Invavitwo-F e Invavitwo-R y zona de hibridación de la sonda Invavitwo.